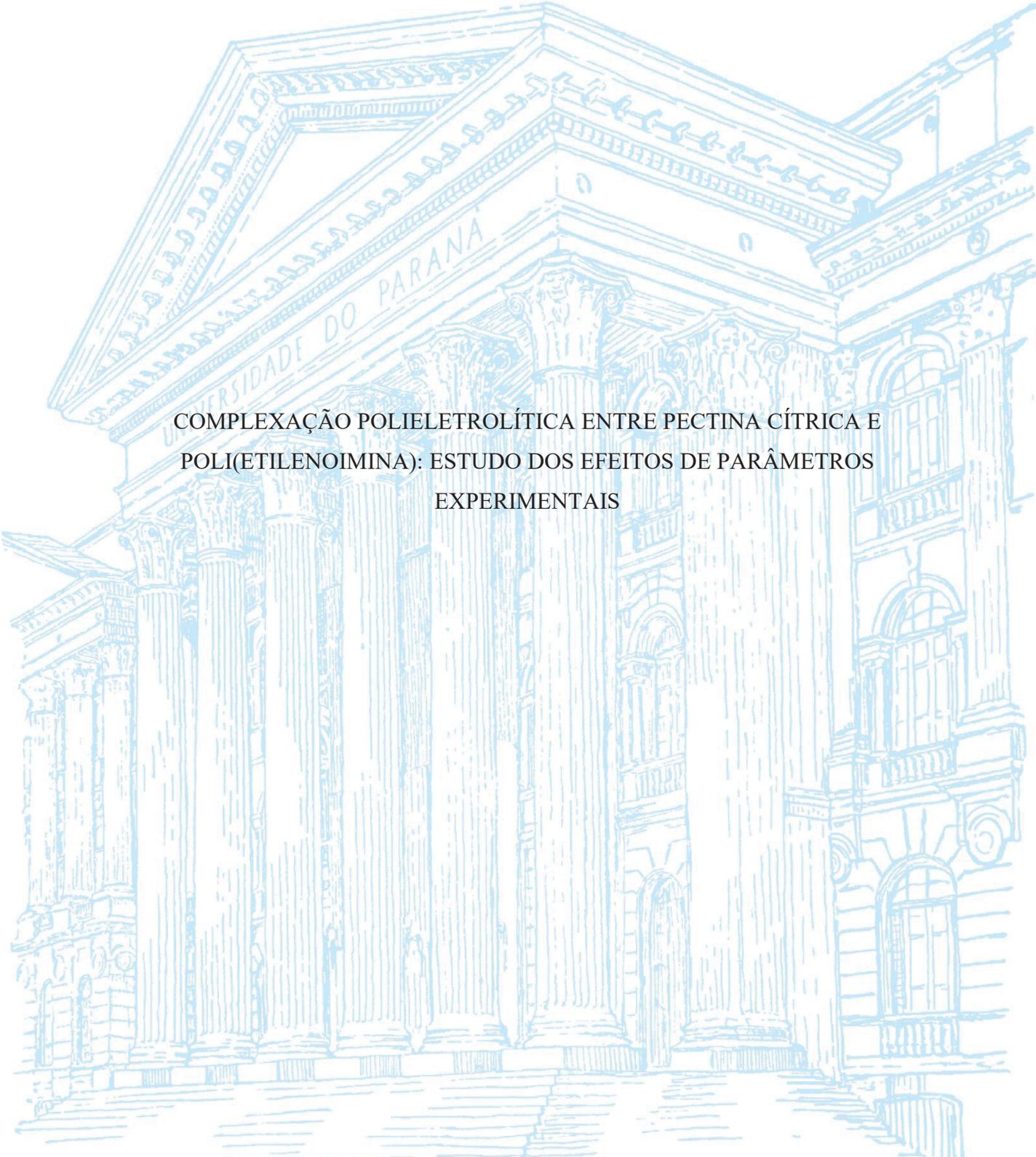


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA FONSECA BALCEWICZ



COMPLEXAÇÃO POLIELETROLÍTICA ENTRE PECTINA CÍTRICA E
POLI(ETILENOIMINA): ESTUDO DOS EFEITOS DE PARÂMETROS
EXPERIMENTAIS

CURITIBA

2025

LETÍCIA FONSECA BALCEWICZ

COMPLEXAÇÃO POLIELETROLÍTICA ENTRE PECTINA CÍTRICA E
POLI(ETILENOIMINA): ESTUDO DOS EFEITOS DE PARÂMETROS
EXPERIMENTAIS

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

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Riegel Vidotti

Coorientador: Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini

CURITIBA

2025

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

Balcewicz, Letícia Fonseca

Complexação polieletrólítica entre pectina cítrica e poli(etilenoimina):
estudo dos efeitos de parâmetros experimentais / Letícia Fonseca Balcewicz.
– Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Izabel Cristina Riegel Vidotti

Coorientador: Ismael Casagrande Bellettini

1. Soluções de polieletrólitos. 2. Compostos poliméricos. 3. Coacervação.
4. Pectina cítrica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Vidotti, Izabel Cristina Riegel. IV. Bellettini,
Ismael Casagrande. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LETÍCIA FONSECA BALCEWICZ**, intitulada: **COMPLEXAÇÃO POLIELETROLÍTICA ENTRE PECTINA CÍTRICA E POLI(ETILENOIMINA): ESTUDO DOS EFEITOS DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS**, 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, 24 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica

02/06/2025 12:47:55.0

IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/05/2025 12:55:31.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/05/2025 13:37:46.0

ANDRÉ RICARDO FAJARDO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS)

Dedico todo o meu esforço a minha querida família,
Luciane, André e Camila

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Luciane e André, que, com muito amor, sempre me deram todo tipo de suporte para eu pudesse me dedicar aos estudos e àquilo que gosto de fazer. E à minha irmã, Camila, que ouviu desabafos e relatos com carinho e curiosidade, por me lembrar de ter orgulho do meu esforço.

Agradeço à professora Izabel Riegel-Vidotti pela orientação e confiança no meu trabalho desde a iniciação científica. Obrigada pelo grande exemplo de profissionalismo, pelos conhecimentos compartilhados e por todas as oportunidades nesse início da minha carreira científica. Ao professor Ismael Casagrande Bellettini, pela coorientação e por sempre estar por perto, mesmo morando em outro estado. Agradeço por me ajudar tantas vezes a encontrar a direção certa nesse trabalho e pelo apoio moral durante os momentos de dúvida. Aos professores André Ricardo Fajardo e Frederico Luis Felipe Soares, pelas valiosas contribuições no meu exame de qualificação e banca de defesa.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e todos os professores, técnicos e funcionários, pela estrutura física e intelectual que me permitiu realizar meu mestrado da melhor forma possível, com apoio da CAPES para financiamento. Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pelas análises por microscopia eletrônica de varredura. Ao Laboratório Biopol por ceder equipamento para análises de potencial zeta e espalhamento de luz.

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces, seus coordenadores e integrantes, por todos os ensinamentos científicos e amizades construídas. Em especial à Renata Sanches, por ser exemplo para mim desde que entrei no grupo, uma amiga e parceira maravilhosa, que me ensinou a ter paciência, mas também a fazer as coisas acontecerem. À Ana Beatriz Mendes e Renata Lima, com quem pude compartilhar dificuldades e conquistas, e que trouxeram muita alegria para dias comuns. À Vanessa Klobukoski e Camila Pesqueira, por serem exemplos de pesquisadoras incríveis e pela amizade muito além do laboratório.

Agradeço aos meus amigos que conheci em Curitiba e que se tornaram minha segunda família: Elias Belo, Natalia Costa, Rafael Silva, Bruno Meyer, Cesar Amaral, Thomas Martins e Adriano Paiva. Obrigada por fazerem a minha vida em Curitiba ser extraordinária. Também aos meus amigos de Joinville, que me viram crescer e, mesmo de longe, estiveram sempre me apoiando ao longo de tantos anos: Giuliana e Luis Steffen, Jakeline Vogelsanger, João Victor Cordeiro e Marcelo Lopes.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que estiveram no meu caminho trazendo inspiração para este trabalho incrível que é ser cientista.

“Cem metros à frente, não penso em outra coisa: não foi preciso ter coragem para chegar aqui. Foi preciso acreditar, caminhar, arriscar, renunciar, aprender, me arrepender, insistir e tentar de novo, de outro jeito. O primeiro perigo estava em ficar no lugar de onde eu vim, renunciar à pequena possibilidade do sonho e, todo dia, tomar a mesma decisão de adiar a descoberta de mim mesma.”

Tamara Klink em Nós: O Atlântico em solitário.

RESUMO

A complexação polieletrólítica é um processo no qual polieletrólitos de cargas opostas interagem através da atração eletrostática formando estruturas denominadas de complexos polieletrólíticos (PECs). Nesse trabalho, foi realizada uma investigação físico-química detalhada da interação entre um polissacarídeo aniônico, a pectina cítrica (PC), e um polícatión sintético, a poli(etilenoimina) (PEI), que serviram como modelo para a avaliação da influência de fatores experimentais na complexação polieletrólítica. A combinação desses polímeros foi possível devido à presença dos grupos ionizáveis -COOH na PC e -NH_2 na PEI. A avaliação da ordem e método de adição, e da força iônica das dispersões foi realizada para determinar as melhores condições experimentais para complexação utilizando proporção mássica 1:1 entre os polímeros. Através da observação do aspecto visual e transmitância determinada por espectroscopia UV-Vis, foi encontrado que a adição lenta de PEI na PC em concentração salina de 10 mmol L^{-1} permitiu a formação de micropartículas esféricas de diâmetro entre 1 e $3 \mu\text{m}$, observadas por imagens de microscopia óptica. Variando o pH das dispersões, foi demonstrado que a formação de partículas estáveis foi possível em pH 9-10, enquanto a complexação em pH 5 gerou precipitados imediatamente após mistura dos polímeros, devido à diferença na densidade de carga dos polímeros em cada condição. O estudo da variação da proporção entre PEI e PC em pH 5 mostrou que a razão das cargas positivas e negativas ($Z = +/-$) é um parâmetro determinante na formação de complexos estáveis em vez de precipitados. Amostras de complexos foram preparadas a partir da titulação condutométrica da PC com dispersão de PEI 10 vezes mais diluída, em proporção mássica PEI:PC que variou de 1:189 até 1:2. Medidas de potencial zeta mostraram a diminuição em módulo da carga superficial com aumento da quantidade de PEI nos complexos. Até razão PEI:PC de 1:9 ($Z = 1$), as dispersões coloidais estáveis formadas apresentaram carga de $-9,8 \text{ mV}$ e diâmetro hidrodinâmico de 520 nm . A partir da proporção 1:8 ($Z > 1$), os complexos preparados precipitaram imediatamente após mistura dos polímeros. A quantificação da PC no sobrenadante desses complexos mostrou que, a partir de 1:9, o conteúdo de PEI satura a PC, atingindo um máximo de PC nos complexos e 100% de rendimento mássico em relação a massa de polímeros utilizada no preparo. A estabilidade dos complexos de PEI:PC igual a 1:44 ($Z = 0,2$), 1:14 ($Z = 0,6$) e 1:8 ($Z = 1,2$) foi investigada ao longo de 168 h. Espectros de FTIR dos complexos apresentaram variações após esse período, especialmente nas bandas do grupo -COO^- , envolvido na interação com a PEI. Simultaneamente, houve redução da magnitude da carga superficial dos complexos, acompanhada por modificações na morfologia dos agregados, evidenciadas por imagens de MEV. Assim, esse trabalho buscou contribuir para a compreensão da complexação polieletrólítica e dos efeitos de diferentes parâmetros sobre esse processo.

Palavras-chave: complexos polieletrólíticos, coacervação complexa, pectina cítrica, poli(etilenoimina), materiais poliméricos.

ABSTRACT

Electrostatic complexation is a process in which oppositely charged polyelectrolytes interact through electrostatic attraction, forming structures known as polyelectrolyte complexes (PECs). In this work, a detailed physicochemical investigation was conducted on the interaction between an anionic polysaccharide, citrus pectin (PC), and a synthetic polycation, poly(ethyleneimine) (PEI), which served as a model system to evaluate the influence of experimental parameters in the electrostatic complexation. The combination of these polymers was possible due to the presence of ionizable groups: $-\text{COOH}$ in PC and $-\text{NH}_2$ in PEI. The influence of the order and method of addition, as well as the ionic strength of the dispersions, was evaluated to determine the optimal conditions for complexation at a 1:1 mass ratio between the polymers. Through visual observation and transmittance measurements obtained by UV-Vis spectroscopy, it was found that a slow addition of PEI into PC at a salt concentration of 10 mmol L^{-1} favored the formation of spherical microparticles with diameters between 1 and $3 \mu\text{m}$, as observed through optical microscopy images. By varying the pH of the dispersions, it was demonstrated that stable particle formation occurred at pH 9-10, whereas complexation at pH 5 led to immediate precipitation upon polymer mixing due to differences in charge density under each condition. The study varying the PEI to PC ratio, at pH 5, showed a balance between positive and negative charges ($Z = +/-$) as the key parameter to determine whether stable complexes or precipitates are formed. Complex samples were prepared by conductometric titration of PC with a PEI dispersion diluted tenfold, and with PEI:PC mass ratios ranging from 1:189 to 1:2. Zeta potential measurements showed a decrease in surface charge magnitude with increasing PEI content in the complexes. Up to a PEI:PC ratio of 1:9 ($Z = 1$), the stable colloidal dispersions exhibited a charge of -9.8 mV and a hydrodynamic diameter of 520 nm . From a ratio 1:8 ($Z > 1$) onwards, the prepared complexes immediately precipitated upon polymer mixing. Quantification of PC in the supernatant of these complexes revealed that, from a 1:9 ratio onward, PC was saturated with PEI, reaching a maximum PC incorporation into the complexes and 100% mass yield relative to the total polymer mass used in the preparation. The stability of PEI:PC complexes at ratios of 1:44 ($Z = 0.2$), 1:14 ($Z = 0.6$), and 1:8 ($Z = 1.2$) was investigated over seven days. FTIR spectra of the complexes showed variations after this period, particularly in the bands corresponding to the $-\text{COO}^-$ group, which is directly involved in the interaction with PEI. Simultaneously, a reduction in the surface charge magnitude of the complexes was observed, along with morphological changes in the aggregates, as evidenced by SEM images. Thus, this work aimed to contribute to the understanding of electrostatic complexation and the effects of different parameters on this process.

Keywords: polyelectrolyte complexes, complex coacervation, citric pectin, polyethyleneimine, polymeric materials.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representações da complexação polieletrólítica: A) ΔH_{DCE} é a entalpia envolvida na formação da dupla camada elétrica (DCE), ΔH_{par} é a energia do pareamento dos polieletrólitos e ΔH_{PEC} é a entalpia de formação do PEC. Durante a formação do PEC, interações eletrostáticas entre grupos carregados dos polímeros e contra-íons são substituídas pela atração entre os polieletrólitos (B). Fonte: Adaptado de [13]. | 20 |
| Figura 2. Influência da concentração de sal nos parâmetros termodinâmicos entalpia (ΔH), entropia ($-T\Delta S$) e energia livre (ΔG), na formação de complexos. Fonte: Adaptado de [14]. | 21 |
| Figura 3. Coacervação complexa da PEI com ácido tióctico (TA). Fonte: Adaptado de [19]. | 23 |
| Figura 4. Esquema do efeito da força iônica em complexo polieletrólítico, que começa como sólido (à esquerda), passando para coacervado/líquido elástico, até solução/líquido (à direita) com aumento da concentração molar de KBr. Fonte: Adaptado de [21]. | 25 |
| Figura 5. PECs de cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) e ácido poliacrílico (PAA), à esquerda, apresentam características de líquido, enquanto de PDDA com ácido poli(4-estireno sulfônico) (PSS), à direita, apresentam aspecto de sólido. Em ambos, o poliânion está indicado em preto e o polication em vermelho, e acima dos tubos de ensaio, estão representados os valores de Z ($[-]/[+]$) Fonte: Adaptado de [22]. | 26 |
| Figura 6. Estrutura química da pectina cítrica: A) representação convencional da cadeia pectica, onde os círculos vermelhos representam unidades de GalA e os restantes as ramificações. Fonte: Adaptado de [23]. B) unidades de ácido D-galacturônico (GalA) com metil esterificação. Fonte: A Autora, 2024. | 28 |
| Figura 7. Conformações da pectina. Fonte: Adaptado de [31]. | 29 |
| Figura 8. Estrutura química da poli(etilenoimina). Fonte: A Autora, 2024. | 31 |
| Figura 9. Esquema dos métodos utilizados para complexação de PC e PEI. Fonte: A Autora, 2024. | 37 |
| Figura 10. Perfil de distribuição das espécies carregadas e neutras de PC e PEI em função do pH. Fonte: A Autora, 2024. | 39 |
| Figura 11. Reação do método de Dubois para quantificação de açúcares. Fonte: A Autora, 2025. | 43 |
| Figura 12. Espectros de FTIR das pectinas antes da purificação (PC_{com}) e após diálise (PC). Fonte: A Autora, 2024. | 45 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Espectro de FTIR da poli(etilenoimina). Fonte: A Autora, 2024. | 45 |
| Figura 14. Curva de titulação ácido-base da PC 0,2% (m v ⁻¹) em NaCl 10 mmol L ⁻¹ com NaOH 0,1 mol L ⁻¹ em temperatura de 25°C. Fonte: A Autora, 2024..... | 47 |
| Figura 15. Curva de titulação ácido-base da PEI 0,02% (m v ⁻¹) em NaCl 10 mmol L ⁻¹ com HCl 0,1 mol L ⁻¹ em temperatura de 25°C. Fonte: A Autora, 2024..... | 48 |
| Figura 16. Perfil cromatográfico (HPSEC) obtido para a pectina cítrica dialisada (PC). Fonte: A Autora, 2024. | 49 |
| Figura 17. Representação da formação de partículas esféricas de diferentes diâmetros em função da ordem de adição da PC (em azul) e PEI (em vermelho): A) PC/PEI e B) PEI/PC. | 51 |
| Figura 18. Imagens de microscopia óptica com 40x de ampliação dos coacervados PC/PEI (A e B) e PEI/PC (C e D) logo após o preparo, à esquerda, e após 5 dias, à direita. Fonte: A Autora, 2023 | 51 |
| Figura 19. Imagens de microscopia óptica e fotografias dos complexos PC/PEI e PEI/PC preparados em diferentes concentrações de KCl. Fonte: A Autora, 2024..... | 53 |
| Figura 20. Efeito da adição de sal (aumentando da esquerda para a direita) nas microestruturas do complexo polieletrólítico sólido, coacervado e solução. Fonte: Adaptado de [21]..... | 54 |
| Figura 21. Dispersões de complexos de PC e PEI preparadas sem ajuste do pH, com pH ajustado antes da mistura e depois de misturar os polímeros, comparando ordem e velocidade de adição. Fonte: A Autora, 2024..... | 55 |
| Figura 22. Espectros de transmitância das amostras preparadas com ajuste de pH antes da adição lenta (índice “a”), com ajuste de pH depois da adição lenta (índice “d”) e por adição rápida dos polímeros (índice “r”). Fonte: A Autora, 2024. | 56 |
| Figura 23. Titulação condutométrica de PC 0,2% (m v ⁻¹) com PEI 0,02% (m v ⁻¹). As equações de reta estão indicadas com as cores correspondentes às regiões no gráfico onde os ajustes lineares foram feitos. Os pontos indicados pelos números de 1 a 11 foram preparados isoladamente para caracterização físico-química dos complexos. Fonte: A Autora, 2024. | 57 |
| Figura 24. Aspecto visual dos pontos 1 a 14 da titulação condutométrica imediatamente após o preparo, com valores da proporção mássica (PEI:PC), razão das cargas (Z) e transmitância em 550 nm (T%). Fonte: A Autora, 2024..... | 59 |
| Figura 25. Tamanho médio (Dh) determinado pela distribuição de intensidade e potencial zeta (ζ) dos complexos de PC e PEI em função da proporção mássica entre os polímeros. Fonte: A Autora, 2024. | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 26. Quantidade de PC (barras coloridas) e rendimento mássico (barras hachuradas) dos complexos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 da titulação de PC com PEI. Fonte: A Autora, 2024. | 61 |
| Figura 27. Complexos de PC e PEI em diferentes proporções poliméricas acompanhados ao longo de 168 h. Fonte: A Autora, 2024. | 62 |
| Figura 28. Espectros de FTIR da PC, PEI e seus complexos nas proporções PEI:PC de 1:44, 1:14 e 1:8 no dia do preparo (t = 0 h) e uma semana após preparo (t = 168 h). Fonte: A Autora, 2024. | 63 |
| Figura 29. Potencial zeta (ζ) e de complexos de PC e PEI em diferentes proporções poliméricas medido ao longo do tempo. Fonte: A Autora, 2024. | 65 |
| Figura 30. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos complexos nas proporções PEI:PC de 1:44 (A, B), 1:14 (C, D) e 1:8 (E, F). Na linha de cima, amostras preparadas no dia da complexação; em baixo, amostras preparadas 168 h após complexação. | 66 |
| Figura 31. Curvas de titulação da PC 0,2% (m v ⁻¹) em NaCl 10 mmol L ⁻¹ com NaOH 0,1 mol L ⁻¹ em temperatura de 25°C. Fonte: A Autora, 2024. | 74 |
| Figura 32. Gráficos de 2 ^a derivada das titulações ácido-base da PC. | 74 |
| Figura 33. Curvas de titulação da PEI 0,02% (m v ⁻¹) em NaCl 10 mmol L ⁻¹ com HCl 0,1 mol L ⁻¹ em temperatura de 25°C. Fonte: A Autora, 2024. | 75 |
| Figura 34. Gráficos de 2 ^a derivada das titulações ácido-base da PEI. | 75 |
| Figura 35. Curva analítica de ácido galacturônico (GalA) para determinação pelo método colorimétrico de Dubois. Fonte: A Autora, 2024. | 76 |
| Figura 36. Tamanho médio (Dh) determinado pela distribuição de intensidade de complexos de PC e PEI em diferentes proporções poliméricas medido ao longo do tempo. Fonte: A Autora, 2024. | 76 |
| Figura 37. Espectros de EDS dos complexos nas proporções PEI:PC de 1:44 (A, B), 1:14 (C, D) e 1:8 (E, F). Fonte: A Autora, 2024. | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Identificação das amostras com diferentes proporções de PEI para PC. | 41 |
| Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da pectina cítrica dialisada determinados pela técnica HPSEC (M_w , M_n , \bar{D}). A porcentagem ao lado do valor de M_w indica o erro associado a análise. | 49 |
| Tabela 3. Distribuição de tamanho por intensidade das amostras 1 a 14 da curva de titulação obtido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (A Autora, 2024). | 80 |
| Tabela 4. Distribuição de tamanho por número das amostras 1 a 14 da curva de titulação obtido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (A Autora, 2024). | 80 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

| | |
|---------------|--|
| ΔH | Varição de entalpia |
| ΔS | Varição de entropia |
| μ | Força iônica |
| CME | Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR |
| \mathcal{D} | Polidispersão de massas molares |
| D_h | Diâmetro hidrodinâmico |
| DLS | Do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i> , espalhamento dinâmico de luz |
| EDS | Do inglês <i>Energy-dispersive X-ray Spectroscopy</i> , espectroscopia de raios X por dispersão de energia |
| FTIR | Do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> , espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier |
| GalA | Ácido D-galacturônico |
| GE | Grau de esterificação |
| GPMIn | Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces |
| HG | Homogalacturonana |
| HMP | Do inglês <i>High Methoxy Pectin</i> , pectina de alto grau de esterificação |
| HPSEC | Do inglês <i>High Pressure Size Exclusion Chromatography</i> , cromatografia de exclusão estérica de alta pressão |
| LMP | Do inglês <i>Low Methoxy Pectin</i> , pectina de baixo grau de esterificação |
| LS | Do inglês <i>Light Scattering</i> , espalhamento de luz |
| $m\ m^{-1}$ | Razão massa/massa |
| $m\ v^{-1}$ | Razão massa/volume |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| M_n | Massa molar numérica média |
| M_w | Massa molar ponderal média |
| MWCO | Do inglês <i>Molecular Weight Cut Off</i> , limite de corte de peso molecular |
| PBS | Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> , solução salina tamponada com fosfato |
| PC/PEI | Ordem de adição PC adicionada à PEI |
| PC | Pectina crítica |
| PCcom | Pectina cítrica comercial (Sigma-Aldrich) |
| PEC | Complexo polieletrólítico |

| | |
|--------------|---|
| PEI/PC | Ordem de adição PEI adicionada à PC |
| PEI:PC (m/m) | Proporção mássica (razão) PEI/PC |
| PEI | Poli(etilenoimina) |
| pKa | Logaritmo negativo da constante de dissociação ácida (Ka) |
| RG-I | Ramnogalacturonana I |
| RG-II | Ramnogalacturonana II |
| RI | Do inglês <i>Refraction Index</i> , índice de refração |
| T% | Transmitância obtida por espectroscopia UV-Vis |
| UV-Vis | Ultravioleta e visível |
| Z | Razão cargas positivas/cargas negativas (+/-) |
| ζ | Potencial zeta |
| χ | Fração molar |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. | REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 2.1 | Complexação polieletrólítica | 19 |
| 2.2 | Forças intermoleculares entre polieletrólitos | 22 |
| 2.3 | Fatores que afetam sistemas de polieletrólitos | 24 |
| 2.3.1 | Potencial hidrogeniônico (pH)..... | 24 |
| 2.3.2 | Força iônica | 25 |
| 2.3.3 | Razão entre policação e poliânion | 26 |
| 2.4 | Pectina cítrica | 27 |
| 2.5 | Poli(etilenoimina) | 31 |
| 3. | OBJETIVOS | 33 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| 4.1 | Materiais | 33 |
| 4.2 | Purificação e caracterização dos polímeros | 34 |
| 4.3 | Preparo dos complexos de PC e PEI | 36 |
| 4.3.1 | Avaliação do método de adição | 36 |
| 4.3.2 | Avaliação da força iônica | 37 |
| 4.3.3 | Avaliação do pH | 37 |
| 4.3.4 | Avaliação da proporção entre polímeros na complexação | 40 |
| 4.4 | Caracterização dos complexos de PC e PEI | 42 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 5.1 | Caracterização dos polímeros | 44 |
| 5.2 | Complexação polieletrólítica de PC com PEI | 50 |
| 5.2.1 | Efeito do método de adição | 50 |
| 5.2.2 | Efeito da força iônica..... | 52 |
| 5.2.3 | Efeito do pH | 54 |
| 5.2.4 | Efeito da proporção entre polímeros | 57 |
| 5.3 | Estabilidade dos complexos de PC e PEI ao longo do tempo | 62 |
| 6. | CONCLUSÕES | 67 |
| | REFERÊNCIAS | 69 |
| | ANEXO 1 – MATERIAL COMPLEMENTAR | 74 |

1. INTRODUÇÃO

O progresso no desenvolvimento de materiais poliméricos depende da compreensão das interações intra- e intermoleculares que determinam sua estrutura e propriedades. Dentre essas interações, a complexação polieletrólítica - um fenômeno impulsionado pela atração entre coloides carregados - se destaca como uma abordagem mais “verde”, pois ocorre espontaneamente em meio aquoso. O fenômeno de complexação polieletrólítica desempenha um papel importante na organização de polieletrólitos em estruturas ordenadas, as quais apresentam aplicações promissoras em diversas áreas, desde biotecnologia até engenharia de materiais [1].

A atração eletrostática entre polímeros de cargas opostas resulta na formação de complexos polieletrólíticos (PECs) em dispersão, processo governado por fatores entálpico, da atração coulombiana, e entrópico, da liberação dos contra-íons dos polieletrólitos [2,3]. A estabilidade e as propriedades finais desses sistemas são altamente sensíveis às condições experimentais, especialmente àquelas que influenciam a densidade de carga dos polieletrólitos e, conseqüentemente, a complexação das espécies. Estudos mostram que o pH é fator chave na otimização desse processo [4], sendo essencial compreender seu impacto nos grupos ionizáveis dos polímeros. A variação de condições como pH e força iônica, além da concentração, natureza e tamanho dos polímeros, possibilita a modulação das propriedades dos materiais provenientes de PECs. A investigação desses parâmetros viabiliza a sua aplicação em diferentes contextos. As matrizes poliméricas dos PECs são capazes de encapsular biomoléculas, fármacos, enzimas e outras substâncias, além de oferecer uma forma de proteger os ativos e controlar sua liberação [5].

Para os diversos usos dos PECs, é comum empregar polímeros sintéticos, cujas propriedades são bem conhecidas e facilmente controladas. No entanto, aplicações que requerem biocompatibilidade tendem a favorecer o uso de polímeros naturais, que muitas vezes possuem essa característica de forma intrínseca. A utilização dos polímeros naturais reduz impacto ambiental em relação ao uso de polímeros sintéticos, visto que podem ser obtidos de forma sustentável através da exploração de recursos renováveis [6]. Por outro lado, seu uso enfrenta desafios significativos, como a variabilidade estrutural entre diferentes fontes e lotes, a dificuldade de controle sobre suas propriedades físico-químicas e as limitações na escalabilidade dos processos industriais. Essas barreiras frequentemente tornam os polímeros naturais menos previsíveis do que os sintéticos, dificultando sua aplicação em larga escala.

A complexação polieletrólítica entre a pectina cítrica (PC), um polímero natural, e poli(etilenoimina) (PEI), um polímero sintético, foi objeto de estudo deste trabalho. Por apresentarem densidade de cargas opostas, a interação eletrostática entre os dois polímeros leva a formação de um PEC. A pectina é um polissacarídeo que pode ser extraída da casca de frutas cítricas. Esse polímero tem caráter biodegradável e baixa toxicidade que possibilitam sua aplicação nos setores alimentício e biomédico [7]. Em valores de pH acima do seu pKa, os grupos funcionais de ácido carboxílico presentes na PC podem ser desprotonados, conferindo ao polímero uma carga negativa. A PEI é um polímero sintético explorado no campo de terapia genética devido a sua capacidade de formar complexos com o DNA [8]. Esses complexos são formados via interações eletrostáticas entre grupos fosfato do DNA e grupos amina presentes na PEI, os quais permanecem protonados por uma larga faixa de pH.

A combinação das propriedades da pectina com o potencial de complexação da PEI oferece um caminho interessante para o desenvolvimento de materiais. É possível encontrar na literatura alguns trabalhos que mencionam o uso conjunto da pectina e da PEI de forma indireta, promovendo a ligação da pectina com uma molécula que, por sua vez, é ligada à PEI [9], e de forma direta, onde evidencia-se a interação do tipo eletrostática entre PEI e PC. No trabalho de Das e colaboradores foram produzidos *beads* de pectina, através da gelificação com íons cálcio e reticulação com a PEI para entrega de um fármaco direcionada para a região do cólon. Foram encontradas condições de concentrações de PEI e valores de pH que geraram *beads* capazes de proteger o princípio ativo encapsulado, o que ocorreu pelo fortalecimento da matriz de pectina na presença da PEI através da complexação polieletrólítica entre os polímeros [10]. Em outro trabalho, a atração entre os grupos amino e carboxila também possibilitou o revestimento por meio de adsorção eletrostática da pectina em fibras carregadas com óleo essencial e modificadas com a PEI [11]. As membranas resultantes apresentaram atividade antibacteriana em vista da liberação do óleo essencial induzida pela decomposição do revestimento de pectina por enzimas.

Embora a complexação polieletrólítica tenha uma origem aparentemente simples, baseada na atração entre cargas, ela apresenta desafios relacionados à sensibilidade às condições ambientais e à compatibilidade entre os polímeros utilizados. Este trabalho se propôs a estudar o comportamento de complexação e entender se, por meio desse processo, é possível produzir materiais com propriedades ajustáveis. Por meio de uma investigação detalhada da interação entre os polieletrólitos e da avaliação dos efeitos de diferentes parâmetros sobre a complexação polieletrólítica. Esse estudo demonstra que a complexação

não é um processo trivial. A compreensão do mecanismo de formação dos complexos é fundamental para determinar as condições necessárias à produção de materiais com estruturas e propriedades específicas. Um estudo físico-químico da associação entre PC e PEI foi realizado, utilizando-os como modelo para investigar a formação de complexos polieletrólíticos, buscando compreender a relação entre as interações intermoleculares e o desempenho macroscópico de PECs. Além disso, o uso de PC e PEI teve como objetivo explorar as potencialidades desses polímeros, uma vez que foram pouco trabalhados em conjunto.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Complexação polieletrólítica

A complexação polieletrólítica é uma interação supramolecular não covalente entre polieletrólitos de cargas opostas. Esse processo tem origem na atração eletrostática entre as espécies negativas e positivas, mas também é favorecida pela variação de entropia associada à liberação dos contra-íons das espécies isoladas. A partir da complexação polieletrólítica é possível obter materiais diversos com diferentes tamanhos, morfologias, tipos e quantidade de grupos funcionais através da variação das condições no preparo do complexo como tipo de solvente, força iônica, quantidade de contra-íons, pH, hidratação e temperatura [1].

Dispersões de polieletrólitos são sistemas coloidais, ou seja, sistemas heterogêneos onde o polímero (fase dispersa) é solvatado pelas moléculas do solvente e íons presentes na solução (fase dispersante). Isolados, os polieletrólitos são envoltos por uma dupla camada elétrica, constituída de uma camada de contra-íons fortemente adsorvidos à superfície da partícula (camada de Stern) e uma camada difusa, onde os íons são atraídos pela carga superficial da partícula, mas não estão tão fortemente ligados [12]. Ao misturar dispersões de polication e poliânion, tem-se a formação de um complexo polieletrólítico (PEC), acompanhada do rearranjo dos contra-íons antes adsorvidos aos polieletrólitos, como mostra a Figura 1.

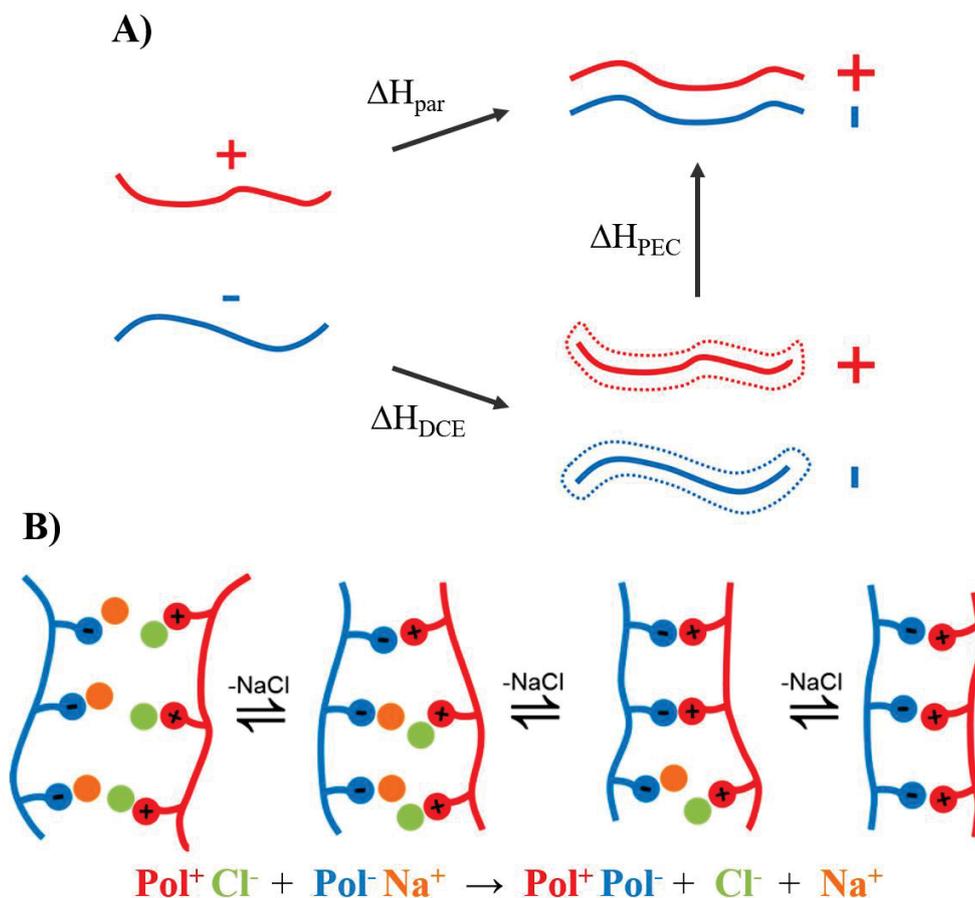


Figura 1. Representações da complexação polieletrólítica: A) ΔH_{DCE} é a entalpia envolvida na formação da dupla camada elétrica (DCE), ΔH_{par} é a energia do pareamento dos polieletrólitos e ΔH_{PEC} é a entalpia de formação do PEC. Durante a formação do PEC, interações eletrostáticas entre grupos carregados dos polímeros e contra-íons são substituídas pela atração entre os polieletrólitos (B). Fonte: Adaptado de [13].

A atração eletrostática entre os polieletrólitos é um processo, no geral, favorecido pela variação de entalpia até ser atingida a condição equimolar das cargas positivas e negativas [13]. O rearranjo dos contra-íons promove a liberação de íons antes confinados em uma camada ordenada e a imobilização da macromolécula no PEC. A variação entrópica da troca iônica da camada de íons inicialmente adsorvida por um macro-íon (polieletrólito) pode ser descrita pela Equação 1, onde ΔS é a variação de entropia:

$$\Delta S = S_{\text{ion}}(\text{livre}) - S_{\text{ion}}(\text{adsorvido}) + S_{\text{macro-íon}}(\text{adsorvido}) - S_{\text{macro-íon}}(\text{livre}) \quad (1)$$

Polieletrólitos de cadeia longa (macro-íons) são muito maiores que os contra-íons, portanto, a perda de entropia pelo macro-íon é muito menor que o ganho dos contra-íons ($\Delta S_{\text{ion}} \gg \Delta S_{\text{macro-íon}}$), fazendo com que a complexação polieletrólítica seja favorecida entropicamente ($\Delta S > 0$) [13].

Dada a contribuição dos contra-íons para a complexação eletrostática, torna-se evidente que a força iônica é um parâmetro determinante no balanço energético do processo.

Em baixa força iônica, a concentração de contra-íons da dupla camada elétrica é comparativamente muito maior que a concentração na solução. O ganho entrópico da liberação desses contra-íons durante a complexação é maior do que na condição em que a concentração de sal na solução já é elevada (alta força iônica).

A força iônica também exercerá influência sob a entalpia do sistema; em baixa concentração salina, a dupla camada elétrica dos polieletrólitos isolados apresentará poucos contra-íons (comparado com a condição de alta força iônica), fazendo com que a energia eletrostática do sistema diminua consideravelmente com a complexação dos polímeros. A redução da energia eletrostática faz da complexação um processo exotérmico, que é o contrário do que acontece em força iônica elevada. Nesse caso, a dupla camada elétrica é compacta, e a energia perdida com a liberação de íons durante a complexação não é totalmente compensada pela formação de novos pares iônicos entre os polieletrólitos. Como resultado, pode haver um aumento na energia total do sistema, caracterizando a complexação como um processo endotérmico [14]. A Figura 2 resume o efeito da força iônica (concentração de sal) sob os parâmetros termodinâmicos.

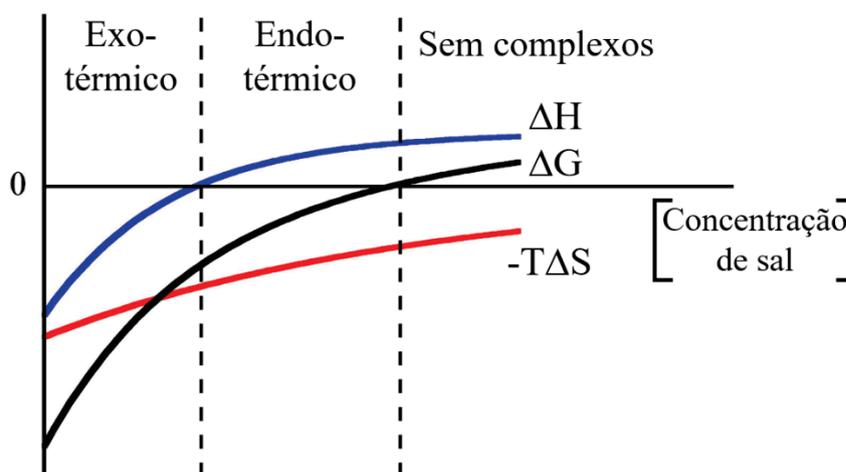


Figura 2. Influência da concentração de sal nos parâmetros termodinâmicos entalpia (ΔH), entropia ($-T\Delta S$) e energia livre (ΔG), na formação de complexos. Fonte: Adaptado de [14].

A separação de fase líquido-líquido derivada da complexação entre os polieletrólitos é chamada de coacervação complexa, na qual a fase rica em polímero é chamada de coacervado [5]. A fase coacervada é caracterizada por ser um sistema no qual cada cadeia polimérica pode interagir com várias outras cadeias de forma dinâmica, podendo ser substituídas por outras interações ao longo do tempo [15]. A coacervação tende a correr quando os polieletrólitos interagem em razão equimolar de cargas, nas condições em que a complexação é mais efetiva. Quando as cargas não estão equilibradas, ou seja, há uma carga na superfície residual, a formação de complexos solúveis é favorecida no lugar de uma

separação de fase macroscópica. Por outro lado, quando a interação no par é muito forte, como no caso de polieletrólitos com elevada densidade de carga em meio de baixa força iônica, não há contra-íons suficientes para balancear a forte atração eletrostática, resultando na formação de um complexo fora do equilíbrio termodinâmico [14].

2.2 Forças intermoleculares entre polieletrólitos

A formação de pares polieletrólíticos se dá através de interações não-covalentes que desempenham papel importante na formação de estruturas supramoleculares. Essas interações atuam em distâncias de angstroms à nanômetros, e interferem na automontagem de materiais, no processo de adesão em superfícies e na estabilização coloidal [16].

Sistemas de polieletrólitos são governados principalmente por forças eletrostáticas, que podem ser descritas pela teoria de Deryagin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO), a qual determina o balanço entre forças atrativas e repulsivas dependente da distância de separação dos objetos coloidais. Essa teoria considera a repulsão eletrostática derivada da formação da dupla camada elétrica, que é equilibrada pelas forças atrativas de van der Waals. De modo geral, quando a força resultante é atrativa, a agregação dos coloides é favorecida, enquanto uma força repulsiva contribui para a estabilidade do sistema [12].

Além da atração eletrostática, outras interações não covalentes menos fortes também exercem influência sob polieletrólitos. Ligações de hidrogênio são interações do tipo dipolo-dipolo que ocorrem entre átomos eletronegativos com par de elétrons isolado e hidrogênios polarizados ligados a elementos eletronegativos. Essas ligações são de maior magnitude que outras interações intermoleculares e, ao superar a repulsão eletrostática e efeito estérico que manteriam as moléculas separadas, favorecem estruturas automontadas [17]. Esse tipo de interação é capaz de fornecer direcionalidade para estruturas coloidais por acontecer em sítios específicos nas moléculas. Um bom exemplo disso está na formação da dupla hélice do DNA, cuja estrutura é organizada por ligações de hidrogênio entre pares de bases e interações π - π entre os anéis aromáticos das bases nitrogenadas

Polissacarídeos possuem em grupos funcionais polares como hidroxilas e/ou carboxilas, que formam ligações de hidrogênio intra- e intermolecular orientando as cadeias poliméricas. Em moléculas de celulose, por exemplo, os grupos hidroxila e os átomos de hidrogênio de cadeias adjacentes estabelecem ligações de hidrogênio, promovendo o empacotamento das estruturas poliméricas. Esse processo leva à automontagem em fibrilas, que se agregam para formar microfibrilas maiores, compondo a estrutura hierárquica da celulose [18].

Outro possível tipo de força atrativa entre cadeias poliméricas dispersas em solvente aquoso são as interações hidrofóbicas. Quando uma molécula apolar é dispersa em água, as ligações de hidrogênio do solvente são perturbadas, levando à reorganização das moléculas de água em uma camada de solvatação ordenada ao redor da molécula apolar. Essa organização reduz a entropia do sistema e, para minimizar esse efeito, as moléculas apolares tendem a se agrupar, formando agregados que diminuem a camada de solvatação. Assim, moléculas de água são liberadas e recuperam parte da entropia perdida [17]. Essa interação é responsável, por exemplo, pela formação de estrutura terciária de proteínas através do enovelamento, pela automontagem de micelas, vesículas e membranas, entre outras estruturas [16].

O trabalho de Peng e colaboradores [19] demonstra que, no par composto por PEI e ácido tióctico (TA), há contribuição da atração eletrostática entre grupos amino da PEI e carboxilato do TA para formação de coacervados, mas também de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Figura 3). Com o tempo, essas interações são intensificadas, o que altera as propriedades dos coacervados, que evoluem de uma suspensão que sofre separação de fase até formação de um hidrogel.

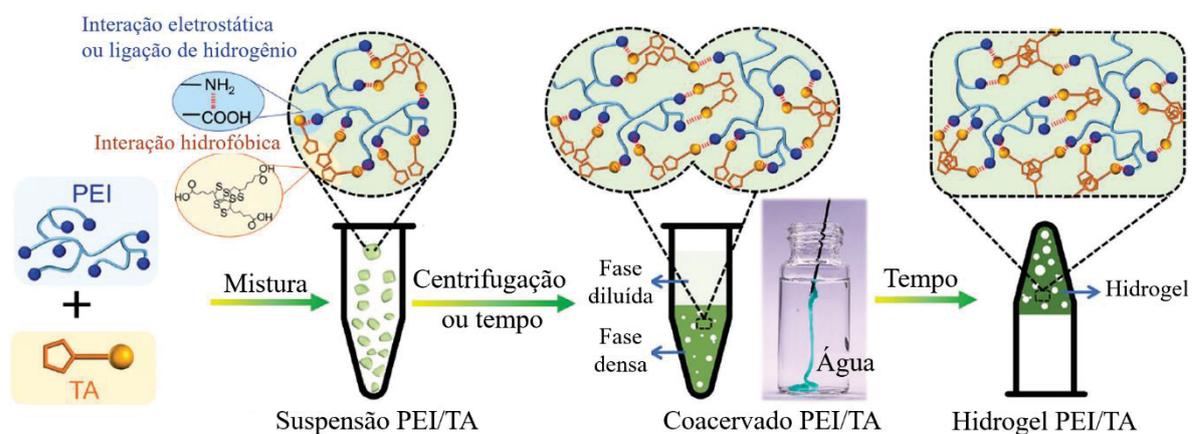


Figura 3. Coacervação complexa da PEI com ácido tióctico (TA). Fonte: Adaptado de [19].

Quando se trabalha com PECs, é essencial compreender como as interações intermoleculares podem influenciar sua formação e evolução ao longo do tempo, bem como sua resposta a mudanças nas condições do sistema. Fatores como pH, força iônica e temperatura afetam diretamente os polieletrólitos, modulando suas interações e, consequentemente, a organização do complexo. Além disso, a presença de interações não covalentes faz com que PECs sejam sistemas dinâmicos e moduláveis, uma vez que são interações reversíveis.

2.3 Fatores que afetam sistemas de polieletrólitos

Condições experimentais da complexação polieletrólítica como pH, força iônica, temperatura, método e ordem de mistura dos polímeros, tipo de agitação e razão mássica/molar entre os polieletrólitos, além das características intrínsecas dos polímeros, como massa molar, estrutura química e densidade de carga, determinam as propriedades físico-químicas do complexo polieletrólítico. Considerando esses fatores e o fato de que a atração eletrostática é a força motriz da complexação, os PECs podem ser preparados, na prática, pela simples mistura de uma dispersão polimérica em outra. Esse processo pode seguir duas abordagens principais:

- Mistura direta de polieletrólitos carregados: Nesse caso, os polímeros são previamente ajustados às condições de pH e força iônica que maximizam sua densidade de carga, garantindo interações eletrostáticas mais eficientes.
- Indução da complexação após a mistura: Aqui, as dispersões poliméricas são inicialmente combinadas e, em seguida, as condições do meio (como pH e força iônica) são modificadas para promover a ionização dos polieletrólitos e, conseqüentemente, a formação do complexo.

Ambas as estratégias oferecem vantagens dependendo do sistema em estudo e dos requisitos desejados para o material final. A seguir, será feita uma breve revisão de como PECs podem ser produzidos e como alguns fatores afetam esses sistemas.

2.3.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

A formação de um complexo polieletrólítico requer que as espécies estejam carregadas, uma vez que é impulsionada pela atração eletrostática entre elas. No caso de polieletrólitos com grupos ácidos ou básicos, o grau de ionização depende do pH da solução. Por exemplo, um polímero com grupos de carboxila como a pectina apresentará carga na condição em que $\text{pH} > \text{pK}_a$, na qual os grupos funcionais estão majoritariamente desprotonados. Já em proteínas, a presença de dois grupos funcionais ionizáveis – carboxilas e aminas – faz com que a macromolécula assuma carga total positiva, negativa ou neutra em faixas distintas de pH, que dependem do pK_a de cada grupo. Assim, a otimização desse parâmetro se mostra essencial para favorecer a complexação polieletrólítica entre dois polieletrólitos, como demonstrado pela combinação de gelatina, uma proteína, com goma arábica, um polissacarídeo obtido a partir da seiva de árvores *Acacia* [4]. Coacervados derivados dessa combinação foram preparados misturando, sob agitação, dispersões 2,5% (m v^{-1}) dos polímeros no mesmo volume. O pH da mistura foi ajustado para a condição ótima

de complexação para o par polieletrólítico em questão, resultando na formação de coacervados micrométricos identificados no precipitado após resfriamento da mistura. A variação dessa condição em sistemas de complexos polieletrólíticos pode promover a neutralização das cadeias poliméricas, o que minimiza a atração entre os polímeros. O complexo não necessariamente é desfeito, mas sua composição muda devido à saída de cadeias neutralizadas do PEC. Essa mudança na proporção entre os polímeros é um fator importante que determina algumas propriedades do material final [1].

2.3.2 Força iônica

A força iônica, de forma semelhante ao pH, também afeta o balanço de cargas do complexo, pois contra-íons podem neutralizar a carga dos polieletrólitos. A adição de sal promove uma separação gradual das cadeias poliméricas, até uma condição na qual o complexo é completamente dissociado [20,21]. O esquema da Figura 4 mostra a transição de um PEC na fase sólida para fase líquida diluída com aumento da quantidade do sal (KBr). Inicialmente, o PEC foi sintetizado misturando, sob agitação, dispersões de policação e poliânion preparadas em baixa força iônica, resultando na precipitação de um sólido. Esse sólido foi lavado para remover completamente o sal e, depois de liofilizado, disperso novamente em solução com elevada concentração de KBr, dissolvendo o PEC (solução na Figura 4). Através de adições de água, a concentração de KBr diminui, favorecendo a formação do coacervado pela separação de fases líquido-líquido. Essa reversibilidade é uma característica derivada da dependência com as condições do meio e permite que PECs sejam sensíveis a variáveis externas e ajustáveis.

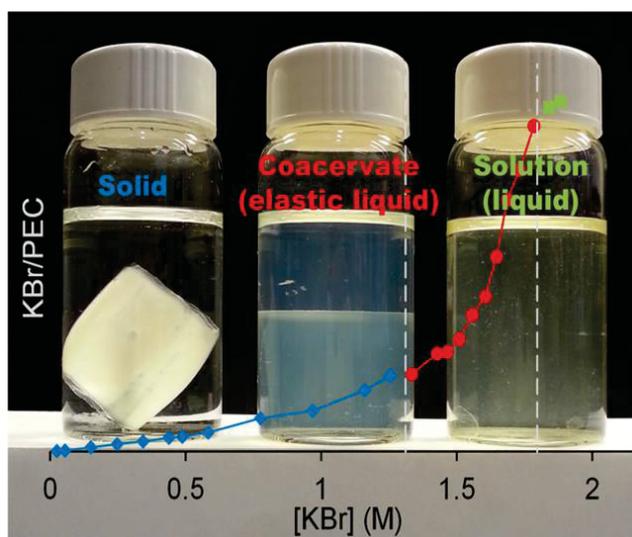


Figura 4. Esquema do efeito da força iônica em complexo polieletrólítico, que começa como sólido (à esquerda), passando para coacervado/líquido elástico, até solução/líquido (à direita) com aumento da concentração molar de KBr. Fonte: Adaptado de [21].

2.3.3 Razão entre polication e poliânion

No estudo realizado por Li e colaboradores [22] foi demonstrado que interações fracas entre polímeros de cargas opostas geram coacervados com características de líquido. Por outro lado, pares fortemente complexados formam agregados sólidos parecidos com precipitados. PECs foram preparados misturando volumes diferentes de dispersões de polication e poliânion na mesma concentração, sob agitação, para atingir diferentes razões entre carga negativa e positiva ($[-]/[+]$). Dois pares de PECs foram sintetizados com o mesmo polication PDDA, mas poliânions com diferentes graus de hidrofiliicidade. Na Figura 5, é possível observar que na condição $[-]/[+] = 1$, o par PDDA/PSS apresenta precipitados sólidos, o que sugere que a força de interação entre eles é forte o suficiente para levar à sedimentação dos complexos em vez de formar gotículas dispersas, como em PDDA/PAA. Nesse último, a condição equimolar de cargas e o caráter hidrofílico do PAA favorece a transição líquido-líquido de fases, formando coacervados. Esse estudo mostra que tanto a natureza dos polieletrólitos quanto a razão das cargas positivas e negativas do sistema afetam a ordem da força da atração eletrostática e, conseqüentemente, as propriedades dos PECs.

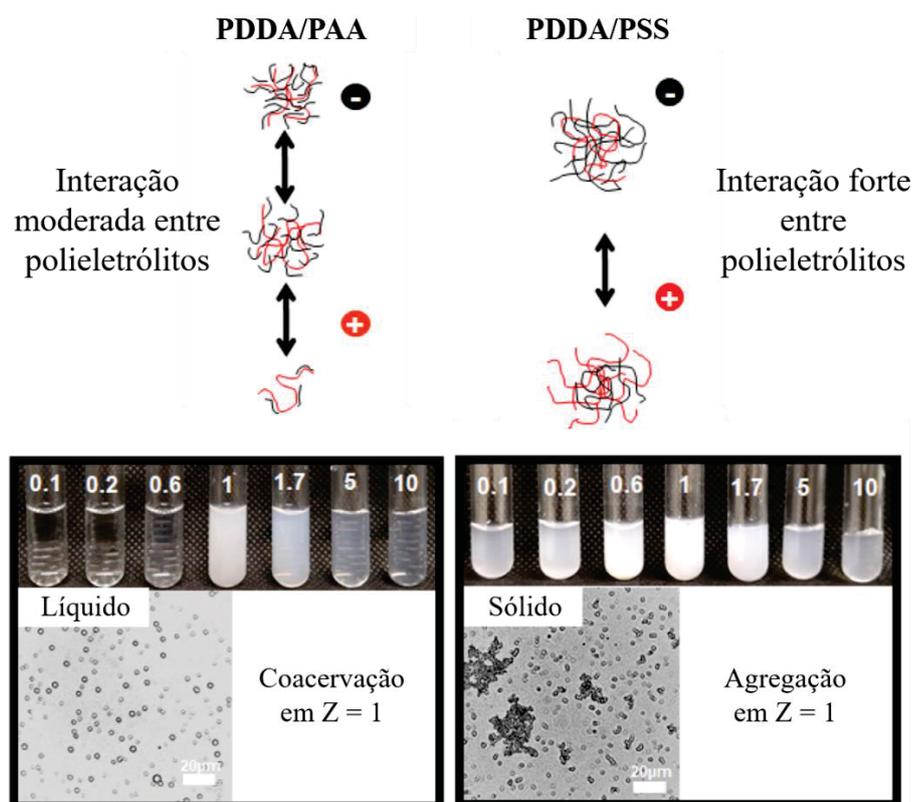


Figura 5. PECs de cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) e ácido poliacrílico (PAA), à esquerda, apresentam características de líquido, enquanto de PDDA com ácido poli(4-estireno sulfônico) (PSS), à direita, apresentam aspecto de sólido. Em ambos, o poliânion está indicado em preto e o polication em vermelho, e acima dos tubos de ensaio, estão representados os valores de Z ($[-]/[+]$) Fonte: Adaptado de [22].

2.4 Pectina cítrica

A pectina cítrica (PC) é obtida industrialmente a partir de resíduos alimentícios como cascas e bagaço de frutas cítricas como o maracujá, maçã e abacaxi [23]. A obtenção da pectina pode ser feita por métodos convencionais de extração, com auxílio de ácidos, bases e agentes quelantes, como também por métodos de tecnologia mais avançada, com enzimas, ultrassonicação, alta pressão, entre outros [24]. A pectina extraída da casca do maracujá tem destaque no contexto brasileiro, uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial dessa fruta, segundo o censo do IBGE de 2022. Com a produção de maracujá em 2022 atingindo quase 700 mil toneladas, e considerando que a casca representa aproximadamente 50% do peso da fruta [25], é evidente que há uma abundância de matéria-prima disponível para a produção de pectina de maracujá.

A pectina é um polímero natural que faz parte da composição primária da parede celular de plantas, juntamente da celulose e hemicelulose. Trata-se de um polissacarídeo cuja estrutura complexa confere propriedades bioquímicas importantes para funções biológicas, além de ser elemento chave na estrutura das plantas [26]. A estrutura química desse polissacarídeo pode ser resumida em três regiões em ordem de contribuição para a estrutura (Figura 6 A): homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (RG-II). A região HG corresponde a maior parte da pectina, e é constituída de cadeia homopolimérica sem ramificações de unidades de ácido D-galacturônico (GalA) conectadas através de ligações α -1,4 glicosídicas (Figura 6 B). A região RG-I é composta de cadeia principal de dissacarídeos (GalA e ramnose) altamente ramificada com glucanas, enquanto a RG-II possui o mesmo esqueleto que a HG (unidades repetidas de GalA) ligado à uma variedade de heterooligossacarídeos [23].

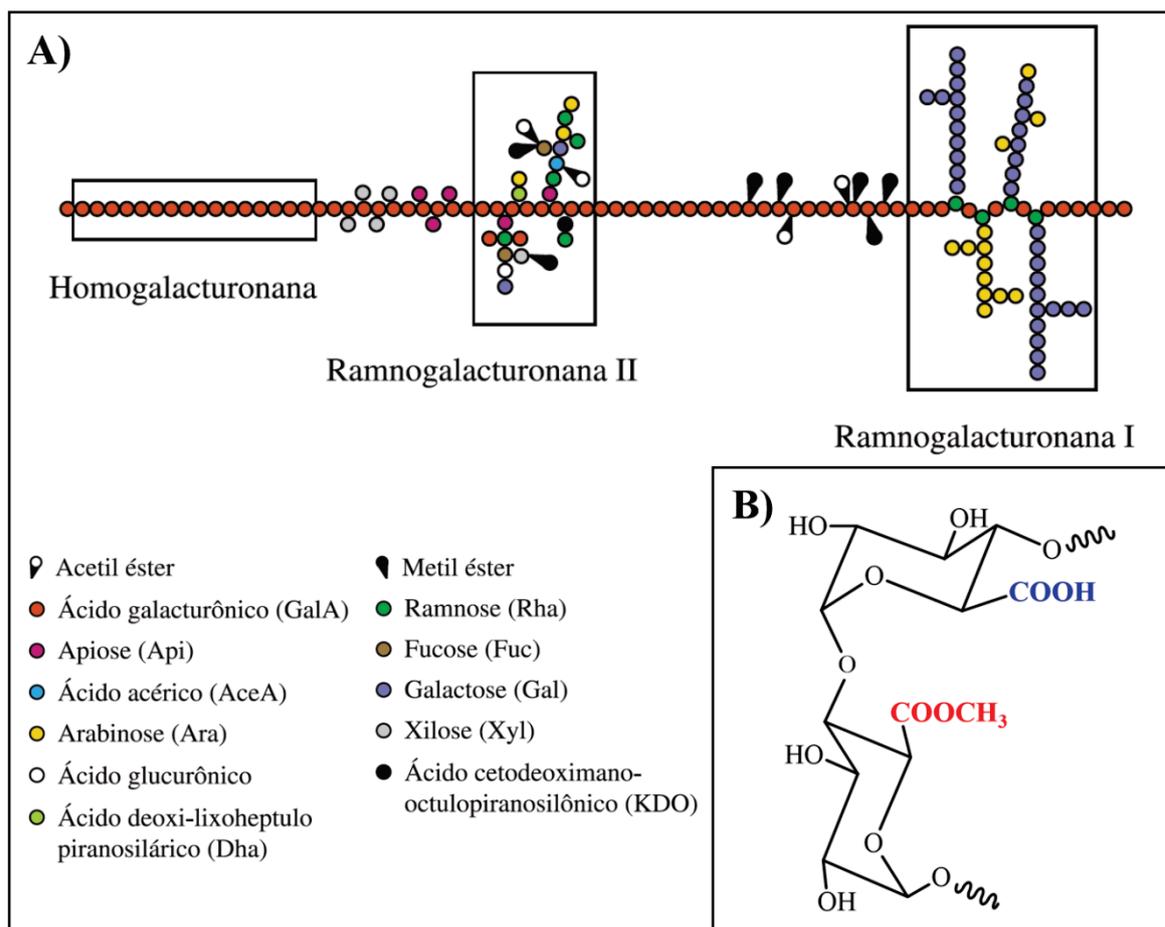


Figura 6. Estrutura química da pectina cítrica: A) representação convencional da cadeia pécica, onde os círculos vermelhos representam unidades de GalA e os restantes as ramificações. Fonte: Adaptado de [23]. B) unidades de ácido D-galacturônico (GalA) com metil esterificação. Fonte: A Autora, 2024.

A presença de grupos hidroxila e carboxila conferem caráter hidrofílico à pectina. Em dispersão aquosa, esse polímero adquire carga negativa quando as carboxilas são desprotonadas em pH acima de seu pKa, cujo valor é de aproximadamente 3,5, referente ao monômero GalA [27]. Como as carboxilas na estrutura da pectina podem estar metil esterificadas, o grau dessa substituição vai influenciar a densidade de carga negativa, o que impactará diretamente as propriedades físico-químicas do polímero [28,29]. Pectinas são classificadas de acordo com o grau de substituição como: *low methoxyl pectin* ou LMP, com a maioria dos grupos carboxila não substituídos (>50% de grupos -COOH); ou como *high methoxyl pectin* ou HMP, que são pectinas predominantemente metil esterificadas (>50% de grupos -COOCH₃). A composição estrutural dessa macromolécula - conteúdo de ácido galacturônico, grau de esterificação e composição de açúcares - é dependente da matéria prima fonte de pectina e do método de extração utilizado para obtê-la [26]. Essas características do polissacarídeo afetam suas propriedades físico-químicas, portanto a preferência por pectinas LMP ou HMP, de maior ou menor massa molar, será definida pela aplicação desejada para o polímero [30].

A conformação das cadeias de pectina e seu comportamento em dispersão aquosa são derivados de sua composição química, que constitui a estrutura primária do polímero. Enquanto a estrutura primária é mantida por ligações covalentes, as estruturas secundária, terciária e quaternária da pectina resultam das interações intra- e intermoleculares não covalentes entre os grupos funcionais do polímero, bem como da presença de contra-íons ou agentes reticulantes [31]. As condições do meio, onde estão inseridas moléculas de pectina, afetam sua conformação regulando as forças intermoleculares. A Figura 7 traz uma representação das possíveis conformações que as cadeias de pectina podem assumir. Na condição de $\text{pH} > \text{pKa}$ do ácido galacturônico, a ionização dos grupos COOH gera uma carga negativa nas cadeias de pectina, causando repulsão eletrostática que as mantém separadas e estendidas. Assim, as moléculas tendem a assumir a conformação de *random coil* (novelo aleatório) expandido, se houver uma boa interação com o solvente. Já em $\text{pH} < \text{pKa}$, a repulsão é minimizada, e as cadeias poliméricas podem adotar outras conformações menos estendidas. As hélices são estruturas secundárias mais ordenadas, formadas a partir de interações entre monômeros da mesma cadeia, principalmente entre grupos ésteres e carboxilas. Estruturas secundárias dão origem às estruturas terciárias, mais complexas tridimensionalmente, e, por fim, às estruturas quaternárias, que são formadas da agregação de múltiplas cadeias. Em altas concentrações, a pectina é capaz de formar redes poliméricas e, quanto maior a concentração de polímero, mais emaranhadas se tornam as cadeias [31,32].

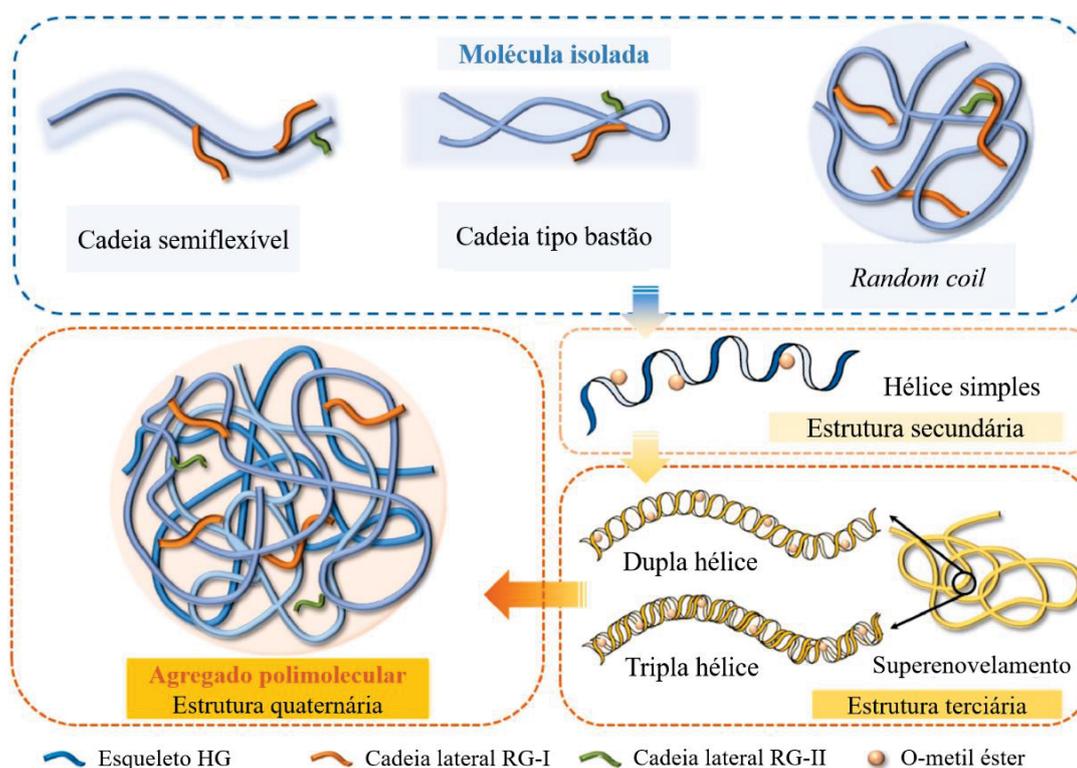


Figura 7. Conformações da pectina. Fonte: Adaptado de [31].

Por ser um polímero abundante, biocompatível e biodegradável, a pectina é amplamente explorada em aplicações biomédicas, farmacêuticas e alimentícias. Materiais à base de pectina podem ser produzidos com propriedades variadas, de acordo com as exigências de cada aplicação. Filmes de pectina, por exemplo, são empregados na produção de embalagens e revestimentos alimentícios. Nessa função, tais materiais ajudam a prevenir a oxidação e a contaminação por patógenos ao combinar a pectina com bioativos antibacterianos, preservando as propriedades nutricionais dos alimentos e prolongando sua vida útil [33]. Hidrogéis de pectina, por outro lado, são estruturas porosas capazes de absorver grandes quantidades de água em relação ao seu peso, sendo frequentemente utilizados na confecção de curativos. No Grupo de Macromoléculas e Interfaces da UFPR, hidrogéis foram desenvolvidos para uso como fase extratora, avaliando a diferença entre diferentes pectinas [34]. Além disso, esses materiais podem incorporar fármacos, enzimas e outros bioativos para controle da liberação dessas substâncias no organismo, conferindo propriedades cicatrizantes [35].

A gelificação, ou seja, a transição de líquido para gel (sol-gel), da pectina é um processo amplamente empregado no desenvolvimento desses materiais. Esse processo baseia-se na reticulação das moléculas de pectina, que estrutura as cadeias poliméricas em uma rede tridimensional. Métodos de reticulação física se dão através de interações não covalentes – eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas – conferindo caráter reversível à reticulação. Micropartículas, hidrogéis e filmes podem ser obtidos por esse processo, que pode ser induzido tanto por cátions metálicos [36] quanto por polieletrólitos catiônicos [37], atuando como agentes reticulantes. A gelificação química da pectina também é possível, o que acontece através da criação de ligações covalente entre as cadeias poliméricas. Isso pode ser feito introduzindo reagentes que interagem com sítios específicos da estrutura da pectina, modificando-a, por mecanismos de radical livre e copolimerização, por exemplo [38].

Além dos hidrogéis, cápsulas e filmes poliméricos, os complexos polieletrólíticos representam outra classe de materiais que podem ser desenvolvidos com a pectina. A complexação polieletrólítica é um processo vantajoso por ser simples e eficiente, realizado pela combinação da pectina com polieletrólitos catiônicos em meio aquoso, dispensando o uso de solventes orgânicos ou condições agressivas. A associação da pectina com outros polímeros naturais, como quitosana e gelatina, demonstrou excelente capacidade de formar filmes, hidrogéis e coacervados capazes de aprisionar compostos hidrofílicos e promover a liberação modulada de ativos conforme alterações nas condições do meio em que estão

inseridos [39]. A incorporação de materiais inorgânicos, como argilas, também tem ampliado as propriedades desses sistemas, conferindo maior capacidade de absorção de água e estabilidade estrutural [40]. Além de proteger os compostos encapsulados contra degradação, os PECs de pectina podem estender a estabilidade, tempo de validade de bioativos e mascarar odores, o que os torna promissores para aplicações em áreas como alimentos, cosméticos e farmacêutica [41,42].

2.5 Poli(etilenoimina)

A poli(etilenoimina) (PEI) é um polímero sintético com estrutura química constituída de aminas conectadas por etilenos. Suas cadeias podem apresentar diferentes graus de ramificação dependendo da rota sintética utilizada, desde lineares, com aminas primárias e secundárias, até altamente ramificadas, com aminas primárias, secundárias e terciárias [43], como ilustra a Figura 8. A PEI linear apresenta uma estrutura mais regular e, por isso, o empacotamento das moléculas é mais eficiente que de cadeias ramificadas. Um melhor empacotamento implica em disposição mais ordenada das moléculas, formando-se regiões cristalinas que conferem à PEI linear maior ponto de fusão que da PEI ramificada, cujo empacotamento não é tão eficiente. Ajustando o processo de polimerização, são produzidas moléculas de PEI com massa molar de 800 a 1.000.000 g mol⁻¹.

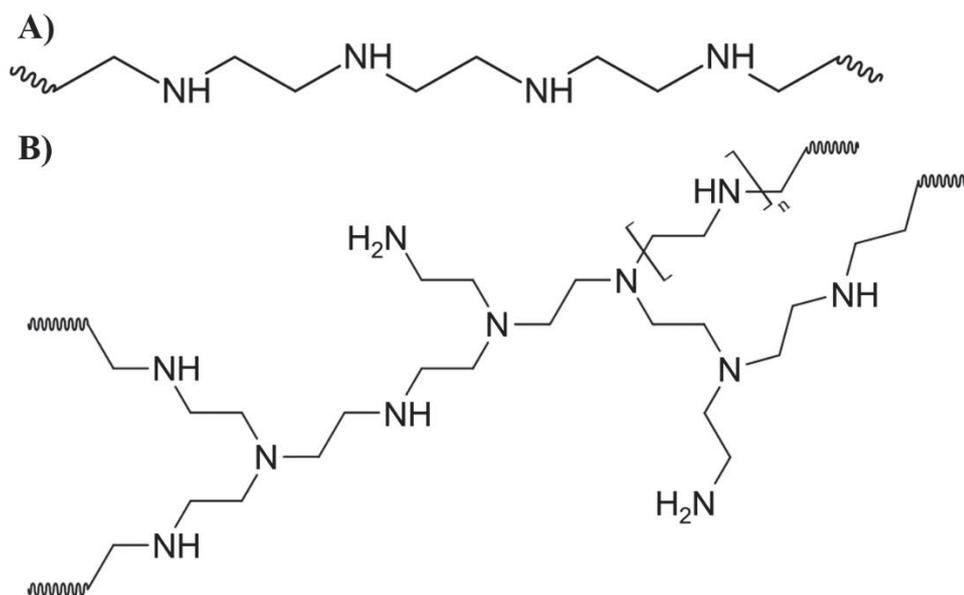


Figura 8. Estrutura química da poli(etilenoimina). Fonte: A Autora, 2024.

Titulações potenciométricas desse polieletrólito mostram que o pKa das aminas é dependente da massa molar das cadeias, de serem lineares ou ramificadas e da força iônica do meio no qual foi dispersa [43,44]. Aminas primárias, secundárias e terciárias estão

inseridas em diferentes ambientes químicos, sofrendo efeito dos grupos locais na sua proximidade. Aminas menos substituídas apresentam maior caráter ácido e a desprotonação de grupos $R-NH_3^+$ (R = cadeia carbônica) tende a ser mais fácil por serem mais acessíveis, resultando na ordem: $pK_a (1^{as}) < pK_a (2^{as}) < pK_a (3^{as})$ [45]. O grau de ionização das moléculas pode influenciar a conformação adotada pela PEI, o que foi discutido no trabalho de Jain e colaboradores [46]. Os autores estudaram a automontagem da PEI em partículas esféricas, atribuindo esse comportamento à atração entre regiões protonadas e desprotonadas, distribuídas ao longo das moléculas, por meio de interações hidrofóbicas intra- e intermoleculares.

Por ser um polícatión, a PEI tem capacidade de interagir eletrostaticamente com outras macromoléculas negativamente carregadas, possibilitando a automontagem de complexos muito estudados no campo da terapia genética. Nesse contexto, o controle de doenças humanas é proposto através da regulação da expressão de genes introduzindo um novo material genético para dentro das células. A PEI é utilizada no preparo de agente transportador de material genético, formando poliplexos (complexos poliméricos) a partir da atração eletrostática entre seus grupos amino e grupos fosfato de ácidos nucleicos [47]. Poliplexos de PEI são desenvolvidos de maneira que o material genético seja compactado e protegido de degradação. A PEI ramificada, devido à sua maior capacidade de tamponamento, favorece a liberação do material genético transportado, aumentando a eficiência da transfecção gênica – processo de introdução do material genético na célula. Isso ocorre porque, ao entrar na célula (endocitose), o poliplexo é incorporado por vesículas endossomais, cujo ambiente ácido induz a protonação da PEI. Esse efeito leva à desestabilização e ruptura do endossomo, permitindo a liberação do material genético no citoplasma [48,49].

O uso da PEI na produção de poliplexos de alta massa molar leva a melhores taxas de transfecção gênica, no entanto, apresentam maior citotoxicidade. A questão da biocompatibilidade é um desafio para a utilização da PEI, visto que a densidade de carga positiva é capaz de desestabilizar e até romper a membrana plasmática das células [50]. Por esse motivo, modificações são realizadas nas cadeias de PEI a fim de blindar os grupos amino, ligando covalentemente à poli(etilenoglicol), polissacarídeos, anticorpos, ciclodextrinas, entre outros [49]. A funcionalização da PEI com açúcares, por exemplo, diminui significativamente sua citotoxicidade e aumenta a captação celular em células cancerígenas [51]. Outra maneira de minimizar a toxicidade da PEI é através da combinação com polímeros naturais. No trabalho de Zhao e colaboradores [52], poliplexos de DNA e

quitosana, um polissacarídeo derivado da extração de quitina do exoesqueleto de crustáceos, e revestidos com PEI para aprimorar a transfecção gênica não apresentaram citotoxicidade nos ensaios empregados.

3. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo geral compreender a influência de diversos fatores experimentais nas propriedades de complexos polieletrólíticos formados entre a pectina cítrica (PC) e a poli(etilenoimina) (PEI) ramificada. Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Conhecer as características estruturais e físico-químicas dos polímeros utilizados;
- Determinar, através de experimentos exploratórios, em quais condições é possível verificar a formação de complexos de PC e PEI;
- Avaliar a influência da concentração salina, pH e proporção mássica PEI:PC na formação de complexos;
- Avaliar a estabilidade dos complexos formados.

Com isso, busca-se aprofundar a compreensão dos fatores que governam a formação de complexos polieletrólíticos de PC e PEI, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre complexação polieletrólítica. Destaca-se, em particular, a influência das condições do meio na formação e estabilidade desses complexos, aspecto crucial para a aplicação de polieletrólitos no desenvolvimento de materiais poliméricos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os polímeros utilizados nesse trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich®: pectina cítrica (P9135 - *pectin from citrus peel*), com 83% (m m⁻¹) de ácido galacturônico, grau de esterificação de 58% e M_w de 485.000 g mol⁻¹ [53]; e poli(etilenoimina) ramificada, M_n ~1.200 g mol⁻¹ e M_w ~1.300 g mol⁻¹, concentração de 50% m v⁻¹ em H₂O.

Todos os reagentes que foram utilizados são de alto grau de pureza, sendo eles: brometo de potássio (FT-IR grade, ≥99% *trace metals basis*), ácido D-(+)-galacturônico e fenol da Sigma-Aldrich®; cloreto de potássio (74,56 g mol⁻¹), hidróxido de sódio (40,00 g mol⁻¹) e biftalato de potássio PA (204,22 g mol⁻¹) da Biotec; fosfato de sódio dibásico anidro

(141,96 g mol⁻¹), fosfato de potássio monobásico anidro (136,09 g mol⁻¹) e ácido sulfúrico 95-97% v v⁻¹ da Synth; cloreto de sódio (58,44 g mol⁻¹) da Exodo Científica; ácido clorídrico 37% v v⁻¹ da Química Moderna.

Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura com resistividade controlada em 18,2 MΩ cm⁻¹, purificada pelo sistema Millipore-Simplicity UV (Bedford, MA, USA).

4.2 Purificação e caracterização dos polímeros

A purificação da pectina comercial (PC_{com}) foi feita através de diálise da dispersão polimérica contra água ultrapura. Esse processo é importante para eliminar resíduos de açúcares, fragmentos de cadeia curta e outras impurezas presentes na pectina cítrica, a fim de obter amostra mais homogênea de polímero. A dispersão de 5% (m v⁻¹) foi preparada em água ultrapura e deixada sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24 h antes de ser colocada em membrana Spectra/Por® 1 com corte de peso molecular (MWCO) de 6.000 a 8.000 g mol⁻¹. Foram realizadas trocas da água de diálise 3 vezes ao dia durante 2 a 3 dias, até estabilização da condutividade do banho. Em seguida, a dispersão polimérica foi transferida para uma placa da petri, congelada com nitrogênio líquido e, por fim, liofilizada por aproximadamente 30 h a -54°C. Em todos os experimentos utilizou-se apenas a pectina purificada (PC), que foi armazenada em local livre de umidade a temperatura ambiente.

A massa molar (M_w) da PC foi obtida pela técnica de cromatografia de exclusão por tamanho de alta pressão (HPSEC-MALLS-RI). Uma dispersão de pectina na concentração 1 mg mL⁻¹ foi preparada em solução de NaNO₂ 0,1 mol L⁻¹ e azida de sódio 0,2 mg mL⁻¹, também utilizada como fase móvel na mesma concentração. A dispersão de PC foi filtrada antes da análise utilizando filtros de Nylon da Kasvi com tamanhos de poros normais de 0,22 μm. As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em cromatógrafo HPSEC com quatro colunas em série com limites de exclusão (7×10⁶ Da, 4×10⁵ Da, 8×10⁴ Da e 5×10³ Da) (Ultrahydrogel, Waters). O cromatógrafo possui detectores de índice de refração diferencial (RI), modelo WATERS 2410 e um detector de espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais acoplados em série. A massa molar ponderal média (M_w) das pectinas foi calculada utilizando Software ASTRA versão 4.70.07®, utilizando o valor de incremento do índice de refração (dn/dc) de 0,147 mL g⁻¹ previamente calculado para pectinas comerciais [54].

A estrutura química dos polímeros foi caracterizada através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Amostras de pectina cítrica da Sigma-

Aldrich® sem purificação (PC_{com}), pectina purificada por diálise (PC) e de poli(etilenoimina) (PEI) foram misturadas em 100 mg de KBr para formação de pastilhas. Os espectros de transmissão das pastilhas foram registrados na faixa de comprimento de onda 4000-400 cm⁻¹ usando o Espectrômetro FT-IR ALPHA II da Bruker, localizado no Departamento de Química da UFPR.

As constantes de dissociação ácida (pKa) dos polímeros PC e PEI foram determinadas por meio de titulações potenciométricas ácido-base, nas quais o agente titulante foi adicionado à dispersão polimérica para promover a desprotonação dos grupos NH₃⁺ da PEI e COOH da PC. Inicialmente, dispersões de PC 0,2% (m v⁻¹) e PEI 0,02% (m v⁻¹) foram preparadas com solução de NaCl 10 mmol L⁻¹ em água ultrapura e deixadas sob agitação por 24 h. Um volume de 15 mL de dispersão de PC, eletrodo e sensor de temperatura do pHmetro foram adicionados ao reator acoplado a um banho termostatizado, que manteve a temperatura do sistema entre 25 e 26°C. Uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, previamente padronizada com solução de biftalato de potássio, foi utilizada como titulante para a dispersão de PC. As soluções de titulante e de titulado foram borbulhadas com N₂ durante 5 min para garantir a remoção de resíduos de CO₂ e imediatamente utilizadas. Uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ foi adicionada na dispersão de PC até atingir aproximadamente pH 2. Alíquotas de titulante foram adicionadas sob agitação magnética, que permaneceu ligada durante 30 s e, em seguida, em repouso por 30 s para estabilização. O pH foi lido após estabilização e novas alíquotas foram adicionadas alterando o volume de acordo com o necessário para registrar alterações de pH com degraus de 0,1. Experimentos análogos foram realizados com a dispersão de PEI, utilizando NaOH 5% (m v⁻¹) para aumentar pH até aproximadamente 12 e, como titulante, uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹. Todas as titulações foram realizadas em triplicata.

As curvas de pH em função do volume de titulante foram plotadas no software OriginPro 2021. A derivada segunda das curvas foi calculada para determinar o ponto estequiométrico da titulação, encontrado no ponto de inflexão do gráfico. O valor de pKa equivale ao pH da dispersão onde o volume de titulante é igual à metade do volume do ponto estequiométrico. É importante ressaltar que os valores de pKa dos polieletrólitos são dependentes da concentração de polímero e de sal presentes na dispersão que está sendo titulada.

O grau de esterificação (GE) da pectina foi determinado segundo descrito por Pan e colaboradores [55], através dos espectros de FTIR. A partir das áreas das bandas correspondentes aos grupos carboxílico metil esterificado (próximo de 1750 cm⁻¹ -

COOCH₃) e não esterificado (próximo de 1630 cm⁻¹ -COOH), a Equação 2 foi utilizada para calcular o GE. As áreas das bandas foram determinadas no software OriginPro 2021.

$$GE = \left[\frac{\text{Área } 1750 \text{ cm}^{-1}}{(\text{Área } 1750 \text{ cm}^{-1} + \text{Área } 1630 \text{ cm}^{-1})} \right] \times 100\% \quad (2)$$

O potencial zeta e tamanho (diâmetro hidrodinâmico) das dispersões de PC 0,2% (m v⁻¹) preparada em PBS 10 mmol L⁻¹ (pH 5) e de PEI 0,02% (m v⁻¹) em PBS 10 mmol L⁻¹ (pH 5, corrigido com HCl 1 mol L⁻¹) foram medidos através de técnicas de espalhamento de luz que serão descritas no item 4.4.

4.3 Preparo dos complexos de PC e PEI

4.3.1 Avaliação do método de adição

Segundo o estudo de da Silva e colaboradores [56], as propriedades dos complexos polieletrólíticos são influenciadas pela velocidade e a ordem de adição de uma dispersão polimérica à outra. Portanto, a coacervação complexa de PC e PEI foi investigada, inicialmente, em função do método de mistura dos polímeros: adição lenta a 100 μL min⁻¹ com a bomba de seringa sob agitação magnética (500 rpm) e adição rápida com mistura no vórtex.

Dispersões de PC 0,2 % (m m⁻¹) e PEI 0,2% (m m⁻¹) foram preparadas em água ultrapura e deixadas sob agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente. As dispersões de PC e PEI foram preparadas de modo que a concentração final de polímero nas misturas fosse de aproximadamente 2 mg mL⁻¹. Essa escolha, baseada em estudos da literatura [41,56], visa manter a concentração baixa o suficiente para evitar a reticulação macroscópica dos polímeros, favorecendo a formação de estruturas coloidais. Assim, volumes iguais de PC e PEI foram misturados através de dois métodos de agitação, como ilustrado na Figura 9. O método do vórtex se trata da adição rápida de 50 μL das dispersões com agitação no vórtex durante 1 min, enquanto o método da bomba de seringa consiste na adição lenta de 1 mL das dispersões a 100 μL min⁻¹ controlada por bomba de seringa, sob agitação magnética a 500 rpm, a qual foi mantida durante 30 min após término da adição. Nos dois métodos foram aplicadas as ordens de adição PC/PEI (PC adicionada à PEI) e PEI/PC (PEI adicionada à PC).

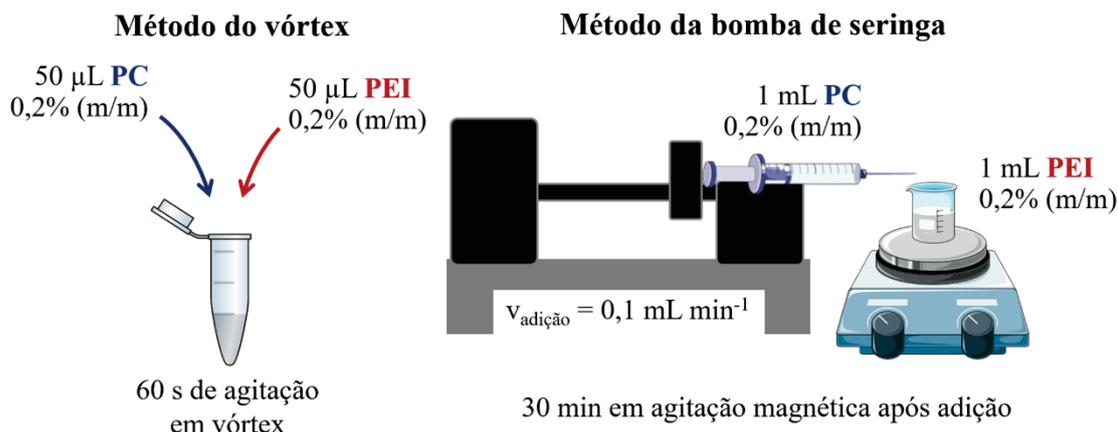


Figura 9. Esquema dos métodos utilizados para complexação de PC e PEI. Fonte: A Autora, 2024.

4.3.2 Avaliação da força iônica

Dispersões de PC 0,2 % (m m⁻¹) e PEI 0,2% (m m⁻¹) foram preparadas em água ultrapura e em soluções de KCl 1, 10 e 100 mmol L⁻¹, deixadas em agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as dispersões foram combinadas por adição a 0,2 mL min⁻¹ (método da bomba de seringa), sob agitação magnética de 500 rpm. Após término da adição, as dispersões foram mantidas sob agitação leve por mais 30 min. As adições foram feitas na ordem PC à PEI (PC/PEI) e PEI à PC (PEI/PC). A força iônica foi calculada utilizando a Equação 3 [57], onde [K⁺] e [Cl⁻] são as concentrações molares de potássio e cloreto, respectivamente. Por se tratam de eletrólitos de carga simples (1, em módulo), a força iônica é igual a sua concentração molar total.

$$\text{Força iônica} = \mu = \frac{1}{2} ([K^+](1)^2 + [Cl^-](-1)^2) \quad (3)$$

4.3.3 Avaliação do pH

A PC é um polímero com grupos de ácido carboxílico que são desprotonados a medida em que o valor de pH aumenta, gerando grupos COO⁻ negativamente carregados. A PEI, por outro lado, possui aminas em sua estrutura que podem ser protonadas, adquirindo carga positiva (NH₃⁺) com a diminuição do pH. Dessa forma, deve existir um valor de pH ideal para coacervação, intermediário entre o pK_a dos dois polímeros, onde se tem majoritariamente moléculas carregadas.

Essa condição pode ser prevista determinando o grau de ionização dos grupos carboxila e amina (COO⁻ na PC e NH₃⁺ na PEI) a partir do pK_a dos polieletrólitos, plotando um gráfico de distribuição das espécies em função do pH. Aqui, assumiu-se que ambas PC

e PEI se comportam como ácidos fracos com apenas um tipo de hidrogênio, ou seja, apenas um valor de pKa. Ao realizar a titulação potenciométrica dos polímeros (item 4.2), foi verificado, através do cálculo da segunda derivada, que a PC possui só um valor de pKa, enquanto a PEI apresentou mais de um valor. No entanto, considerou-se apenas o primeiro pKa, pois, em valores de $pH < pKa_1$, garante-se que a PEI está majoritariamente protonada. Assim, os pHs das dispersões poliméricas podem ser descritos pela equação de Henderson-Hasselbalch (Equações 4 e 5):

$$PC - COOH \rightleftharpoons PC - COO^- + H^+ \quad PEI - NH_3^+ \rightleftharpoons PEI - NH_2 + H^+$$

$$pH = pKa + \log \frac{[PC - COO^-]}{[PC - COOH]} \quad (4) \quad pH = pKa + \log \frac{[PEI - NH_2]}{[PEI - NH_3^+]} \quad (5)$$

A partir disso, as frações ionizada e não ionizada da PC (Equações 3.1 e 3.2) e da PEI (Equações 4.1 e 4.2) podem ser calculadas:

$$\chi_{PC-COO^-} = \frac{1}{1 + 10^{(pKa_{PC} - pH)}} \quad (4.1) \quad \chi_{PEI-NH_3^+} = \frac{1}{10^{(pH - pKa_{PEI})} + 1} \quad (5.1)$$

$$\chi_{PC-COOH} = 1 - \chi_{PC-COO^-} \quad (4.2) \quad \chi_{PEI-NH_2} = 1 - \chi_{PEI-NH_3^+} \quad (5.2)$$

Nessa etapa do projeto, foram utilizados valores encontrados na literatura de $pKa_{PC} = 3,5$ [27] para a PC e $pKa_{PEI} = 7,6$ para a PEI [44]. A PEI ramificada possui aminas terciárias, secundárias e primárias, mas, para essa determinação, considerou-se apenas o pKa aparente. Esse é o valor definido como o pH no ponto de meia neutralização e depende da massa molar do polímero [44]. Conforme representado na Figura 10, a região apontada pela barra azul delimita a faixa de pH onde há maior disponibilidade das espécies PC-COO⁻ e PEI-NH₃⁺. Essa região de quantidade máxima de grupos ionizados deve ser a condição ótima de pH para formação dos coacervados [4].

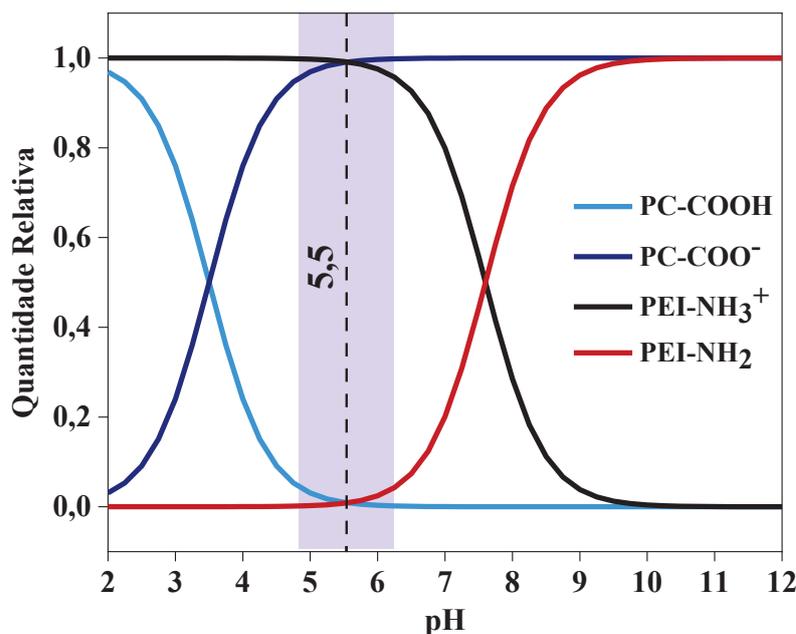


Figura 10. Perfil de distribuição das espécies carregadas e neutras de PC e PEI em função do pH. Fonte: A Autora, 2024.

Experimentos controlando o pH foram realizados para avaliar o efeito dessa condição na complexação entre PC e PEI. Dispersões poliméricas foram preparadas a 0,2% (m v⁻¹) utilizando solução de KCl 10 mmol L⁻¹ como solvente. As amostras foram preparadas usando o método da bomba de seringa, adicionando os polímeros na proporção mássica 1:1 e alterando a ordem de adição (PC/PEI e PEI/PC), e adicionando as dispersões poliméricas uma na outra rapidamente. As dispersões foram acidificadas adicionando solução de HCl 1 mol L⁻¹. Os experimentos foram conduzidos de três formas:

- O pH das dispersões foi ajustado antes da adição lenta sob agitação magnética dos polímeros com fluxo controlado de 0,2 mL min⁻¹ (amostras com índice “a”);
- O pH das dispersões foi ajustado após adição lenta sob agitação magnética dos polímeros com fluxo controlado de 0,2 mL min⁻¹ (amostras com índice “d”);
- O pH das dispersões foi ajustado após adição rápida dos polímeros (amostras com índice “r”).

Também foram preparadas amostras controle sem ajuste de pH para comparação, aplicando o método de adição lenta e rápida. Posteriormente, para melhor controle do pH, foi também utilizado como solvente o tampão PBS nos métodos (a) e (c) mencionados acima. As amostras denominadas com índice “PBS” produzidas em tampão foram comparadas com as produzidas em solução de KCl. O tampão PBS de pH 5,2 a 10 mmol L⁻¹ foi preparado adicionando-se 0,3230 g de KH₂PO₄ e 0,0054 g de Na₂HPO₄ em 250 mL de água ultrapura.

O pH das dispersões poliméricas em PBS também foi ajustado com HCl 1 mol L⁻¹ quando necessário.

4.3.4 Avaliação da proporção entre polímeros na complexação

Para avaliar como a proporção entre os polímeros PC e PEI afeta a formação de complexos, foi realizada uma titulação condutométrica que consistiu em titular uma dispersão de PC com uma dispersão de PEI acompanhando a condutividade da dispersão titulada.

Foram preparados 20 mL de PC 0,2% (m v⁻¹) e 50 mL de PEI 0,02% (m v⁻¹) em tampão PBS 10 mmol L⁻¹ com pH 5,2. As dispersões foram deixadas sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24 h. Após agitação, 250 µL de HCl 1 mol L⁻¹ foram adicionados a dispersão de PEI para atingir pH 5. A dispersão de PC foi transferida para um béquer com célula condutométrica (914 pH/DO/condutômetro da Metrohm®) e, então, alíquotas da dispersão de PEI foram adicionadas sob agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente de 23°C. Aguardaram-se 30 s sob agitação após cada adição da dispersão de PEI e depois mais 30 s em repouso para anotar o valor de condutividade.

Os complexos formados na titulação foram caracterizados preparando isoladamente amostras para análise do aspecto visual, potencial zeta, tamanho e rendimento, como será descrito no item hee4.4. As dispersões de PC e PEI foram preparadas de maneira semelhante à titulação; os volumes necessários de PEI foram adicionados gota a gota, com auxílio de micropipeta, na dispersão de PC sob agitação magnética (500 rpm). A agitação foi desligada após 5 min e o potencial zeta e tamanho das amostras foi medido no mesmo dia do preparo. Os volumes foram calculados de maneira que a concentração dos polímeros nas amostras fosse igual à dos pontos da titulação selecionados para análise. Por exemplo, o ponto 1 da titulação tem proporção mássica PEI/PC = 0,005 e concentrações finais de [PC] = 0,1890% (m v⁻¹) e [PEI] = 0,0010% (m v⁻¹) - esses parâmetros foram reproduzidos no preparo da amostra 1. A proporção entre os polímeros foi calculada conforme a Equação 6, na qual V_{PEI} e V_{PC} são os volumes totais (mL) das alíquotas de PEI e da dispersão de PC, respectivamente:

$$\text{Proporção mássica} \frac{PEI}{PC} = \frac{V_{PEI} \times [PEI]}{V_{PC} \times [PC]} \quad (6)$$

As proporções mássicas serão representadas de forma simplificada por valores de PEI:PC, isto é, 1:1 no caso em que massa da PEI = massa da PC, ou 1:2 quando a massa da PEI =

(massa da PC)/2. A Tabela 1 traz a representação de todas as amostras preparadas isoladamente.

Tabela 1. Identificação das amostras com diferentes proporções de PEI para PC.

| Amostras | Proporção mássica PEI/PC | Representação PEI:PC (m/m) | Z (+/-) |
|----------|--------------------------|----------------------------|---------|
| 1 | 0,0050 | 1:189 | 0,05 |
| 2 | 0,0126 | 1:76 | 0,1 |
| 3 | 0,0227 | 1:42 | 0,2 |
| 4 | 0,0343 | 1:28 | 0,3 |
| 5 | 0,0454 | 1:21 | 0,4 |
| 6 | 0,0570 | 1:17 | 0,5 |
| 7 | 0,0721 | 1:13 | 0,6 |
| 8 | 0,0873 | 1:12 | 0,8 |
| 9 | 0,1115 | 1:9 | 1,0 |
| 10 | 0,1286 | 1:8 | 1,2 |
| 11 | 0,1428 | 1:7 | 1,3 |
| 12 | 0,2012 | 1:5 | 1,8 |
| 13 | 0,2512 | 1:4 | 2,3 |
| 14 | 0,3013 | 1:2 | 3,6 |

A Tabela 1 também inclui a representação das diferentes proporções poliméricas com relação a razão de cargas Z (+/-). Para calcular essa razão, considerou-se a carga em 1 mol de polímero, admitindo que cada monômero contribui com carga que vale +1 para a PEI, ou (-1)×GE para a PC, levando em conta seu grau de esterificação (GE). A razão de cargas PEI/PC foi calculada como descrito nas Equações 7 a 9, onde $\chi_{ionizada}$ é a fração ionizada do polímero (Equações 4.2 e 5.2) no pH trabalhado.

$$Carga\ em\ 1\ mol = \frac{Massa\ molar\ do\ polímero}{Massa\ molar\ do\ monômero} \times Carga\ do\ monômero \quad (7)$$

$$Carga\ do\ polímero = \chi_{ionizada} \times n^o\ de\ mols\ do\ polímero \times Carga\ em\ 1\ mol \quad (8)$$

$$Razão\ das\ cargas = Z = \frac{Carga\ da\ PEI}{Carga\ da\ PC} \quad (9)$$

A estabilidade no tempo de complexos com diferentes proporções poliméricas também foi avaliada. Amostras foram preparadas em duplicada e deixadas em repouso durante 168 h, sob temperatura ambiente média de 21°C. As amostras foram analisadas por meio da observação do aspecto visual por fotografias e caracterizadas por FTIR, potencial zeta e MEV, como será descrito no item 4.4.

4.4 Caracterização dos complexos de PC e PEI

Os produtos resultantes da mistura de PC e PEI foram avaliados quanto ao seu aspecto macroscópico, bem como por meio de imagens capturadas utilizando um microscópio óptico Olympus CH30. A observação das partículas por microscopia óptica foi definida como critério para determinar a viabilidade da formação dos coacervados, e também para identificar as condições ideais de coacervação. O tamanho das partículas nas imagens foi determinado utilizando o software ImageJ.

A transmitância também foi utilizada como parâmetro para determinar se a complexação entre PC e PEI foi eficiente. Para isso, foram obtidos espectros de transmitância na faixa de 200 a 800 nm em espectrômetro UV-Vis Cary 60.

Para análises de rendimento e da estrutura química dos complexos, alíquotas de 2 mL de cada amostra foram transferidas para microtubos do tipo *ependorf* de 2,0 mL previamente pesados e, então, centrifugadas a 13400 rpm durante 25 min. O sobrenadante foi armazenado em azida de sódio 200 ppm e o precipitado foi seco à temperatura ambiente em dessecador selado a vácuo. Após 5 dias, os microtubos foram pesados novamente e os precipitados completamente secos foram analisados por FTIR. A fim de facilitar a observação das bandas de FTIR, os espectros dos complexos foram normalizados.

A eficiência da complexação foi avaliada pelo rendimento mássico, que foi determinado considerando a massa utilizada de polímeros no preparo e a massa de precipitado obtido na centrifugação das amostras com diferentes proporções PEI:PC. A eficiência também foi avaliada com relação à quantidade de PC presente nessas amostras, o que foi feito utilizando o método colorimétrico de Dubois para dosagem de carboidratos totais [58]. Esse método se baseia na quebra das cadeias polissacarídicas em unidades de monossacarídeo com ácido sulfúrico concentrado, e formação de compostos alaranjados derivados de furfural, os quais absorvem luz com máximo na região de 480 nm (para o ácido galacturônico), a partir da reação com fenol [59]. Por esse motivo, o método também é conhecido como fenol-ácido sulfúrico, e sua reação está representada com a molécula de glicose na Figura 11.

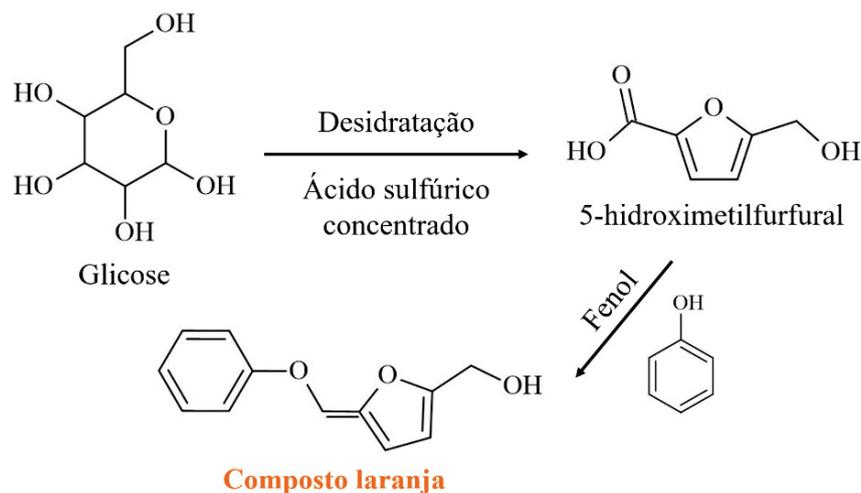


Figura 11. Reação do método de Dubois para quantificação de açúcares. Fonte: A Autora, 2025.

Para quantificação de um polissacarídeo, é preciso utilizar o monossacarídeo majoritário de sua composição como referência para construção de uma curva analítica, que relacionará a concentração de monossacarídeo com a absorvância em 480 nm. Portanto, para quantificação da PC, foi utilizado o ácido galacturônico (GalA) dissolvido em tampão PBS 10 mmol L^{-1} (pH 5) em 6 concentrações para obter 6 pontos na curva analítica em triplicata. Volumes de 0,5 mL de cada ponto da curva reagiram com 0,5 mL de fenol 5% (m v^{-1}) e foram agitados em vórtex. Posteriormente, adicionaram-se 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado, também seguido de agitação em vórtex. Então, aguardou-se aproximadamente 10 min para realizar varredura da absorvância de 200 a 800 nm, feita em espectrofotômetro UV-Vis Cary 60. A curva analítica foi construída com o valor de absorvância em 480 nm das 6 concentrações de GalA. O rendimento das amostras de complexação foi determinado reagindo alíquotas de 0,5 mL das amostras com fenol e H_2SO_4 como descrito, sendo diluídas em tampão PBS quando necessário para que o valor de absorvância em 480 nm ficasse dentro da curva analítica.

Os complexos de PC e PEI em diferentes proporções poliméricas foram caracterizados, além das técnicas já mencionadas, por espalhamento dinâmico de luz (DLS). A determinação de tamanho (D_h) e potencial zeta (ζ) foram realizadas no analisador Zetasizer Nano Series ZS modelo ZEN3600 do fabricante Malvern Instruments and PANalytical (Reino Unido) à 25°C . Os diâmetros hidrodinâmicos (D_h) foram obtidos com a emissão do laser em 633 nm, ângulo do fotodetector a 173° , com diluição de 5 ou 10 x das amostras em tampão PBS 10 mmol L^{-1} conforme necessário para melhorar o índice de polidispersão (PDI) das amostras. Valores de D_h foram expressos pela média \pm desvio padrão do pico de maior área na distribuição de intensidade e o potencial ζ média \pm desvio padrão da média das triplicatas.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia e composição química dos complexos de PC e PEI, no microscópio TESCAN VEGA3 LMU do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Amostras dos complexos nas proporções 1:44, 1:14 e 1:8, preparados para o estudo da estabilidade, foram gotejadas em fitas de cobre fixadas em suporte para MEV. Em seguida, as amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e, então, liofilizadas durante 4 h a -54°C . Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) (OXFORD, acoplada a um microscópio TESCAN VEGA3 LMU) foi empregada para analisar a composição química das amostras. Após análise elementar, as amostras foram revestidas por uma fina camada de ouro e levadas para o mesmo microscópio para obtenção das imagens.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos polímeros

A técnica de espectroscopia no infravermelho foi utilizada para caracterizar a estrutura química dos polímeros estudados nesse trabalho e fornecer informações sobre interações que acontecem entre os polímeros ao complexarem. Os espectros de FTIR da pectina cítrica não purificada (PC_{com}) e da pectina dialisada (PC) estão expostos na Figura 12, enquanto o espectro da PEI está na Figura 13. As duas amostras apresentaram perfis semelhantes com bandas sem grandes deslocamentos entre si. O que distingue os espectros é a maior resolução do espectro de PC e o desdobramento de algumas bandas, o que evidencia a purificação do material dialisado. As bandas foram atribuídas com base na literatura [60-62]: em 3435 cm^{-1} , tem-se uma banda alargada de estiramento O-H; próximo de 2930 cm^{-1} , as amostras exibem bandas de estiramentos C-H dos grupos CH_2 e CH_3 , e uma adicional do espectro da PC em 2850 cm^{-1} , também referente a estiramento de CH_2 . A banda de estiramento assimétrico de C=O em carboxila metoxilada (COOCH_3) foi identificado próximo de 1750 cm^{-1} , enquanto o estiramento assimétrico de C=O em carboxila livre (COO^-) foi observado na banda de 1630 cm^{-1} . Ambas PC_{com} e PC apresentaram banda em 1415 cm^{-1} , pouco intensa, que pode ser atribuída ao estiramento simétrico de carbonilas não esterificadas. A faixa entre 1240 e 950 cm^{-1} é composta pela sobreposição de vibrações das ligações C-C dos anéis, estiramento das ligações C-OH (álcool secundário - 1150 cm^{-1}), e estiramento da ligação C-O (1015 cm^{-1}).

Além da caracterização estrutural, o FTIR foi utilizado para estimar o grau de esterificação da PC, utilizando a Equação 2, que resultou em $\text{GE} = 42\%$.

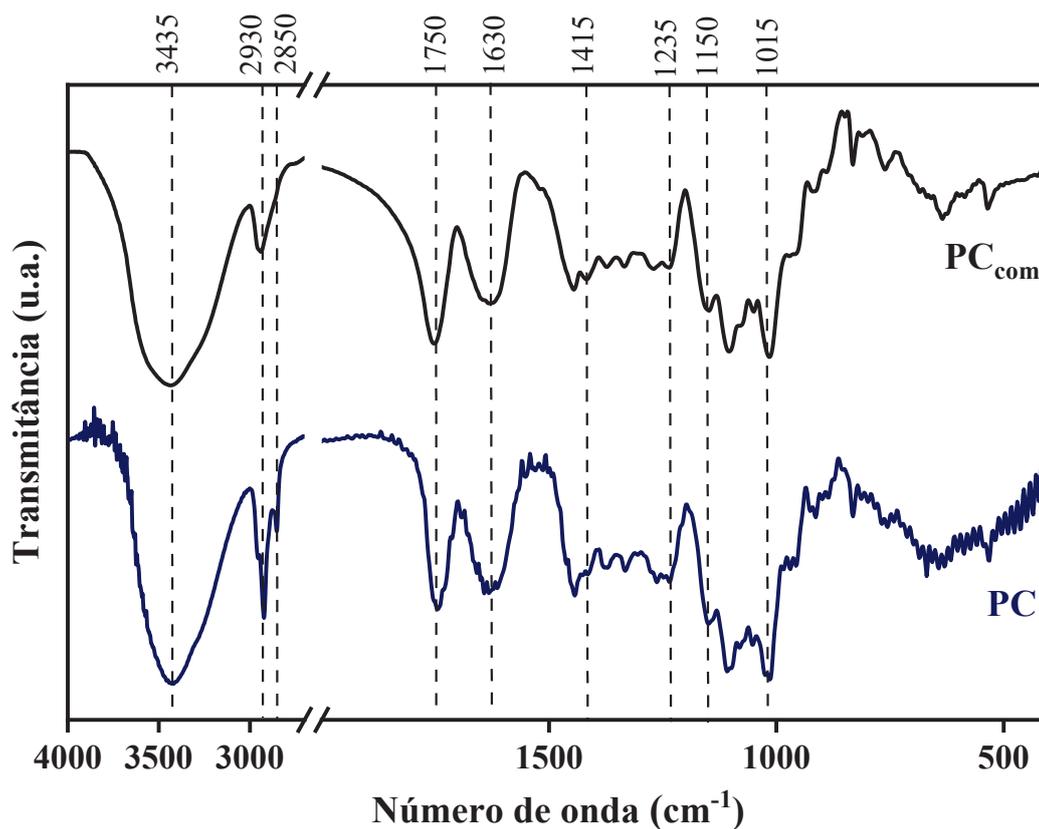


Figura 12. Espectros de FTIR das pectinas antes da purificação (PC_{com}) e após diálise (PC). Fonte: A Autora, 2024.

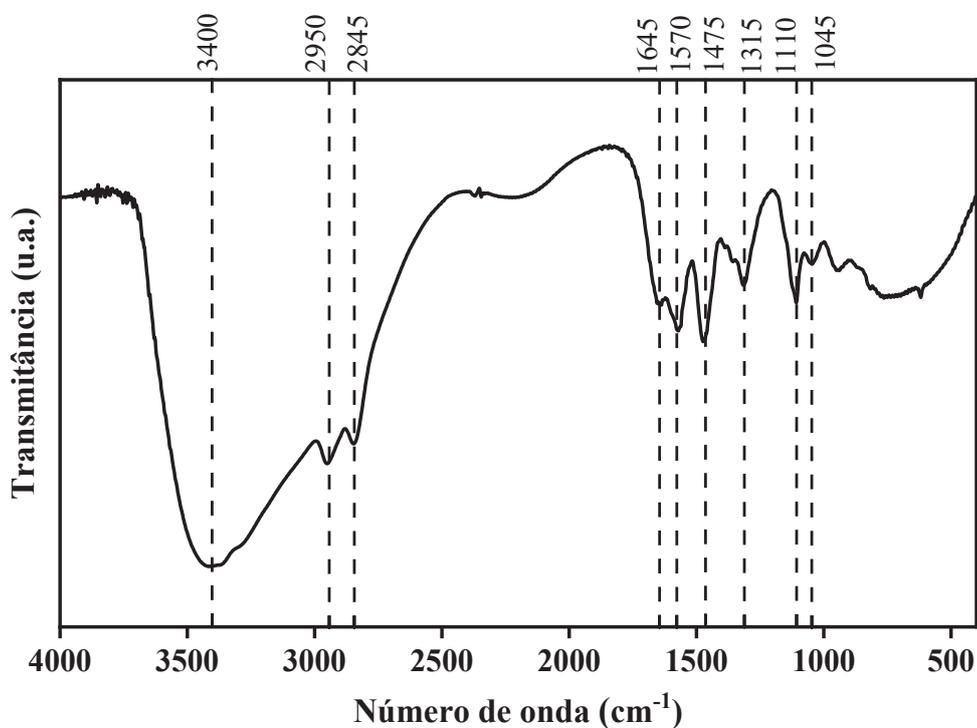


Figura 13. Espectro de FTIR da poli(etilenoimina). Fonte: A Autora, 2024.

A PEI 1.300 g mol^{-1} também foi caracterizada por FTIR e o espectro obtido está apresentado na Figura 13. As bandas observadas foram atribuídas segundo a literatura [63-

65]: presença de bandas referentes a grupos aminos próximas de 3400 e 1645 cm^{-1} (estiramento N-H); 1645, 1570 e 1475 cm^{-1} vibrações N-H e aminas primárias e secundárias; 1315, 1110 e 1045 cm^{-1} estiramento da ligação C-N. Além disso, duas bandas são observadas em torno de 2950 e 2845 cm^{-1} , referentes a estiramentos de C-H alifáticos.

A determinação do pKa dos polímeros foi feita através de titulação ácido-base, cujas curvas para PC e PEI estão expostas, respectivamente, na Figura 14 e Figura 15. As triplicatas desses experimentos (Figura 31 e Figura 33), juntamente dos gráficos de segunda derivada (Figura 32 e Figura 34), estão apresentadas no Anexo 1. A medida em que o pH aumenta, o grau de ionização das moléculas muda (Figura 10) e o pKa é encontrado na condição em que 50% dos grupos ionizáveis estão desprotonados.

A ionização das moléculas é afetada pelo ambiente ao qual grupos ácidos estão expostos – solvente, concentração de contra-íons, força iônica, presença de outros grupos ionizáveis na molécula. Para polieletrólitos como a PC, cuja desprotonação gera carga negativa na molécula, a estabilização do grupo ionizado tende a reduzir o valor do pKa, ou seja, grupos ácidos tem maior capacidade de ionização em menores valores de pH. Fatores como a de contra-íons favorecem a desprotonação de polieletrólitos, pois estabilizam o grupo carregado tornando o processo mais favorável [66]. Por outro lado, em polímeros como a PEI, na qual o grupo ionizável apresenta-se carregado em pH abaixo de pKa, a estabilização do íon favoreceria o aumento do pKa.

Ao considerar a força iônica ou a concentração salina na dispersão de polieletrólitos, o efeito de eletrólitos é causar estabilização dos grupos ionizados, o que desloca o equilíbrio químico de forma a aumentar o grau de dissociação da molécula e diminuir seu pKa [57,67]. Em estudo comparativo entre pectinas de alto e baixo grau de esterificação [27], foi demonstrado que em condição de elevada força iônica os grupos de ácido carboxílico das pectinas sofrem efeito de blindagem eletrostática que causa diminuição do pKa dos grupos ionizáveis. Uma elevada força iônica faz com que o pKa determinado seja semelhante para as pectinas independente do grau de esterificação dessas, ou seja, da densidade de carga que cada uma tem derivada da quantidade de grupos -COOH na molécula [27].

A natureza do polieletrólito e interações intermoleculares também podem alterar seu valor de pKa. Ligações de hidrogênio são comuns em polissacarídeos e podem ser favorecidas pela ionização de seus grupos funcionais. O pKa do polímero se ajusta de modo a favorecer essas interações, que são energeticamente mais estáveis para o sistema. Outra condição que deve ser considerada é a concentração do polieletrólito, visto que essa afeta

sua conformação. Mudando a forma como o polímero está exposto ao meio, os grupos ácidos podem se tornar mais acessíveis, facilitando sua ionização [44,67,68].

Assim, as titulações potenciométricas de PEI e PC foram realizadas nas mesmas condições (concentração de polímero e força iônica) utilizadas no preparo de complexos (item 4.3.4), para que o cálculo de fração ionizada dos polímeros pudesse ser realizado.

A PC apresentou perfil sigmoidal no gráfico apresentado na Figura 14 de desprotonação que aparenta ser de um único tipo de hidrogênio, comportando-se como ácido monoprótico. Os gráficos de derivada segunda (Figura 32) confirmam que há apenas um ponto de inflexão, sendo identificado apenas um pKa. A estrutura química da pectina cítrica utilizada no presente trabalho é composta majoritariamente de ácido galacturônico, que possui apenas um grupo ionizável. Na literatura, encontram-se estudos que mostram a titulação de polímeros naturais como a pectina que apresentam apenas um valor de pKa [4,27,67], apesar de apresentarem uma estrutura química complexa.

Já na curva da PEI, na Figura 15, foram identificados dois pontos de volume final (Vf), indicando a presença de duas espécies de hidrogênio distintas sendo tituladas. Como as amins primárias e secundárias da PEI são mais “acessíveis”, considerando sua estrutura (Figura 8), é provável que essas sejam as espécies desprotonadas na titulação. Por meio da segunda derivada (Figura 34), é possível identificar múltiplos pontos de inflexão nos gráficos, sendo o pKa das amins primárias o mais evidente.

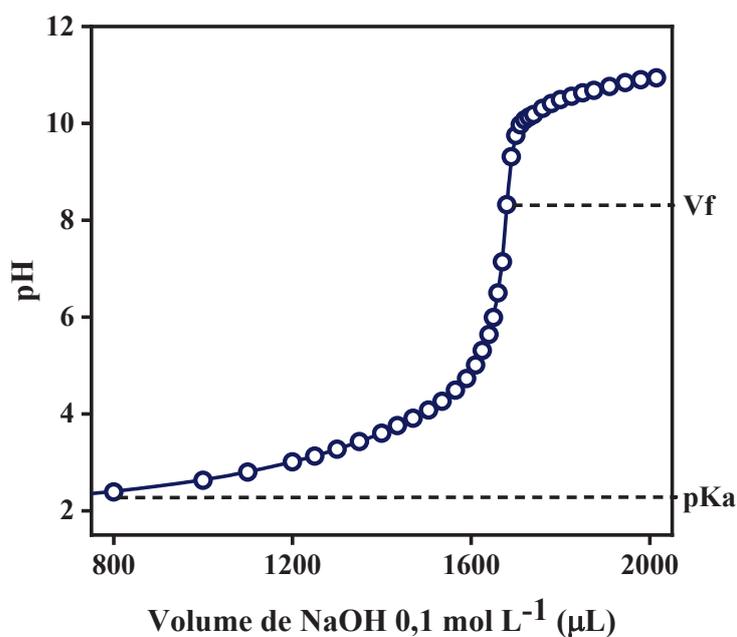


Figura 14. Curva de titulação ácido-base da PC 0,2% (m v⁻¹) em NaCl 10 mmol L⁻¹ com NaOH 0,1 mol L⁻¹ em temperatura de 25°C. Fonte: A Autora, 2024.

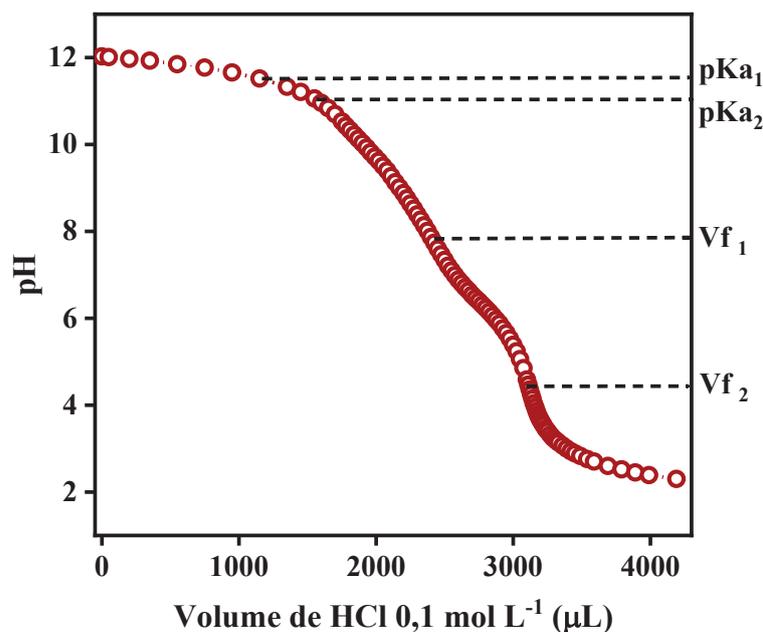


Figura 15. Curva de titulação ácido-base da PEI 0,02% (m v⁻¹) em NaCl 10 mmol L⁻¹ com HCl 0,1 mol L⁻¹ em temperatura de 25°C. Fonte: A Autora, 2024.

Os valores da constante de ionização dos polímeros, determinados com auxílio da segunda derivada das curvas de titulação, foram: $pK_a(-COOH) = 2,22 \pm 0,42$ para os grupos carboxílico da PC; $pK_a(-NH_3^+) = 11,01 \pm 0,13$ (grupos amino primários) e $pK_a(-NRH_2^+) = 11,38 \pm 0,13$ (grupos amino secundários) para a PEI. O pK_a obtido para a pectina utilizada nesse trabalho é menor que o encontrado em outros estudos [27,69]. O menor valor de pK_a pode estar indicando que a PC tem menor densidade de carga devido à menor quantidade de grupos COOH livres. Além disso, a presença dos grupos metil esterificados pode auxiliar na melhor distribuição dos grupos ionizáveis na molécula, minimizando a repulsão eletrostática entre eles e favorecendo sua estabilização.

A PC, diferentemente da PEI, é um polímero natural de estrutura química complexa, composto por cadeias com diferentes substituições e de diferentes tamanhos. Além disso, como indicado pelo FTIR, a estrutura da pectina sofre alterações com o processo de diálise. Isso faz com que sejam necessárias outras caracterizações para se conhecer mais detalhadamente as propriedades do polímero com o qual se trabalha. A técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (HPSEC) foi aplicada para determinar algumas propriedades físico-químicas da PC (pectina cítrica dialisada). No perfil cromatográfico da PC, apresentado na Figura 16, é possível identificar a presença de dois picos por meio do detector de índice de refração (RI), sendo o de menor tempo de eluição (47 min) atribuído a compostos de massa molar mais alta e o pico eluído em maior tempo (70 min), atribuído à presença de compostos de menor massa molar.

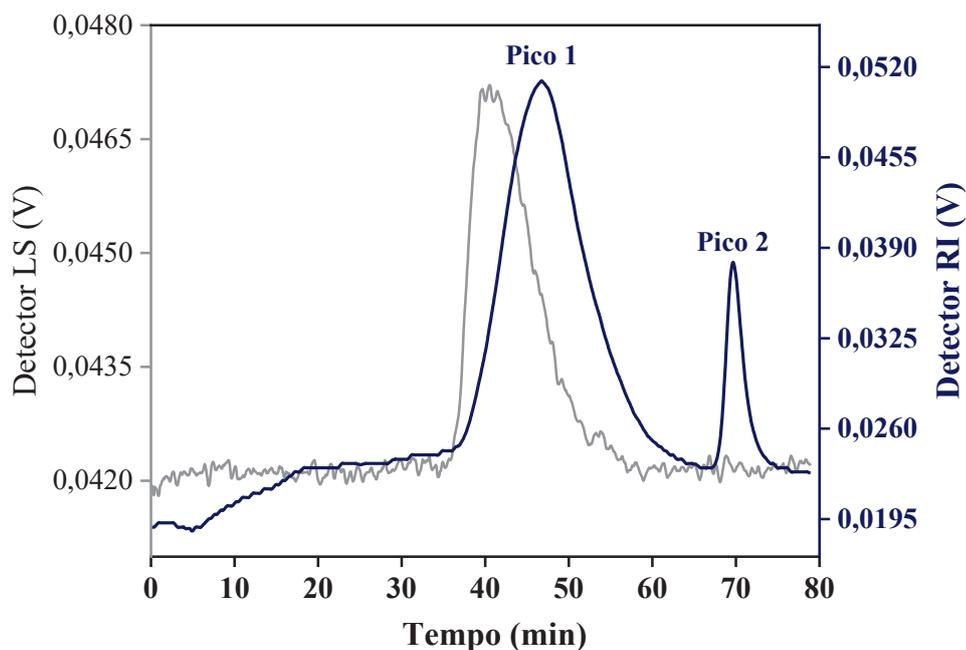


Figura 16. Perfil cromatográfico (HPSEC) obtido para a pectina cítrica dialisada (PC). Fonte: A Autora, 2024.

A partir do perfil cromatográfico, foram calculadas a massa molar ponderal média (M_w), a massa molar numérica média (M_n) e a polidispersão de massas molares (\mathfrak{D}), dados apresentados na Tabela 2. A determinação dessas propriedades também foi realizada para o pico 2, porém a M_w apresentou um maior erro (57%) devido a ausência de sinal pelo detector de espalhamento de luz (LS). Os resultados obtidos nessa análise permitem concluir que a PC se trata de uma amostra polidispersa ($\mathfrak{D} > 1$), composta principalmente por cadeias poliméricas de elevada massa molar. O perfil polidisperso e com massa molar na ordem de 10^5 g mol^{-1} da PC é semelhante ao determinado para pectinas cítricas em outros trabalhos encontrados na literatura [34,54,70,71].

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da pectina cítrica dialisada determinados pela técnica HPSEC (M_w , M_n , \mathfrak{D}). A porcentagem ao lado do valor de M_w indica o erro associado a análise.

| | Tempo de eluição (min) | M_w (g mol^{-1}) | \mathfrak{D} (\bar{M}_w/\bar{M}_n) |
|--------|------------------------|-------------------------------|--|
| Pico 1 | 46,7 | $1,359 \times 10^5$ (10%) | $2,420 \pm 0,576$ |
| Pico 2 | 69,7 | $1,626 \times 10^4$ (57%) | $2,202 \pm 1,716$ |

Os polímeros também foram caracterizados com relação ao tamanho em dispersão utilizando técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e ao potencial zeta. A dispersão de PC foi diluída na proporção 1:10 com PBS 10 mmol L^{-1} devido à turbidez na concentração $0,2\% (\text{m v}^{-1})$ e, assim, foi medido tamanho de $814,3 \pm 498,8 \text{ nm}$ e $\zeta = -19,3 \pm 1,8 \text{ mV}$. Já a dispersão de PEI apresentou tamanho de $423 \pm 324,5 \text{ nm}$ e $\zeta = 19,6 \pm 4,8 \text{ mV}$. A medida de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) no DLS relaciona a intensidade da luz espalhada com o

tamanho das partículas, aproximando-as a esferas de raio equivalente. Para interpretar esse valor, é importante destacar que, embora os polímeros apresentem massas molares muito distintas – sendo um na ordem de 10^4 ($M_{w,PC} = 135,9 \text{ kg mol}^{-1}$) e outro de 10^2 ($M_{w,PEI} = 1,3 \text{ kg mol}^{-1}$) – a conformação das cadeias poliméricas influencia diretamente o diâmetro hidrodinâmico. Interações mais favoráveis com o solvente (água e íons do tampão PBS) promovem maior hidratação da macromolécula, resultando em uma conformação mais estendida e, conseqüentemente, em maior diâmetro. A conformação dos polieletrólitos influencia a exposição dos grupos carregados ao meio e, assim, grupos ionizáveis podem permanecer ocultos dentro da molécula, reduzindo sua contribuição para a carga superficial [67,72]. Isso pode explicar por que o potencial zeta da PEI apresenta o mesmo valor, em módulo, que o da PC, apesar de a PEI possuir uma maior densidade de carga quando se considera a quantidade total de grupos ionizáveis em sua molécula.

5.2 Complexação polieletrólítica de PC com PEI

5.2.1 Efeito do método de adição

Testes iniciais de coacervação foram realizados para comparação entre adição rápida com agitação no vórtex e adição lenta controlada por bomba de seringa, sem controle ou ajuste de pH das dispersões. Devido ao caráter básico da dispersão de PEI, todos os produtos da coacervação apresentaram pH entre 9 e 10. Os produtos obtidos misturando os polímeros em vórtex não revelaram a presença de partículas visíveis sob microscopia óptica, tampouco variações na turbidez em relação a dispersão de PC de partida. No método rápido, misturam-se os polímeros carregados e o que pode levar a formação de produtos cinéticos não muito estáveis. Portanto, não se deu continuidade com o método do vórtex nos estudos subsequentes.

Por outro lado, o gotejamento de um polímero no outro por adição lenta a $100 \mu\text{L min}^{-1}$ favoreceu a complexação e conseqüente formação de partículas esféricas micrométricas, cuja tamanho foi dependente da ordem de adição (Figura 17 e Figura 18). Ao adicionar PC na PEI (amostra PC/PEI), formam-se partículas maiores com diâmetros de 1,4 a $5,2 \mu\text{m}$ e mais dispersos que a amostra PEI/PC. Invertendo a ordem, é feito o gotejamento de um polímero apreciavelmente menor em outro maior (M_w da PC é 100 vezes maior que M_w da PEI). Na condição de pH trabalhada ($\text{pH} > \text{pK}_{a\text{GalA}}$), a conformação das cadeias de pectina tende a ser mais estendida, devido a repulsão eletrostática entre os grupos carboxilato que mantém as cadeias separadas [31]. Ao ser adicionada na dispersão de PC, a PEI é capaz de difundir na dispersão e interagir com as cadeias do polissacarídeo com os grupos amino

interagindo eletrostaticamente com grupos carboxilato disponíveis e formando partículas esféricas menores de 1,3 a 3,4 μm de diâmetro [56]. Nas Figuras 18 B e D, observa-se que, após 5 dias, as partículas esféricas de ambas as amostras formaram aglomerados, embora tenham mantido sua morfologia, semelhante à observada logo após o preparo.

Com os resultados dos testes iniciais de coacervação, determinou-se que o método de adição lenta era adequado para prosseguir com o estudo da força iônica do meio.

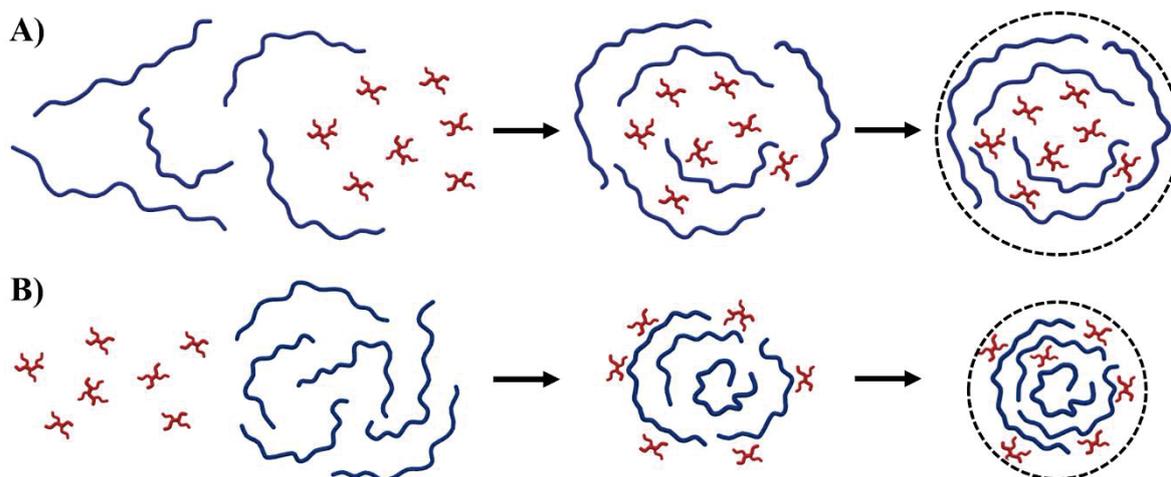


Figura 17. Representação da formação de partículas esféricas de diferentes diâmetros em função da ordem de adição da PC (em azul) e PEI (em vermelho): A) PC/PEI e B) PEI/PC.

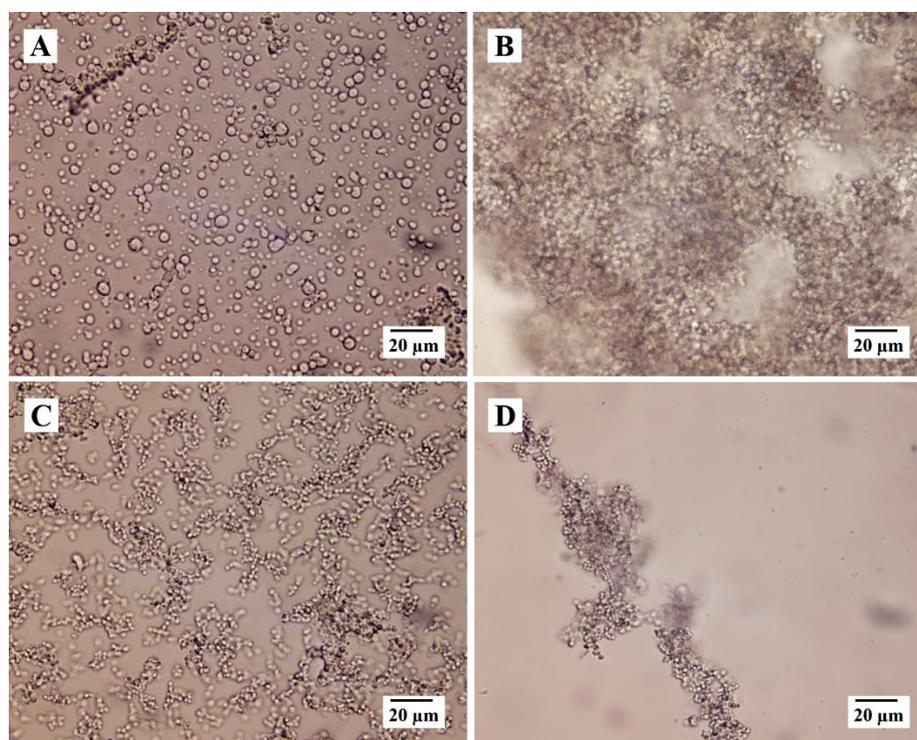


Figura 18. Imagens de microscopia óptica com 40x de ampliação dos coacervados PC/PEI (A e B) e PEI/PC (C e D) logo após o preparo, à esquerda, e após 5 dias, à direita. Fonte: A Autora, 2023

5.2.2 Efeito da força iônica

O efeito da força iônica na complexação foi avaliada preparando complexos de PC e PEI por adição lenta (com bomba de seringa) em diferentes concentrações salinas e variando a ordem de adição. A Figura 19 permite a visualização do aspecto macroscópico das dispersões, sendo evidente a precipitação das partículas formadas pela adição de PC na dispersão de PEI em água ultrapura. Após 24 h, todas as amostras, exceto aquela em que houve precipitação, mantiveram o aspecto visual, estáveis durante o tempo acompanhado. Amostras preparadas em menores concentrações de KCl apresentaram aumento da turbidez em relação às dispersões poliméricas antes da mistura, indicando a formação de partículas.

Imagens de microscopia óptica mostraram que as partículas formadas pela complexação de PC e PEI apresentam formato esférico, tamanho inferior a 5 μm e poucas diferenças perceptíveis pela técnica. As amostras mais distintas foram geradas pela combinação dos polímeros em condição de maior força iônica ($[\text{KCl}] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$), cujas imagens microscópicas revelaram apenas agregados sem formato definido. Nesses casos, as dispersões apresentaram menor turbidez quando comparadas às outras amostras. A centrifugação dessas amostras a 5.000 rpm durante 10 min causou precipitação dos agregados, nos quais também não foi possível observar partículas isoladas por microscopia óptica. É importante ressaltar que ao aplicar as mesmas condições de centrifugação na dispersão de PC verifica-se a formação de precipitado que não é distinguível do observado nas amostras preparadas em KCl 100 mmol L^{-1} .

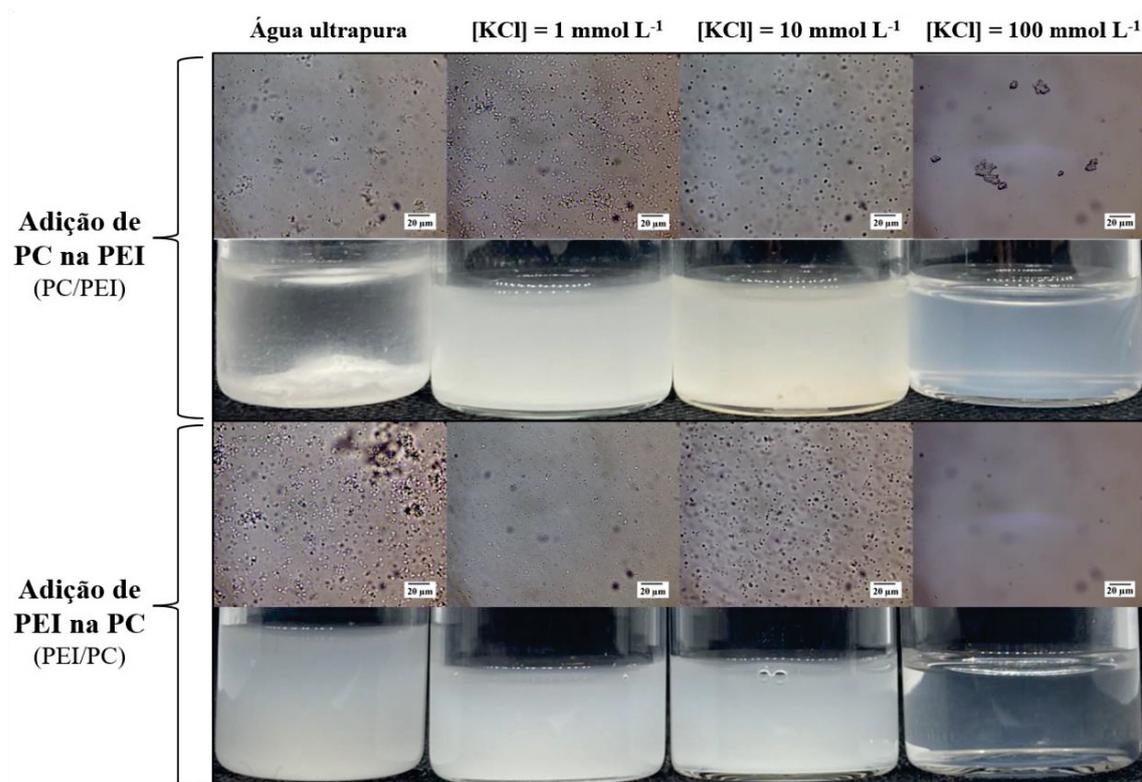


Figura 19. Imagens de microscopia óptica e fotografias dos complexos PC/PEI e PEI/PC preparados em diferentes concentrações de KCl. Fonte: A Autora, 2024.

A literatura frequentemente descreve coacervados como microfases separadas que são evidenciadas pelo espalhamento da luz e opacidade da dispersão, e uma maior turbidez das amostras sugere que a complexação dos polieletrólitos foi eficiente [21,41,73]. A formação de partículas de diferentes tamanhos ou em quantidade diferente resulta em comportamentos diferentes com relação à luz incidida. Partículas maiores causam maior espalhamento da luz incidida, levando a uma menor porcentagem de luz transmitida e, conseqüentemente, maior turbidez. O maior valor de transmitância, ou seja, menor turbidez das amostras preparadas em maior concentração salina, indica que a força iônica pode dificultar o processo de complexação. Os íons K^+ e Cl^- podem estar solubilizando os polieletrólitos, neutralizando as cargas nas superfícies das cadeias e impedindo a interação dos grupos amino da PEI e carboxilato da PC. Existem estudos que mostram a solubilização de complexos polieletrólíticos ao aumentar a força iônica do meio, o que favorece a interação dos contra-íons com os polímeros (Figura 20) [21].

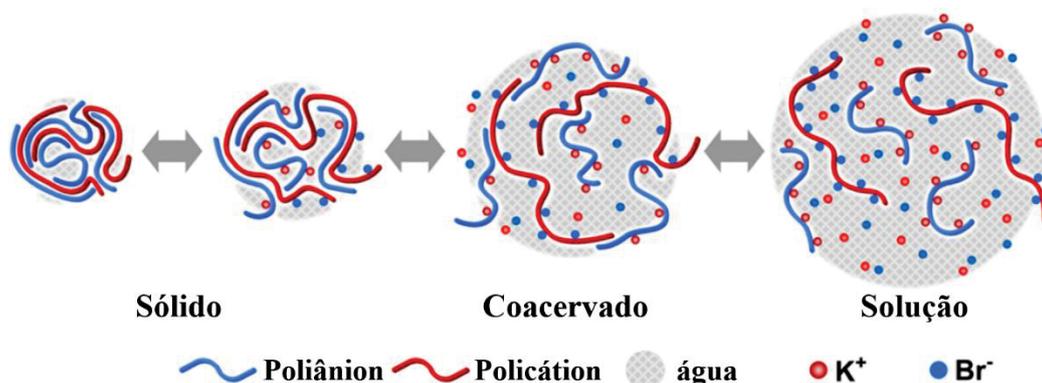


Figura 20. Efeito da adição de sal (aumentando da esquerda para a direita) nas microestruturas do complexo polieletrólítico sólido, coacervado e solução. Fonte: Adaptado de [21].

Além disso, observou-se uma redução na turbidez nas amostras onde a PEI foi adicionada à PC, sugerindo que essas partículas possam ser menores em tamanho. No entanto, essa suposição não foi confirmada pela análise por microscopia óptica. Amostras preparadas em água, em particular PC/PEI, sofreram desestabilização pouco tempo após preparo, evidenciado pela precipitação das partículas. Isso sugere que o controle da força iônica através da complexação em solução salina é interessante para favorecer a coacervação entre a PC e a PEI.

Na intenção de ter controle sob a força iônica do meio no qual a complexação polieletrólítica é conduzida, optou-se por continuar os estudos de PC e PEI preparando as dispersões em solução de KCl de 10 mmol L^{-1} . Nos estudos mencionados até então, não foi feito nenhum tipo de ajuste de pH, cujo valor, em todos os casos, ficou entre 9 e 10.

5.2.3 Efeito do pH

O pH é um fator crítico na complexação polieletrólítica, pois influencia diretamente a ionização e a carga superficial dos polieletrólitos e indiretamente a interação entre eles. Os primeiros experimentos para estudo da influência do pH na complexação foram realizados com dispersões de PC e PEI em KCl 10 mmol L^{-1} . Alíquotas da solução de HCl 1 mol L^{-1} foram adicionadas para realizar o ajuste para pH 5 das dispersões de PEI para experimentos com ajuste anterior à complexação (experimento (a)) e das dispersões PC/PEI e PEI/PC (adição rápida e lenta) com ajuste posterior à mistura dos polímeros (experimentos (b) e (c)). A PC não precisou de ajuste em nenhum momento, pois a dispersão aquosa desse polímero tem pH 5. Após mistura dos polímeros e realização do ajuste, foi medido pH próximo de 5 para as dispersões dos experimentos (a), (b) e (c). Na Figura 21 estão expostas as amostras preparadas para avaliação da influência do pH na complexação entre PC e PEI.

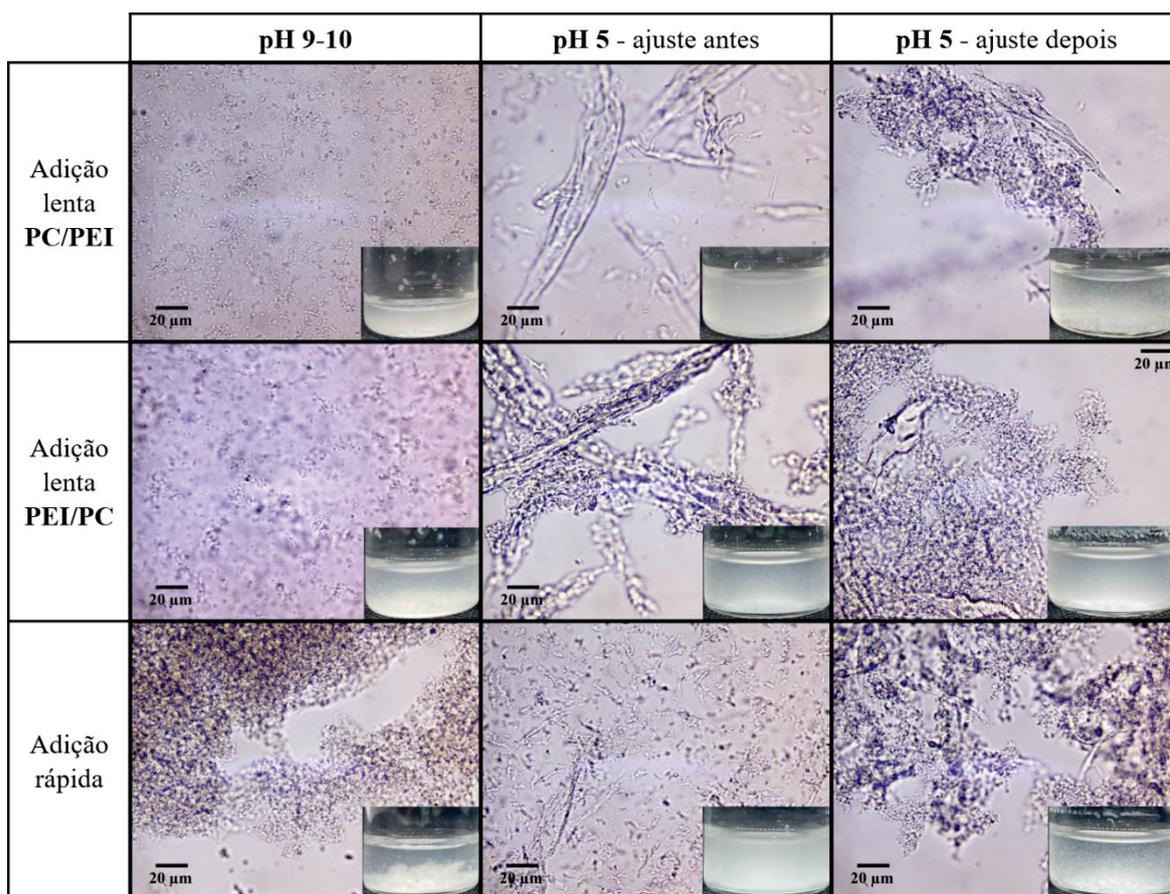


Figura 21. Dispersões de complexos de PC e PEI preparadas sem ajuste do pH, com pH ajustado antes da mistura e depois de misturar os polímeros, comparando ordem e velocidade de adição. Fonte: A Autora, 2024.

Por meio das imagens de microscopia óptica, foram observadas mudanças na morfologia das partículas resultantes da complexação devido à diminuição do pH das dispersões. A mistura por adição lenta de PC e PEI em pH 9-10 produz pequenas partículas esféricas, enquanto em pH 5 são produzidas estruturas maiores parecidas com fios. Essas estruturas formadas pela adição lenta de PC na PEI apresentaram superfície mais lisa que pela adição de PEI na PC, nas quais os fios aparentam ter pequenos agregados. Além disso, foi observado que o ajuste do pH após combinação das dispersões de PC e PEI, tanto por adição lenta quanto rápida, formou agregados sem formato definido. Nessas amostras, não foram observadas estruturas semelhantes aos fios em PC/PEIa e PEI/PCa, indicando que o processo de complexação em pH 5 ocorre de maneira diferente que em pH 10. Com os espectros de transmitância da Figura 22, é possível notar que algumas amostras apresentam menor transmitância – maior turbidez – que outras. Nos espectros de transmitância obtidos logo após o preparo das 9 amostras, observou-se que a turbidez das dispersões preparadas em pH 5 é maior que para as preparadas em pH 10 e que da própria dispersão de PC em praticamente toda a região de varredura (Figura 22). Essa observação também pode indicar

presença de partículas maiores ou maior rendimento da complexação. Todas as amostras precipitaram depois de permanecer em repouso por alguns minutos.

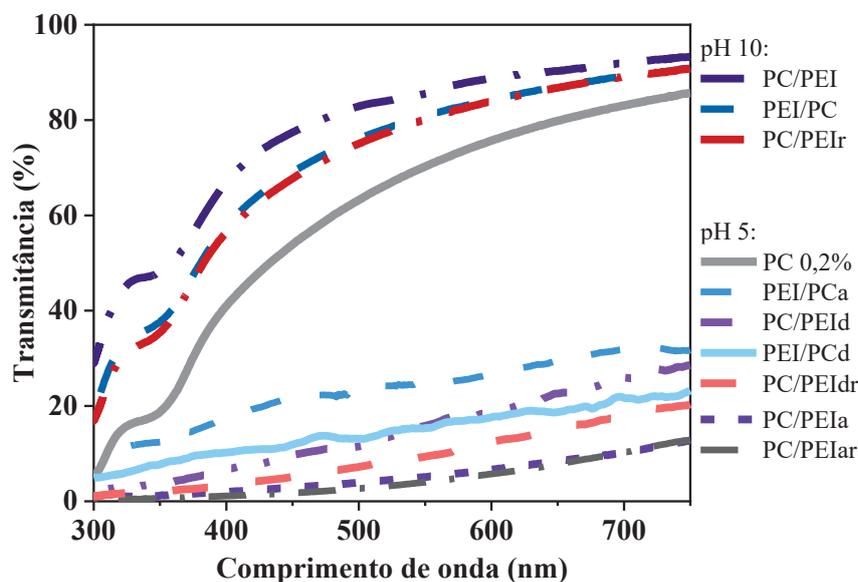


Figura 22. Espectros de transmitância das amostras preparadas com ajuste de pH antes da adição lenta (índice “a”), com ajuste de pH depois da adição lenta (índice “d”) e por adição rápida dos polímeros (índice “r”). Fonte: A Autora, 2024.

Segundo o gráfico da Figura 10, na região de pH 9-10, tem-se majoritariamente a presença de espécies de PEI desprotonadas. Quando o pH diminui de 10 para 5, as amins da PEI são protonadas e as cadeias poliméricas adquirem densidade de carga positiva. O aumento da disponibilidade de grupos positivos (NH_3^+) para interagir eletrostaticamente com os grupos aniônicos das PC ($-\text{COO}^-$) tende a melhorar a eficiência da complexação entre os polímeros [4]. Uma vez que partículas são formadas mesmo em meio básico, a acidificação subsequente à mistura leva a agregação dessas partículas.

Na complexação utilizando proporção mássica 1:1, a condição de pH 9-10 é a mais adequada para formação de complexos estáveis, ou seja, que não precipitam. Como a PEI possui uma quantidade maior de grupos ionizáveis em sua estrutura que a PC, a formação de partículas estáveis e com morfologia mais definida em pH 5 deve ser possível variando a proporção entre os polieletrólitos. Por esse motivo, foi realizado estudo do efeito da proporção entre os polímeros. A fim de garantir controle da força iônica e do pH, as dispersões foram preparadas em tampão PBS 10 mmol L^{-1} em pH 5. A complexação dos polímeros nesse tampão foi realizada ajustando o pH da PEI antes da adição lenta de PC na PEI, de PEI na PC e por adição rápida. Não foram observadas nem registradas diferenças entre os complexos PC/PEIa, PEI/PCa e PC/PEIar e os preparados em tampão PBS. Assim,

assumiu-se que a troca de KCl pelo tampão não alterou a complexação nas condições estudadas.

5.2.4 Efeito da proporção entre polímeros

A complexação de polieletrólitos é derivada, principalmente, da atração eletrostática entre os polímeros. Assim, fatores como a ionização dos polímeros, força iônica e presença de contra-íons no meio influenciam diretamente na eficiência do processo. As observações feitas nos estudos dos efeitos da força iônica e do pH das dispersões apontaram que é preciso considerar a disponibilidade das espécies carregadas. A otimização da complexação polieletrólítica para formação de complexos depende da neutralização das cargas dos polieletrólitos, o que deve acontecer em uma relação estequiométrica entre cargas positivas e negativas. A densidade de carga na PEI é maior que da PC devido a maior quantidade de grupos ionizáveis em cada macromolécula. Dessa forma, a complexação polieletrólítica de PC e PEI em pH 5, condição na qual os polímeros neutralizam suas cargas, deve ocorrer em proporção mássica PEI:PC diferente de 1:1.

Com objetivo de explorar a complexação em diferentes proporções mássicas (PEI:PC), foi realizada a titulação condutométrica da PC 0,2% (m v⁻¹) com dispersão de PEI 0,02% (m v⁻¹) (Figura 23).

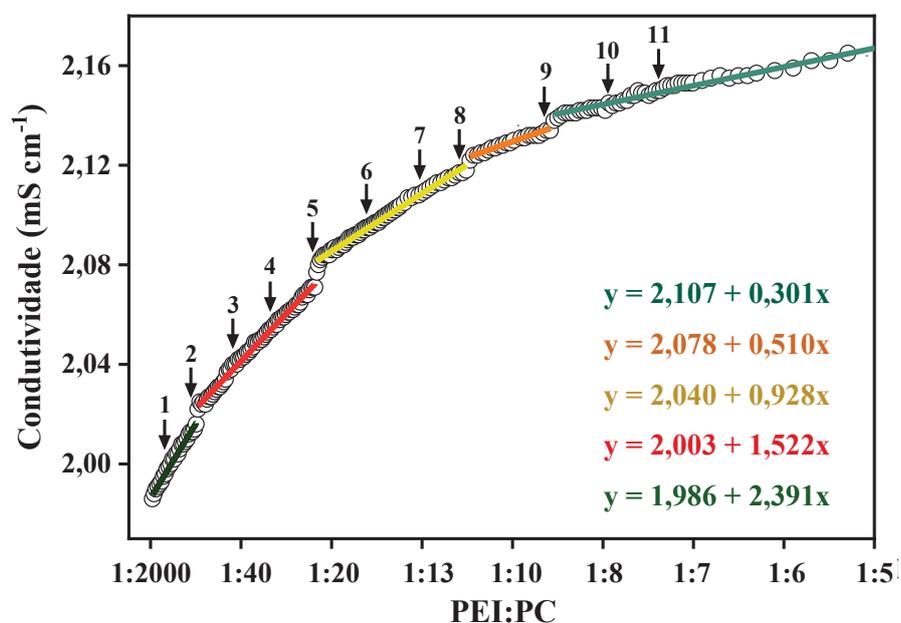


Figura 23. Titulação condutométrica de PC 0,2% (m v⁻¹) com PEI 0,02% (m v⁻¹). As equações de reta estão indicadas com as cores correspondentes às regiões no gráfico onde os ajustes lineares foram feitos. Os pontos indicados pelos números de 1 a 11 foram preparados isoladamente para caracterização físico-química dos complexos. Fonte: A Autora, 2024.

A condutividade inicial da PC 0,2% (m v^{-1}) foi medida $1,988 \text{ mS cm}^{-1}$, enquanto da PEI 0,02% (m v^{-1}) foi de $2,190 \text{ mS cm}^{-1}$. Ambas as dispersões foram preparadas em tampão PBS 10 mmol L^{-1} , que apresenta uma elevada quantidade de íons comparado às soluções de KCl utilizadas nos estudos de força iônica. Com a adição de PEI na dispersão de PC, foi registrado aumento da condutividade da mistura, no entanto, esse aumento não ocorreu de forma constante durante toda a titulação. Na curva da Figura 23, é possível distinguir cinco regiões que seguem diferentes tendências de aumento da condutividade. Aplicaram-se ajustes lineares nessas regiões para determinação das equações de reta. Observa-se que o coeficiente angular das retas diminui com o aumento da proporção de PEI em relação a PC. Isso indica que a influência da PEI na condutividade torna-se menos relevante à medida que sua quantidade aumenta.

Os pontos 1 a 11 do gráfico de condutividade foram preparados isoladamente para caracterização, mantendo a mesma concentração total de polímeros da titulação para cada valor de PEI:PC. Também foram preparadas amostras numeradas de 12, 13 e 14, com quantidades maiores de PEI. No preparo dos complexos, outra tendência observada com o aumento da quantidade de PEI foi no aspecto visual das amostras nas fotografias dispostas na Figura 24. A razão molar das cargas (Z) da PEI em relação à PC é apresentada para cada amostra. Da amostra 1 para a 14, a quantidade de PEI usada para preparar os complexos aumenta. Da mesma forma, a proporção de carga positiva aumenta, passando de $Z = 0,05$ até $3,6$. Até $Z = 0,3$, correspondente à segunda região da curva, as amostras apresentam turbidez semelhante à dispersão de PC antes da adição de PEI. O ponto 5 ($Z = 0,4$), próximo da interseção entre a segunda e terceira região da curva, apresentou uma queda no valor de transmitância em 550 nm . Amostras que atingiram a razão equimolar de cargas ($Z = 1$) não precipitaram imediatamente após o preparo, mas foi observada formação de sólidos em algumas após tempo em repouso. Os complexos formados nas amostras 10-14, nas quais a proporção em massa de PEI para PC é maior que 1:8 e a razão molar é maior que $Z = 1$, decantaram logo após finalização da adição de PEI. A transmitância dessas amostras não permaneceu estável devido a sedimentação das partículas. O valor de T% informado na Figura 24 é referente à análise da amostra logo após desligar a agitação, quando as partículas ainda estavam suspensas. A observação a olho nu das amostras, assim como a titulação condutométrica, traz indícios de que existem três comportamentos diferentes na faixa de proporção mássica analisada.

Na condição trabalhada de $\text{pK}_{\text{aPC}} < \text{pH} < \text{pK}_{\text{aPEI}}$, os grupos amino positivos da PEI são atraídos eletrostaticamente pelos grupos carboxilato da PC. Espera-se que a adição

contínua de PEI na PC promova a complexação dos polímeros até que as cargas sejam neutralizadas (formação de coacervados complexos). Medidas de potencial zeta dos polieletrólitos e dos complexos com diferentes proporções PEI:PC foram realizadas no intuito de compreender melhor o balanço de cargas do sistema. Também foi medido o tamanho desses complexos através da técnica de DLS, resultando em distribuições por intensidade e por volume (Tabelas 3 e 4 no Anexo 1). O tamanho médio dado pela distribuição de intensidade e o potencial zeta dos complexos em função da proporção entre PEI:PC estão apresentados no gráfico da Figura 25.

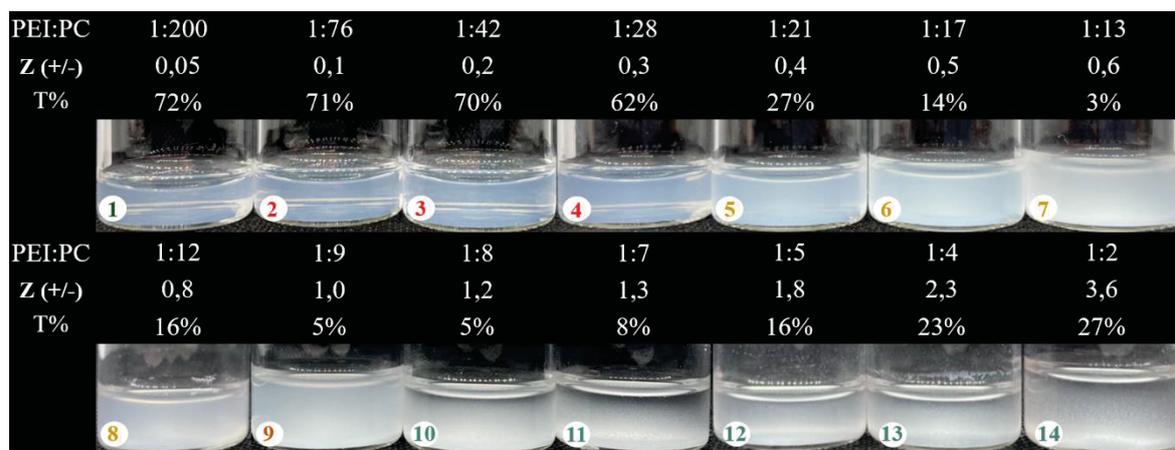


Figura 24. Aspecto visual dos pontos 1 a 14 da titulação condutométrica imediatamente após o preparo, com valores da proporção mássica (PEI:PC), razão das cargas (Z) e transmitância em 550 nm (T%). Fonte: A Autora, 2024.

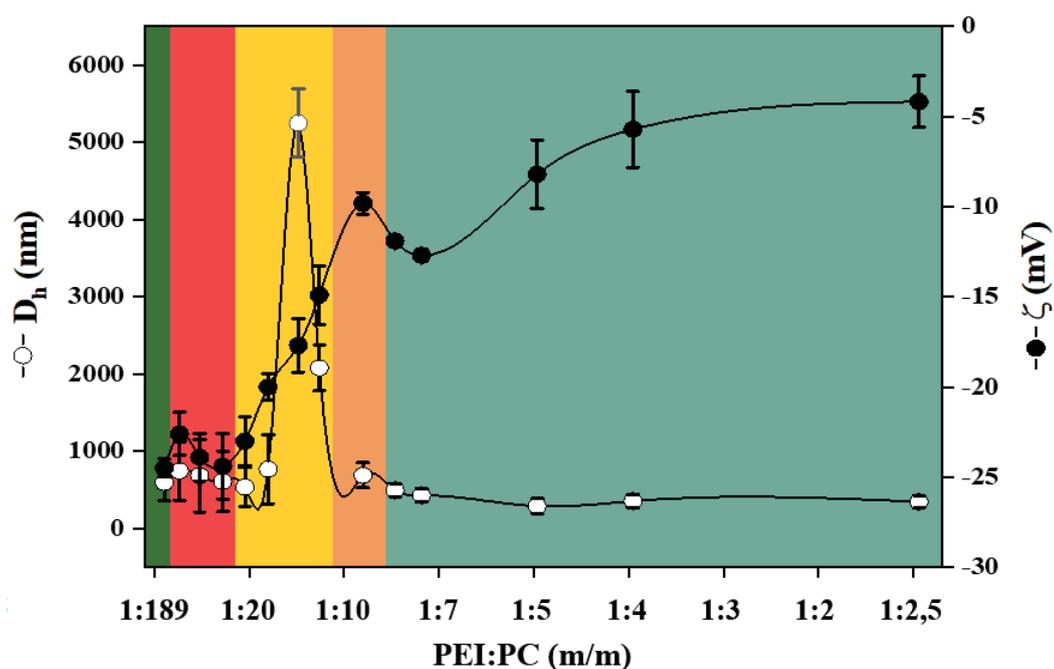


Figura 25. Tamanho médio (D_h) determinado pela distribuição de intensidade e potencial zeta (ζ) dos complexos de PC e PEI em função da proporção mássica entre os polímeros. Fonte: A Autora, 2024.

As cinco regiões determinadas pela titulação condutométrica estão indicadas na Figura 25 com as mesmas cores da curva na Figura 23. Nas proporções 1:189 e 1:21, correspondentes a $Z = 0,05$ e $0,4$, respectivamente, as amostras apresentaram potencial zeta negativo, variando de $-24,5$ a $-22,6$ mV. Amostras com proporção mássica a partir de 1:8 ($Z = 1,2$) apresentam uma clara tendência de diminuição em módulo do potencial zeta com a adição da PEI, ou seja, a carga dos complexos fica menos negativa com o aumento da quantidade da PEI. Essa tendência continua, alcançando $-4,18$ mV na proporção mássica 1:2 ($Z = 3,6$).

O perfil de potencial zeta das amostras indica que a PEI em menor concentração complexa com a PC sem neutralizar completamente a carga negativa do polissacarídeo, por isso foram medidos valores negativos para as partículas. Disponibilizando maiores quantidades de cargas positivas para interagir com a PC, mais grupos COO^- são neutralizados ao interagir com NH_3^+ , resultando em complexos gradativamente menos negativos (valores menos negativos de ζ) com aumento em massa da PEI.

Nas proporções 1:189 e 1:21, correspondentes a $Z = 0,05$ e $0,4$, respectivamente, as amostras apresentaram D_h entre 590 e 750 nm, menores do que os medidos para a PC. Isso sugere que as cadeias positivas da PEI interagem com a PC, promovendo a contração das cadeias do polissacarídeo. O perfil de tamanho das partículas não segue uma tendência clara como no perfil de ζ , mas é possível observar um aumento acentuado na proporção mássica de 1:13 ($Z = 0,6$), acompanhado de diminuição abrupta da transmitância para 3%. Valores de D_h médio voltam para a faixa de 200 a 700 nm, aproximadamente, em maiores proporções de PEI nos complexos. É importante considerar que o tamanho médio aqui apresentado é referente ao pico de maior área da distribuição de tamanho por intensidade. Em outros pontos também foram observados outros picos de menor contribuição para intensidade na faixa de $5 \mu\text{m} > D_h > 2 \mu\text{m}$.

Amostras entre proporção 1:8 e 1:2 precipitaram imediatamente após a mistura de PC e PEI, devido a formação de partículas muito grandes que decantaram após pouco tempo sob repouso. Nesse conjunto, as triplicatas dos correlogramas ficaram discrepantes entre si, mas todas com muito ruído no final da curva, indicando a presença de agregados maiores e heterogeneidade nas amostras. Foram registrados valores de D_h menores que o esperado, referentes a possíveis complexos que permaneceram suspensos justamente devido ao menor tamanho.

Determinou-se o rendimento de coacervação em relação a quantidade de PC presente nos complexos através do método colorimétrico de Dubois. A curva analítica construída com

o monômero da PC, o ácido galacturônico (GalA), está apresentada na Figura 35. A Figura 26 traz o gráfico de rendimento mássico e de PC dos complexos polieletrólíticos. As cores no gráfico refletem as cinco regiões de tendência da curva de titulação, que também são observadas no rendimento. Proporções entre 1:189 e 1:42, de menor quantidade de PEI, tem-se rendimento mássico e de pectina menores ou iguais a 20% e, em seguida, um aumento progressivo. A partir do ponto 11 (proporção 1:7 e $Z = 1,3$), ou seja, na região azul do gráfico, os rendimentos não sofrem variações muito perceptíveis. O alcance de um platô no rendimento sugere que a complexação foi eficiente até a amostra com proporção 1:9 ($Z = 1,0$). A partir desse ponto, a PC é saturada e não complexa mais com o PEI.

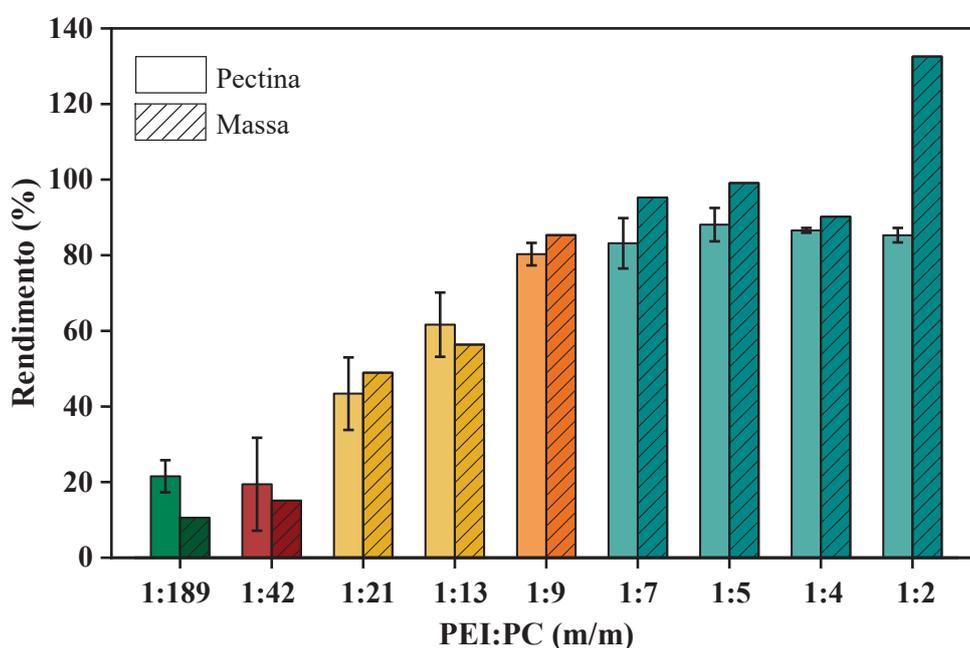


Figura 26. Quantidade de PC (barras coloridas) e rendimento mássico (barras hachuradas) dos complexos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 da titulação de PC com PEI. Fonte: A Autora, 2024.

O rendimento, assim como as medidas de potencial zeta, tamanho e titulação condutométrica, contribui para a noção de que a complexação da PEI com a PC tem um valor ótimo da proporção PEI:PC que otimiza a complexação entre os polímeros. Quando a adição de PEI na PC atinge a proporção mássica de 1:9, a razão entre as cargas dos polímeros é $Z = 1$. A partir desse valor, espera-se que os grupos carregados da PC ($-\text{COO}^-$) estejam saturados com grupos carregados da PEI ($-\text{NH}_3^+$), não favorecendo a formação de mais complexos estáveis (dispersos), observando-se a precipitação de complexos maiores, de menor carga superficial, e instáveis.

5.3 Estabilidade dos complexos de PC e PEI ao longo do tempo

Complexos polieletrólíticos foram preparados em duplicata adicionando PEI na dispersão de PC nas proporções mássicas 1:44, 1:14 e 1:8, com $Z = 0,2$, $0,6$ e $1,2$, respectivamente, e monitoradas ao longo de 168 h. A estabilidade das amostras foi avaliada com base na permanência do complexo em dispersão, sem formação de precipitado. A Figura 27 traz as fotografias das amostras registradas durante o período acompanhado. Foi possível observar formação de algum precipitado nas amostras 1:14 ($Z = 0,6$) após 48 h e em 1:44 ($Z = 0,2$) após 72 h, apesar das dispersões manterem aspecto visual turvo. A amostra 1:8 ($Z = 1,2$) precipitou completamente logo após a adição da dispersão de PEI, enquanto as amostras com menor quantidade de PEI precipitaram totalmente após uma semana.

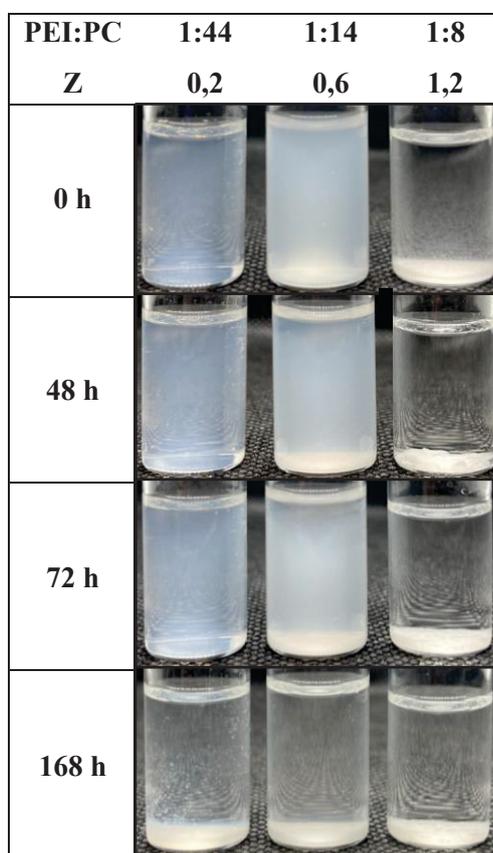


Figura 27. Complexos de PC e PEI em diferentes proporções poliméricas acompanhados ao longo de 168 h. Fonte: A Autora, 2024.

A análise estrutural das amostras foi realizada através da técnica de FTIR, cujos espectros estão apresentados na Figura 28 para os complexos em $t = 0$ h (no dia do preparo) e em $t = 168$ h (sete dias após o preparo). Os três complexos, em diferentes proporções de PEI:PC, apresentaram majoritariamente bandas de ligações presentes na molécula da PC: estiramento O-H em 3400 cm^{-1} ; estiramento de C=O em torno de 1750 cm^{-1} , dos grupos

metil esterificados (COOCH_3), e de 1630 cm^{-1} , dos grupos não esterificados (COO^-); vibrações de carbonilas não esterificadas em 1415 cm^{-1} ; estiramento de C-OH (álcool secundário) em 1100 cm^{-1} ; e, em 1015 cm^{-1} , estiramento da ligação C-O. No entanto, também foi possível identificar bandas características da PEI, como a região característica de estiramentos N-H em torno de 3400 cm^{-1} ; bandas de estiramento de carbonos alifáticos próximas a 2950 e 2850 cm^{-1} ; e a banda em 1100 cm^{-1} , característica de estiramento C-N.

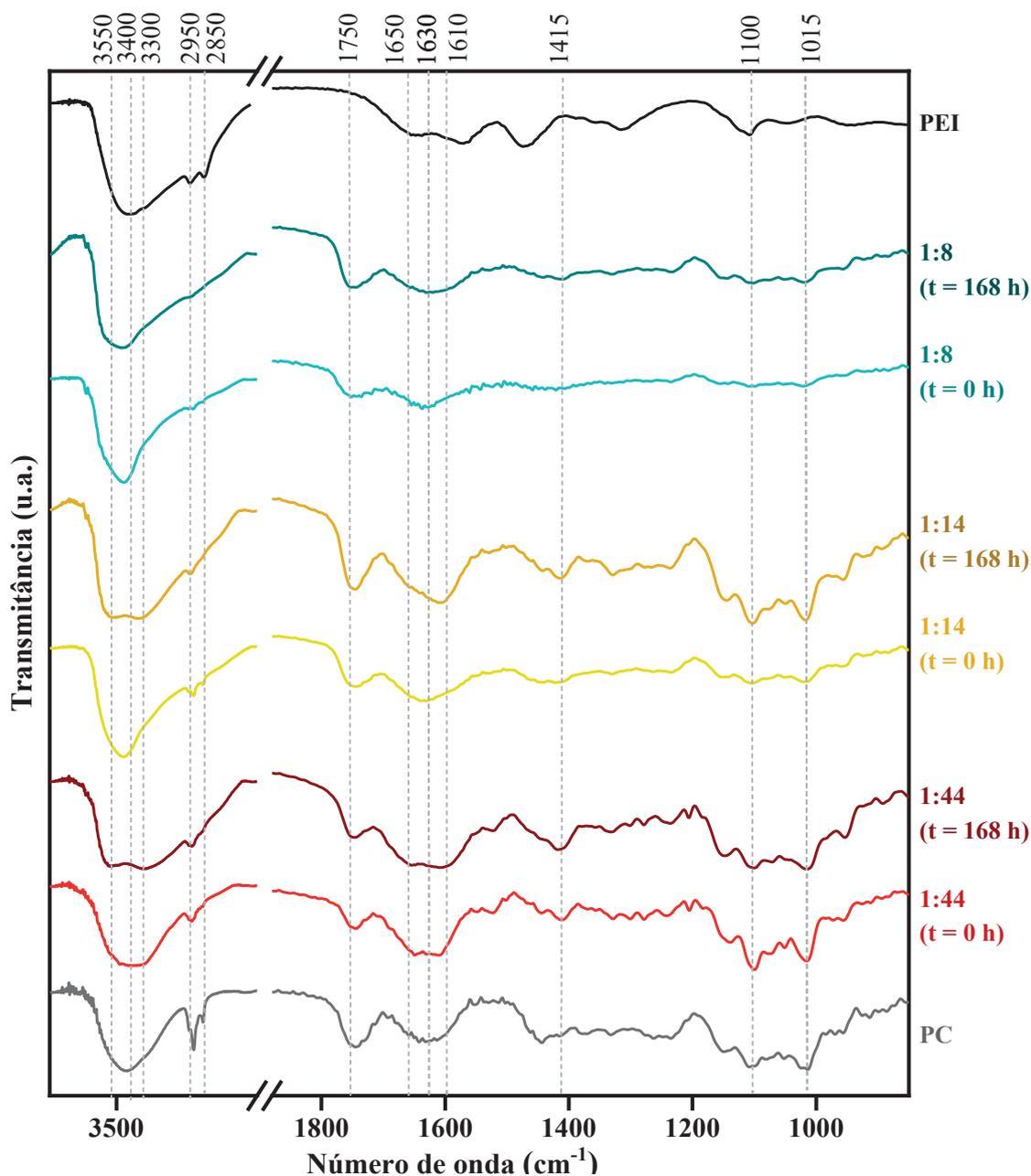


Figura 28. Espectros de FTIR da PC, PEI e seus complexos nas proporções PEI:PC de 1:44, 1:14 e 1:8 no dia do preparo ($t = 0\text{ h}$) e uma semana após preparo ($t = 168\text{ h}$). Fonte: A Autora, 2024.

Os espectros dos complexos obtidos de amostras que permaneceram em dispersão durante 168 h apresentaram algumas alterações. Duas principais diferenças foram

observadas após o tempo em que os complexos permaneceram em dispersão. Uma delas está na região onde são identificadas bandas de estiramento da ligação em O-H na molécula da PC. Amostras 1:44 e 1:14 em $t = 168$ h apresentaram desdobramento em duas bandas, 3550 cm^{-1} e 3300 cm^{-1} . A primeira se trata da vibração de hidroxilas livres, enquanto a segunda, de menor energia, é referente às ligações de hidrogênio intermoleculares nas cadeias da PC. A banda na região de 3400 cm^{-1} nas amostras 1:8 e 1:14 ($t = 168$ h) é mais estreita que nos outros espectros, e pode ser atribuída a ligações de hidrogênio intramoleculares [74]. Outra diferença está na região próxima de 1630 cm^{-1} , que tem relação com o grupo carboxílico livre na estrutura da PC. As amostras 1:44 em $t = 0$ h e em $t = 168$ h apresentaram duas bandas: em 1650 cm^{-1} , vibração do grupo protonado ($-\text{COOH}$) e, em 1610 cm^{-1} , do grupo desprotonado ($-\text{COO}^-$).

A caracterização dos complexos por FTIR sugere a ocorrência de interações entre os grupos amina da PEI e carboxilato da PC. Particularmente, as bandas correspondentes ao grupo carboxilato livre (COO^-) e à amina protonada (NH_3^+) indicam a formação do complexo. A presença das bandas atribuídas a ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares demonstra que, com o passar do tempo (de $t = 0$ h a 168 h), mudanças conformacionais devem estar acontecendo, alterando as interações entre os grupos funcionais e, conseqüentemente, suas vibrações características.

A carga superficial é um fator que pode determinar a estabilidade da dispersão. Considerando apenas interações eletrostáticas, coloides com menor carga superficial (em módulo) tendem a agregar e desestabilizar devido a menor repulsão entre as partículas, que não é suficiente para manter os objetos afastados. Medidas de potencial zeta apresentadas no gráfico da Figura 29 mostram que os três complexos possuem carga superficial negativa, uma vez que são constituídos majoritariamente de PC. Devido ao maior conteúdo de PEI no preparo do complexo 1:8, os valores de ζ medidos foram menos negativos, até atingir $-7,6 \pm 5,0$ mV após 72 h, o que pode explicar a instabilidade dessa amostra logo após o preparo. Nota-se que ocorreu uma diminuição da carga superficial dos complexos com proporção 1:44 e 1:14 após 72 h, que também facilita a agregação dos complexos e sua desestabilização. Decorridos os 168 h, a carga superficial foi de $-10,0 \pm 4,3$ mV na amostra 1:44, o que pode ter diminuído a repulsão eletrostática entre as partículas de complexo e contribuído para a precipitação dos complexos. As medidas de potencial zeta são mais um indicativo de que, decorrido um certo tempo em dispersão, interações intermoleculares entre PEI e PC são estabelecidas, o que pode favorecer ainda mais a atração eletrostática entre grupos $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COO}^-$, resultando na diminuição da carga superficial dos complexos.

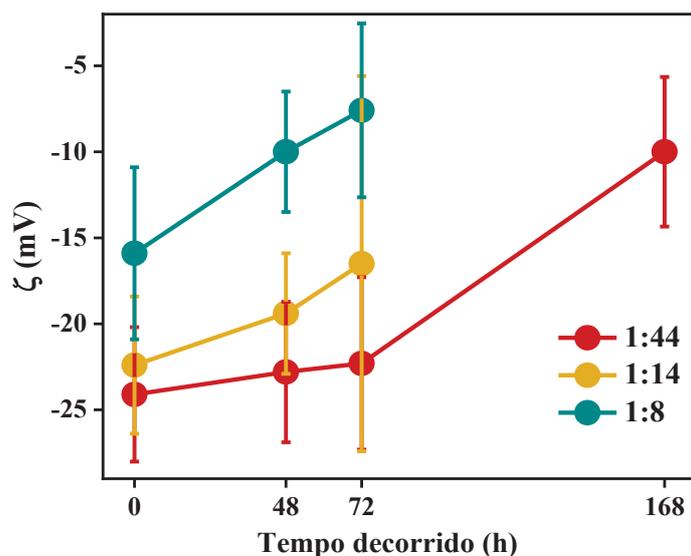


Figura 29. Potencial zeta (ζ) e de complexos de PC e PEI em diferentes proporções poliméricas medido ao longo do tempo. Fonte: A Autora, 2024.

Medidas de tamanho obtidas por DLS estão expostas no Anexo 1, Figura 36. O tamanho dos complexos em 1:44 e 1:14 aumentam progressivamente com o tempo, o que faz sentido considerando que podem estar agregando e formando particulados maiores. Por outro lado, a amostra 1:8, que precipitou imediatamente após preparo, apresenta menor tamanho. É preciso considerar que, após sua precipitação, apenas partículas de complexos muito menores são capazes de permanecer suspensas, sendo desses a medidas de D_h obtidas. Tais partículas, no entanto, não são representativas para a amostra 1:8.

A morfologia dos complexos preparados foi investigada com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas na Figura 30. Nota-se que os complexos preparados por liofilização apresentam morfologia análoga à dispersão de PC liofilizada após diálise, constituída de regiões com fibras e outras mais lisas, parecidas com filme polimérico. A semelhança visual no aspecto das amostras indica que, morfologicamente, não há diferenças na estrutura causadas pela variação da proporção polimérica. Um maior conteúdo de PEI nos complexos causa precipitação, como acontece com a amostra 1:8, mas não altera seu aspecto no geral. Nos espectros de EDS obtidos das imagens de MEV dos complexos (Anexo 1, Figura 37), foi possível verificar a presença de nitrogênio tanto nas fibras e quanto nas regiões mais lisas. Não foi possível identificar um padrão de distribuição do nitrogênio, que indicaria a localização de PEI nas amostras. No entanto, foram observadas regiões de aglomerados na amostra 1:8 com maiores quantidades de nitrogênio, uma vez que se tratam de amostras com maior proporção PEI:PC.

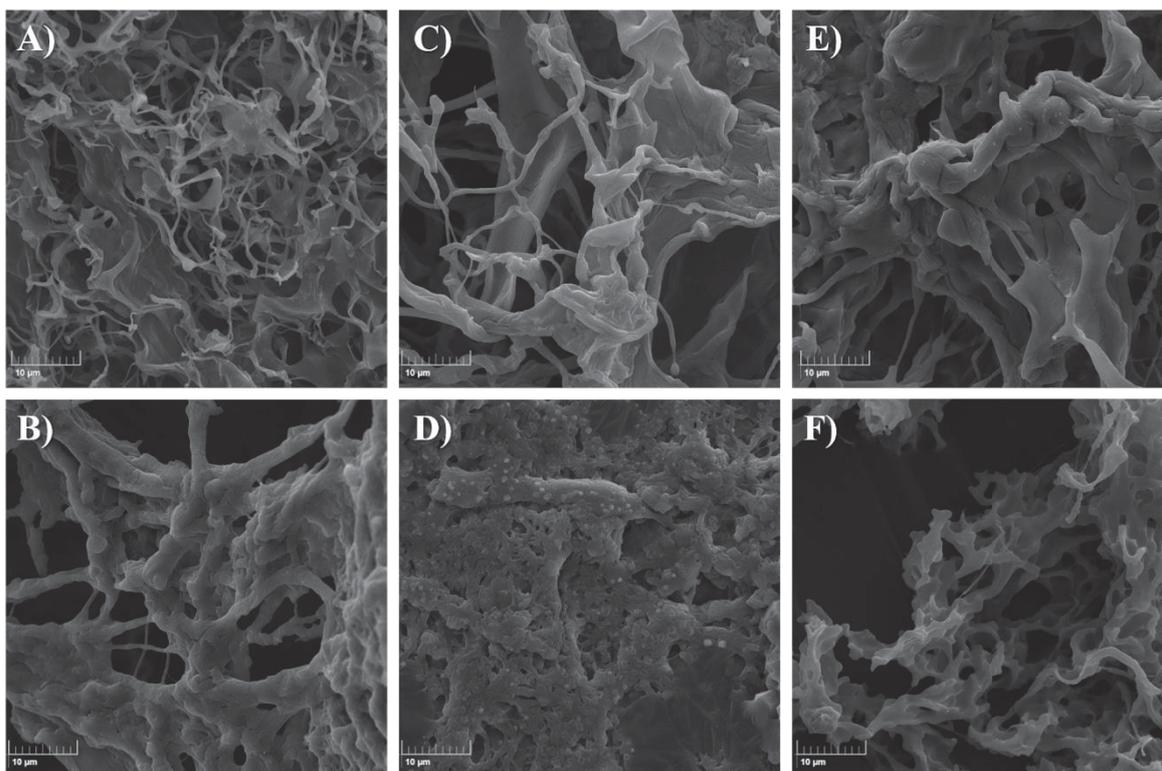


Figura 30. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos complexos nas proporções PEI:PC de 1:44 (A, B), 1:14 (C, D) e 1:8 (E, F). Na linha de cima, amostras preparadas no dia da complexação; em baixo, amostras preparadas 168 h após complexação.

Imagens obtidas 168 h após o preparo mostram estruturas compactas, principalmente para 1:44 e 1:14, ainda sendo distinguíveis regiões com fibras e outros agregados. Durante o tempo que permaneceram dispersos, os complexos passaram por processo de agregação causado por interações intermoleculares atrativas que resultaram na precipitação das dispersões (Figura 27) em estruturas de formato irregular identificadas no MEV. Além da atração eletrostática entre PC e PEI, ligações de hidrogênio entre os grupos funcionais dos dois polímeros, indicadas pela análise de FTIR, devem contribuir para a aproximação dos polímeros e conseqüente formação de agregados. Essa dinâmica nas interações entre os polímeros pode expor grupos carregados, facilitando a formação de um maior número de ligações entre os grupos NH_3^+ da PEI e COO^- da PC. A diminuição do potencial zeta registrada para os três complexos analisados indica que os grupos carregados estão sendo neutralizados no decorrer do tempo, corroborando com essa ideia.

6. CONCLUSÕES

Esse projeto de pesquisa se propôs a investigar detalhadamente o processo de complexação polieletrólítica, utilizando os polieletrólitos pectina cítrica (PC) e poli(etilenoimina) (PEI) ramificada como modelos para o estudo, visando compreender os fatores que influenciam a formação e estabilidade dos complexos.

A caracterização físico-química da PC foi essencial para conhecer melhor o polímero com o qual se trabalhou. Foi elucidado, através da técnica de HPSEC, que o poliânion tem massa molar 100 vezes maior que do polication. A análise da estrutura química dos polímeros por FTIR mostrou que esses apresentam grupos funcionais, -COOH da PC e -NH₂ da PEI, que possibilitam a formação de complexos.

Combinando os polieletrólitos da proporção 1:1, foram estudados os parâmetros de ordem e método de adição, força iônica e pH. A ordem de adição teve efeito sob o tamanho dessas partículas, enquanto a concentração salina utilizada afetou sua estabilidade. Foi encontrado que, adicionando-se lentamente PEI na PC em força iônica controlada de 10 mmol L⁻¹, micropartículas com morfologia esférica bem definida podem ser obtidas. Esses parâmetros otimizados foram adotados nas etapas seguintes do trabalho.

Duas condições de pH foram comparadas para avaliar o efeito desse parâmetro na complexação. Em pH 10, a atração entre PC e PEI acontece mais brandamente que em pH 5, no qual os polímeros apresentam maior densidade de carga. Essa alteração afetou a morfologia e a estabilidade dos complexos formados. Para trabalhar nesse pH, em que tanto a PC quanto a PEI estão majoritariamente carregadas, é necessário utilizar uma proporção mássica diferente de 1:1, garantindo o equilíbrio das cargas.

A proporção PEI:PC foi variada e os complexos resultantes apresentaram comportamentos distintos que foram caracterizados para compreensão desse efeito. Aumentando gradativamente o conteúdo de PEI nos complexos, a PC vai sendo neutralizada, até atingir a proporção de 1:9, na qual a quantidade de cargas positivas se iguala a quantidade de cargas negativas. Após esse valor, observou-se a precipitação imediata das amostras, que pode ter acontecido pela repulsão minimizada entre complexos cuja carga superficial era relativamente baixa.

A última variável analisada neste trabalho foi o tempo, por meio da avaliação da estabilidade dos complexos ao longo de 168 h (sete dias). O aspecto visual, as medidas de potencial zeta e as imagens de MEV indicaram a formação progressiva de agregados, culminando na formação de estruturas compactas que precipitaram após o período observado. A análise por FTIR revelou a presença de ligações de hidrogênio intra- e

intermoleculares, capazes de promover mudanças conformacionais, reduzir a carga superficial dos complexos ao longo do tempo e favorecer a formação dessas estruturas mais densas. A proporção 1:9 foi a melhor condição para obtenção de complexos polieletrólíticos de PC e PEI em pH 5, uma vez que permaneceu estável, ou seja, dispersa, durante um período apreciável de tempo (~120 h), com bom rendimento de complexos formados.

Assim, conclui-se que PECs estáveis de PC e PEI podem ser formados em condições específicas de força iônica, pH e razão entre os polímeros e suas cargas. Os estudos realizados neste trabalho contribuem para a compreensão fundamental da complexação polieletrólítica entre a PC e a PEI ramificada. Os resultados obtidos aqui são interessantes para aplicação no desenvolvimento de sistemas coloidais funcionais baseados em PECs desses polímeros, como sistemas de liberação controlada, adsorventes para remediação ambiental e veículos para imobilização de biomoléculas.

REFERÊNCIAS

- [1] C. G. Otoni, M. V. A. Queirós, J. B. Sabadini, O. J. Rojas, and W. Loh, “Charge Matters: Electrostatic Complexation As a Green Approach to Assemble Advanced Functional Materials,” *ACS Omega*, vol. 5, no. 3, pp. 1296–1304, 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b03690.
- [2] W. C. Blocher and S. L. Perry, “Complex coacervate-based materials for biomedicine,” *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 4, pp. 76–78, 2017, doi: 10.1002/wnan.1442.
- [3] H. J. Kim, B. Yang, T. Y. Park, S. Lim, and H. J. Cha, “Complex coacervates based on recombinant mussel adhesive proteins: Their characterization and applications,” *Soft Matter*, vol. 13, no. 42, pp. 7704–7716, 2017, doi: 10.1039/c7sm01735a.
- [4] B. C. Silva *et al.*, “Polyelectrolyte complexes from gum arabic and gelatin : Optimal complexation pH as a key parameter to obtain reproducible microcapsules,” vol. 46, pp. 201–207, 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.12.022.
- [5] E. Ban and A. Kim, “Coacervates: Recent developments as nanostructure delivery platforms for therapeutic biomolecules,” *Int. J. Pharm.*, vol. 624, no. July, p. 122058, 2022, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122058.
- [6] A. C. Q. Silva, A. J. D. Silvestre, C. Vilela, and C. S. R. Freire, “Natural Polymers-Based Materials : A Contribution to a Greener Future,” *Molecules*, 2022.
- [7] S. Follonier, M. Pusnik, and M. Zinn, *2 - Natural polymers: a source of inspiration*. Elsevier Ltd, 2017. doi: 10.1016/B978-0-08-100262-9.00002-1.
- [8] L. J. C. Albuquerque *et al.*, “Sweet Vector for Gene Delivery: the Sugar Decoration of Polyplexes Reduces Cytotoxicity with a Balanced Effect on Gene Expression,” *Macromol. Biosci.*, vol. 18, no. 2, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1002/mabi.201700299.
- [9] S. S. Shiekh, M. Waqas Ahmad, M. Wasim, A. Sabir, M. Shafiq, and R. Ullah Khan, “Designing pectin and hyperbranched polyethylene imine based hydrogel for the removal and adsorption of ionic dyes,” *J. Mol. Liq.*, vol. 390, no. PA, p. 122964, 2023, doi: 10.1016/j.molliq.2023.122964.
- [10] S. Das, A. Chaudhury, and K. Y. Ng, “Polyethyleneimine-modified pectin beads for colon-specific drug delivery: In vitro and in vivo implications,” *J. Microencapsul.*, vol. 28, no. 4, pp. 268–279, 2011, doi: 10.3109/02652048.2011.559284.
- [11] T. Min *et al.*, “Enzyme-responsive food packaging system based on pectin-coated poly (lactic acid) nanofiber films for controlled release of thymol,” *Food Res. Int.*, vol. 157, no. April, p. 111256, 2022, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111256.
- [12] D. Myers, *Surfaces, interfaces, and colloids*, vol. 4. 1999.
- [13] J. Fu and J. B. Schlenoff, “Driving Forces for Oppositely Charged Polyion Association in Aqueous Solutions: Enthalpic, Entropic, but Not Electrostatic,” *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, doi: 10.1021/jacs.5b11878.
- [14] J. van der Gucht, E. Spruijt, M. Lemmers, and M. A. Cohen Stuart, “Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 361, no. 2, pp. 407–422, 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.05.080.
- [15] C. E. Sing, “Development of the modern theory of polymeric complex coacervation,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 239, pp. 2–16, 2017, doi: 10.1016/j.cis.2016.04.004.
- [16] J. Chen, Q. Peng, X. Peng, H. Zhang, and H. Zeng, “Probing and Manipulating Noncovalent Interactions in Functional Polymeric Systems,” *Chem. Rev.*, vol. 122, no. 18, pp. 14594–14678, 2022, doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00215.
- [17] Y. S. Lee, *Self-Assembly and Nanotechnology: A Force Balance Approach*. 2008.
- [18] R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, and J. Youngblood, *Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites*, vol. 40, no. 7. 2011. doi: 10.1039/c0cs00108b.

- [19] X. Peng *et al.*, “Coacervate-Derived Hydrogel with Effective Water Repulsion and Robust Underwater Bioadhesion Promotes Wound Healing,” *Adv. Sci.*, vol. 9, no. 31, pp. 1–14, 2022, doi: 10.1002/advs.202203890.
- [20] H. M. Fares, Y. E. Ghossoub, J. D. Delgado, J. Fu, V. S. Urban, and J. B. Schleno, “Scattering Neutrons along the Polyelectrolyte Complex/Coacervate Continuum,” no. 1, 2018, doi: 10.1021/acs.macromol.8b00699.
- [21] Q. Wang and J. B. Schleno, “The Polyelectrolyte Complex/Coacervate Continuum,” 2014.
- [22] H. Li, M. Fauquignon, M. Haddou, C. Schatz, and J. P. Chapel, “Interfacial behavior of solid-and liquid-like polyelectrolyte complexes as a function of charge stoichiometry,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 21, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3390/polym13213848.
- [23] M. H. G. Canteri and A. De P, “Pectina : da Matéria-Prima ao Produto Final A R T I G O,” vol. 22, pp. 149–157, 2012.
- [24] S. Kumar, J. Konwar, M. Das Purkayastha, S. Kalita, A. Mukherjee, and J. Dutta, “Current progress in valorization of food processing waste and by-products for pectin extraction,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 239, no. January, p. 124332, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124332.
- [25] K. Youssef, M. Iacomini, F. Fogagnoli, and L. M. C. Cordeiro, “High methoxyl pectin from the soluble dietary fiber of passion fruit peel forms weak gel without the requirement of sugar addition,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 246, no. March, p. 116616, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116616.
- [26] F. Dranca and M. Oroian, “Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications,” *Food Res. Int.*, vol. 113, no. February, pp. 327–350, 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.065.
- [27] B. L. H. M. Sperber, H. A. Schols, M. A. Cohen Stuart, W. Norde, and A. G. J. Voragen, “Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin,” *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 3, pp. 765–772, 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.04.008.
- [28] S. Singhal and N. R. Swami Hulle, “Citrus pectins: Structural properties, extraction methods, modifications and applications in food systems – A review,” *Appl. Food Res.*, vol. 2, no. 2, p. 100215, 2022, doi: 10.1016/j.afres.2022.100215.
- [29] W. Hu, H. Cheng, D. Wu, J. Chen, X. Ye, and S. Chen, “Enhanced extraction assisted by pressure and ultrasound for targeting RG-I enriched pectin from citrus peel wastes: A mechanistic study,” *Food Hydrocoll.*, vol. 133, no. May, p. 107778, 2022, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107778.
- [30] S. Talekar, R. Vijayraghavan, A. Arora, and A. F. Patti, “Greener production of low methoxyl pectin via recyclable enzymatic de-esterification using pectin methylesterase cross-linked enzyme aggregates captured from citrus peels,” *Food Hydrocoll.*, vol. 108, no. September 2019, p. 105786, 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105786.
- [31] M. Ma, J. Cui, C. Li, C. Blecker, and J. Zheng, “Challenges in the characterization of pectin conformation: Integrated analysis using atomic force microscopy and small-angle X-ray scattering methods,” *Food Hydrocoll.*, vol. 162, no. December 2024, p. 110973, 2025, doi: 10.1016/j.foodhyd.2024.110973.
- [32] K. Alba and V. Kontogiorgos, “Emulsification properties of pectin,” *Pectin Technol. Physiol. Prop.*, pp. 83–97, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-53421-9_5.
- [33] S. Roy, R. Priyadarshi, Ł. Ł. D. Biswas, V. Chandel, and J. Rhim, “International Journal of Biological Macromolecules Recent progress in pectin extraction , characterization , and pectin-based films for active food packaging applications : A review,” vol. 239, no. March, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124248.

- [34] A. C. JASKI, “HIDROGÉIS BINÁRIOS DE POLI (ÁLCOOL) VINÍLICO E PECTINAS: AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E UTILIZAÇÃO COMO FASE EXTRATORA,” Universidade Federal do Paraná, 2019.
- [35] R. Eivazzadeh-Keihan *et al.*, “Recent advances on biomedical applications of pectin-containing biomaterials,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 217, no. June, pp. 1–18, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.016.
- [36] B. Kocaaga, O. Kurkcuoglu, M. Tatlier, S. Batirel, and F. S. Guner, “Low-methoxyl pectin–zeolite hydrogels controlling drug release promote in vitro wound healing,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 24, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1002/app.47640.
- [37] K. Song *et al.*, “Preparation of pectin-chitosan hydrogels based on bioadhesive-design micelle to prompt bacterial infection wound healing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 300, no. October 2022, p. 120272, 2023, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120272.
- [38] N. S. Said, I. F. Olawuyi, and W. Y. Lee, “Pectin Hydrogels: Gel-Forming Behaviors, Mechanisms, and Food Applications,” *Gels*, vol. 9, p. 732, 2023, [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/g9090732>
- [39] V. B. V. Maciel, C. M. P. Yoshida, and T. T. Franco, “Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 132, pp. 537–545, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.047.
- [40] M. P. M. Da Costa, I. L. De Mello Ferreira, and M. T. De Macedo Cruz, “New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 146, pp. 123–130, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.03.025.
- [41] W. Xiong, Y. Li, C. Ren, J. Li, B. Li, and F. Geng, “Thermodynamic parameters of gelatin-pectin complex coacervation,” *Food Hydrocoll.*, vol. 120, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106958.
- [42] X. Zhou, X. Feng, W. Qi, J. Zhang, and L. Chen, “Microencapsulation of vitamin E by gelatin-high/low methoxy pectin complex coacervates: Effect of pH, pectin type, and protein/polysaccharide ratio,” *Food Hydrocoll.*, vol. 151, no. January, p. 109794, 2024, doi: 10.1016/j.foodhyd.2024.109794.
- [43] Y. Kawagoe, D. Surblys, H. Matsubara, G. Kikugawa, and T. Ohara, “Construction of polydisperse polymer model and investigation of heat conduction: A molecular dynamics study of linear and branched polyethylenimine,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 180, no. June, p. 121721, 2019, doi: 10.1016/j.polymer.2019.121721.
- [44] K. Yasuhara, M. Tsukamoto, Y. Tsuji, and J. ichi Kikuchi, “Unique concentration dependence on the fusion of anionic liposomes induced by polyethyleneimine,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 415, pp. 461–467, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.01.024.
- [45] B. M. Jun, T. P. N. Nguyen, S. H. Ahn, I. C. Kim, and Y. N. Kwon, “The application of polyethyleneimine draw solution in a combined forward osmosis/nanofiltration system,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 27, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1002/app.42198.
- [46] S. Mohanty, J. Swarup, S. Priya, R. Jain, and G. Singhvi, “Exploring the potential of polysaccharide-based hybrid hydrogel systems for their biomedical and therapeutic applications: A review,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 256, no. P1, p. 128348, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128348.
- [47] E. Czuba-Wojnilowicz, “Material-based gene therapy approaches for HIV and neurodegenerative diseases,” no. March, pp. 0–1, 2020.
- [48] A. Kumar, S. Sachi Das, S. Tambe, B. Kaundal, S. K. Sarraf, and K. K. Kesari, “Unravelling the potential role of polyethyleneimine (PEI)-based nanosystems in skin cancer therapy,” *Mater. Adv.*, vol. 6, pp. 490–507, 2024, doi: 10.1039/d4ma00802b.
- [49] N. Fattahi *et al.*, “PEI-based functional materials: Fabrication techniques, properties, and biomedical applications,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 325, no. February,

- 2024, doi: 10.1016/j.cis.2024.103119.
- [50] R. Rai, S. Alwani, and I. Badea, “Polymeric nanoparticles in gene therapy: New avenues of design and optimization for delivery applications,” *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 4, 2019, doi: 10.3390/polym11040745.
- [51] C. A. S. Ribeiro *et al.*, “One-pot synthesis of sugar-decorated gold nanoparticles with reduced cytotoxicity and enhanced cellular uptake,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 580, no. April, p. 123690, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.123690.
- [52] Q. Q. Zhao, J. L. Chen, M. Han, W. Q. Liang, Y. Tabata, and J. Q. Gao, “Combination of poly(ethylenimine) and chitosan induces high gene transfection efficiency and low cytotoxicity,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 105, no. 1, pp. 65–68, 2008, doi: 10.1263/jbb.105.65.
- [53] W. Wang *et al.*, “Manothermosonication (MTS) treatment by a continuous-flow system: Effects on the degradation kinetics and microstructural characteristics of citrus pectin,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 63, no. November 2019, 2020, doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.104973.
- [54] L. C. Lopes, F. F. Simas-Tosin, T. R. Cipriani, L. F. Marchesi, M. Vidotti, and I. C. Riegel-Vidotti, “Effect of low and high methoxyl citrus pectin on the properties of polypyrrole based electroactive hydrogels,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 155, pp. 11–18, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.08.050.
- [55] X. Pan *et al.*, “Physicochemical and structural properties of three pectin fractions from muskmelon (*Cucumis melo*) and their correlation with juice cloud stability,” *Food Hydrocoll.*, vol. 124, no. PB, p. 107313, 2022, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.107313.
- [56] C. E. P. da Silva, M. A. S. de Oliveira, F. F. Simas, and I. C. Riegel-Vidotti, “Physical chemical study of zein and arabinogalactans or glucuronomannans polyelectrolyte complexes and their film-forming properties,” *Food Hydrocoll.*, vol. 100, no. September 2019, p. 105394, 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105394.
- [57] D. A. Skoog, D. M. West, J. F. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed. 2005.
- [58] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances,” pp. 350–356.
- [59] M. Kurzyna-Szklarek, J. Cybulska, and A. Zdunek, “Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates – An overview of methods,” *Food Chem.*, vol. 394, no. February, p. 133466, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133466.
- [60] Y. Jiang, Y. Xu, F. Li, D. Li, and Q. Huang, “Pectin extracted from persimmon peel : A physicochemical characterization and emulsifying properties evaluation,” *Food Hydrocoll.*, vol. 101, no. November 2019, p. 105561, 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105561.
- [61] A. Synytsya, J. Čopíková, P. Matějka, and V. Machovič, “Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 54, no. 1, pp. 97–106, 2003, doi: 10.1016/S0144-8617(03)00158-9.
- [62] K. li Fu, J. ping Liu, and D. nian Lu, “The pectin substance used to detect the activity of pectinase suitable for bioscouring,” *J. Text. Inst.*, vol. 105, no. 1, pp. 12–19, 2014, doi: 10.1080/00405000.2013.807021.
- [63] T. Tsoufis, F. Katsaros, Z. Sideratou, B. J. Kooi, M. A. Karakassides, and A. Siozios, “Intercalation study of low-molecular-weight hyperbranched polyethyleneimine into graphite oxide,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 20, no. 26, pp. 8129–8137, 2014, doi: 10.1002/chem.201304599.
- [64] A. Kasprzak, M. Popławska, M. Bystrzejewski, O. Łabedz, and I. Grudziński, “RSC Advances,” vol. 5, pp. 85556–85567, 2015, doi: 10.1039/c5ra17912b.
- [65] S. S. Suner, “Degradable, biocompatible, and antibacterial polygalacturonic

- acid/polyethyleneimine polyplex particles,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 34, no. 6, pp. 2001–2009, 2023, doi: 10.1002/pat.6027.
- [66] C. N. Pace, G. R. Grimsley, and J. M. Scholtz, “Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 20, pp. 13285–13289, 2009, doi: 10.1074/jbc.R800080200.
- [67] A. Grein-Iankovski *et al.*, “A comprehensive study of the relation between structural and physical chemical properties of acacia gums,” *Food Hydrocoll.*, vol. 85, no. October 2017, pp. 167–175, 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.011.
- [68] K. A. Curtis, D. Miller, P. Millard, S. Basu, F. Horkay, and P. L. Chandran, “Unusual salt and pH induced changes in polyethylenimine solutions,” *PLoS One*, vol. 11, no. 9, pp. 1–20, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158147.
- [69] M. S. ZILSE, “Estudo das propriedades de pectinas em dispersão e sua utilização na formação de hidrogéis com poli(etilenoimina),” Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.
- [70] H. Zhang *et al.*, “Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel,” *Food Hydrocoll.*, vol. 79, pp. 579–586, 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.12.002.
- [71] M. Haj Romdhane *et al.*, “Optimization of extraction with salicylic acid, rheological behavior and antiproliferative activity of pectin from *Citrus sinensis* peels,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 159, pp. 547–556, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.125.
- [72] G. V. Lowry *et al.*, “Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS,” *Environ. Sci. Nano*, vol. 3, no. 5, pp. 953–965, 2016, doi: 10.1039/c6en00136j.
- [73] M. Mousazadeh, M. Mousavi, G. Askari, H. Kiani, I. Adt, and A. Gharsallaoui, “Thermodynamic and physiochemical insights into chickpea protein-Persian gum interactions and environmental effects,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 119, pp. 1052–1058, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.168.
- [74] D. Zhao *et al.*, “Exploring structural variations of hydrogen-bonding patterns in cellulose during mechanical pulp refining of tobacco stems,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 204, no. October 2018, pp. 247–254, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.024.

ANEXO 1 – MATERIAL COMPLEMENTAR

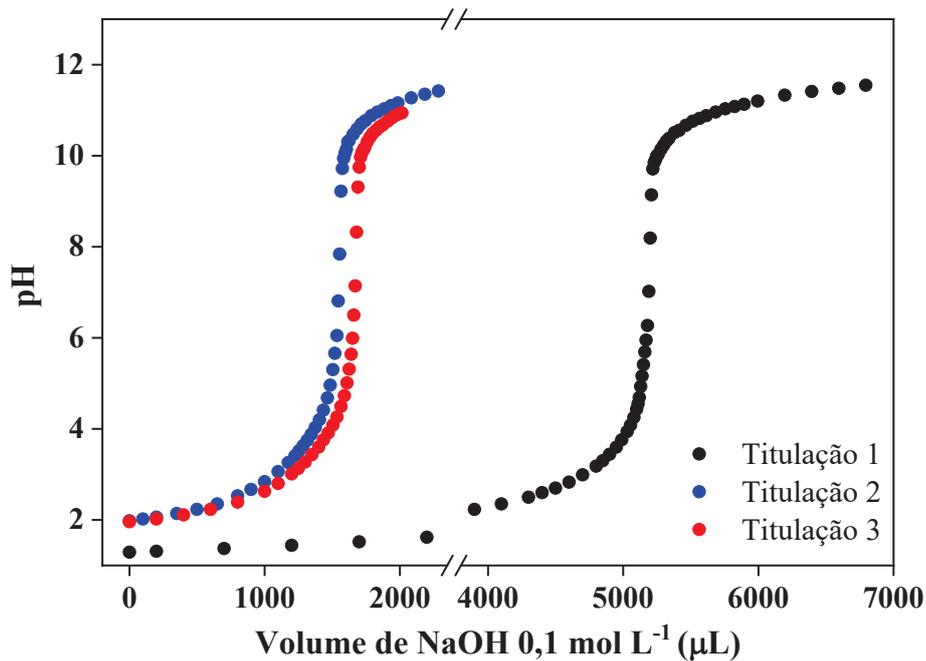


Figura 31. Curvas de titulação da PC 0,2% (m v^{-1}) em NaCl 10 mmol L^{-1} com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em temperatura de 25°C . Fonte: A Autora, 2024.

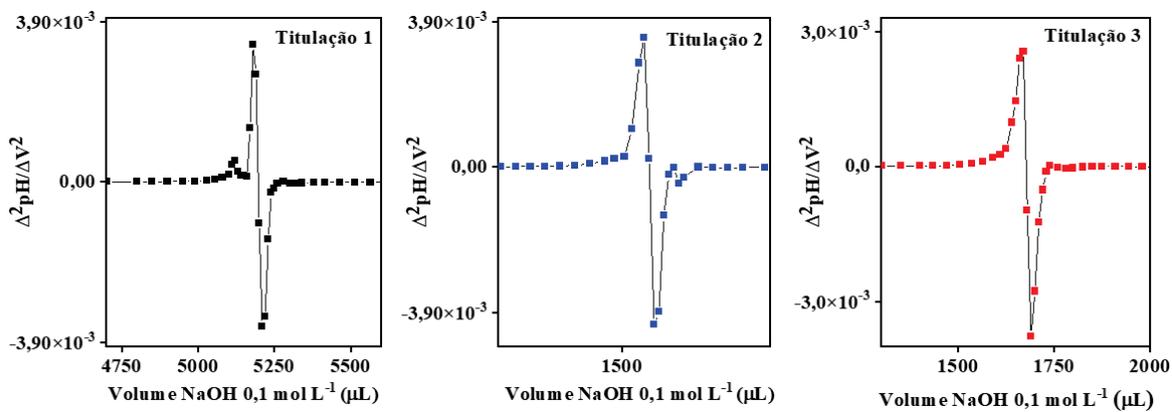


Figura 32. Gráficos de 2^{a} derivada das titulações ácido-base da PC.

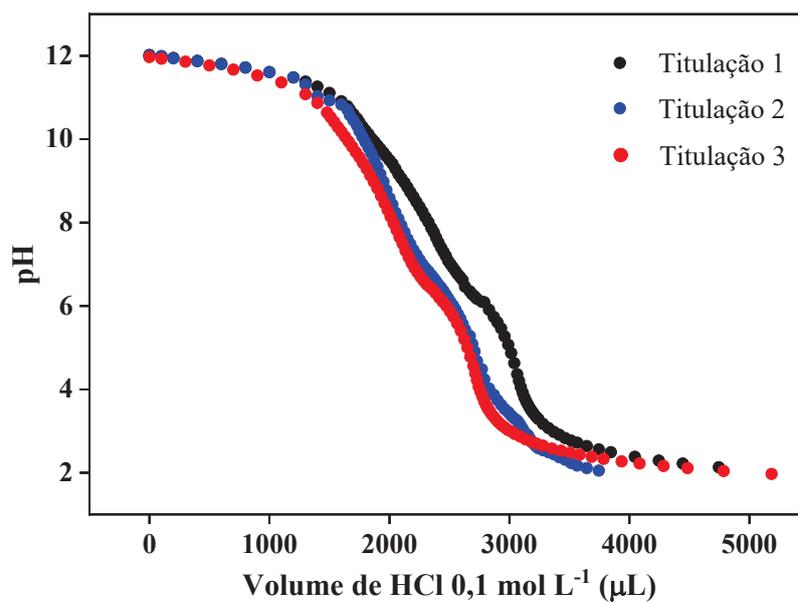


Figura 33. Curvas de titulação da PEI 0,02% (m v^{-1}) em NaCl 10 mmol L^{-1} com HCl 0,1 mol L^{-1} em temperatura de 25°C. Fonte: A Autora, 2024.

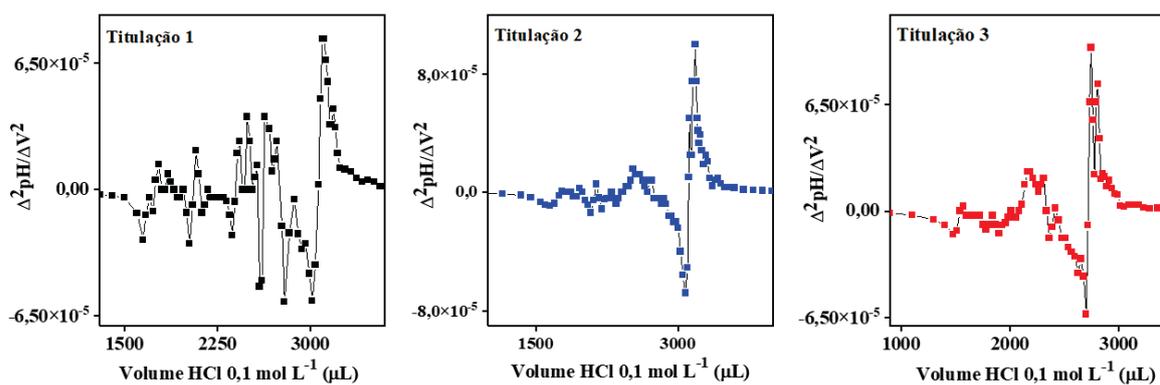


Figura 34. Gráficos de 2ª derivada das titulações ácido-base da PEI.

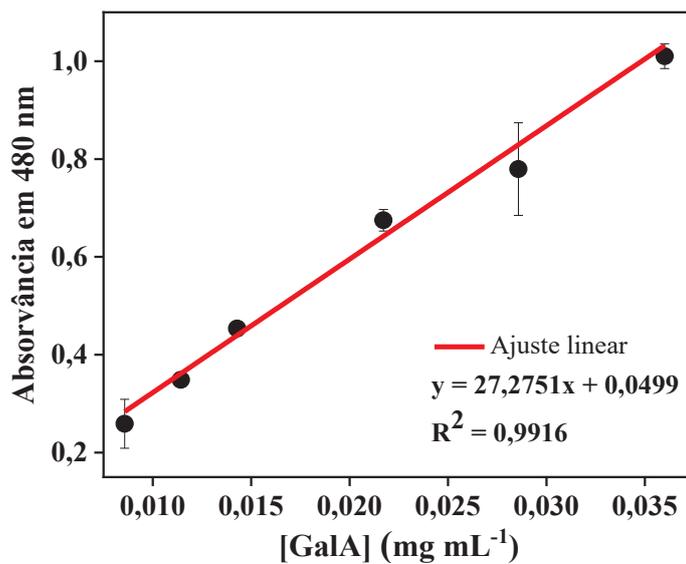


Figura 35. Curva analítica de ácido galacturônico (GalA) para determinação pelo método colorimétrico de Dubois. Fonte: A Autora, 2024.

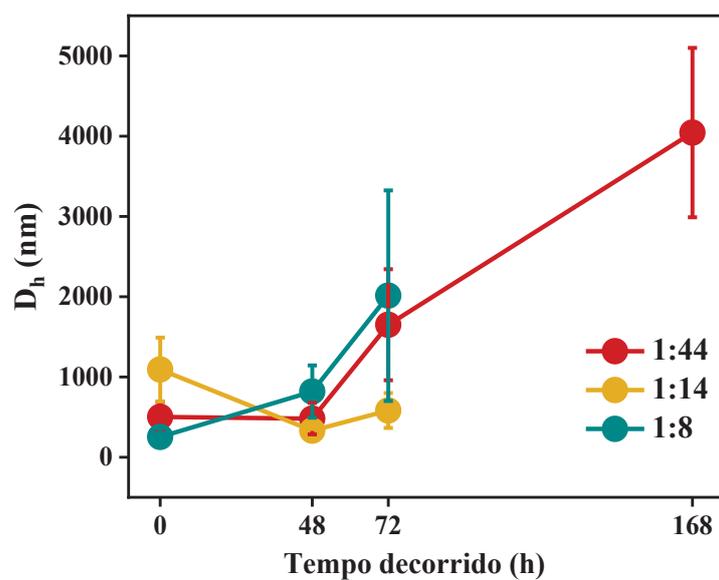
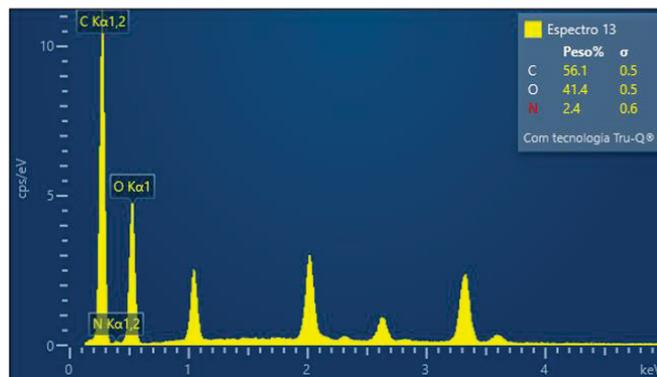
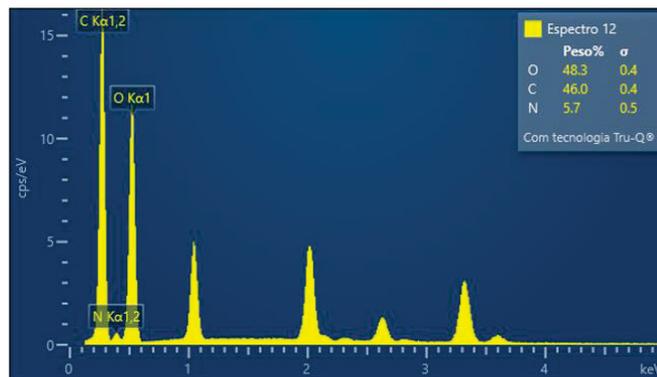
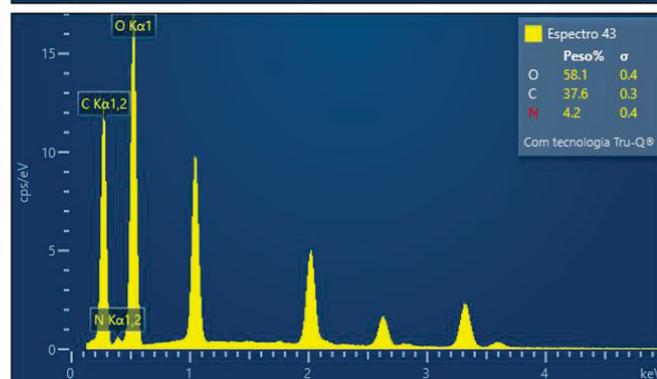
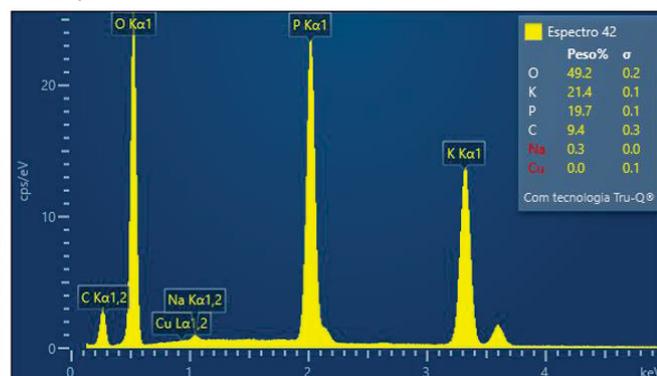
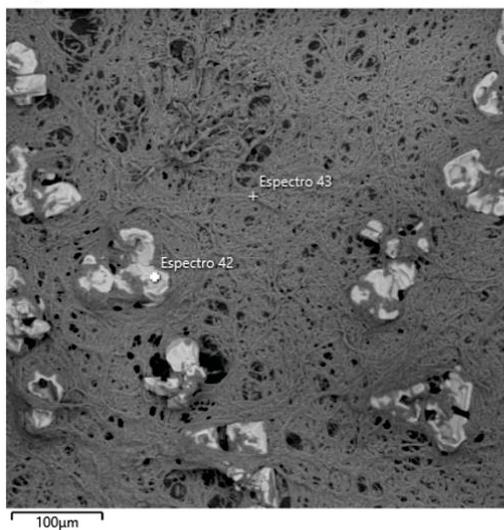


Figura 36. Tamanho médio (D_h) determinado pela distribuição de intensidade de complexos de PC e PEI em diferentes proporções poliméricas medido ao longo do tempo. Fonte: A Autora, 2024.

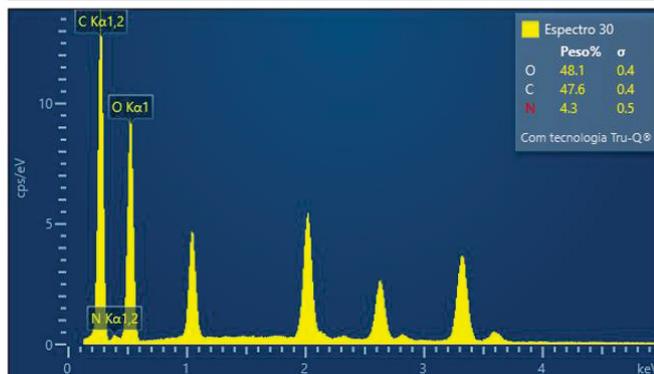
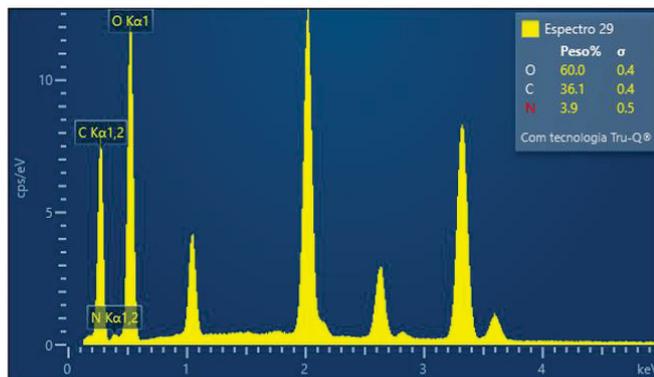
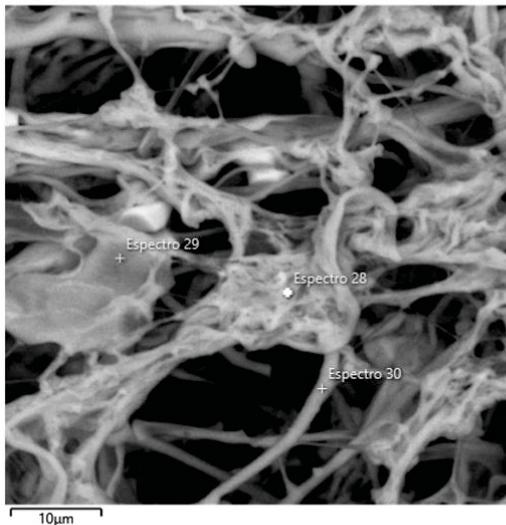
A) PEI/PC = 1:44, t = 0 h



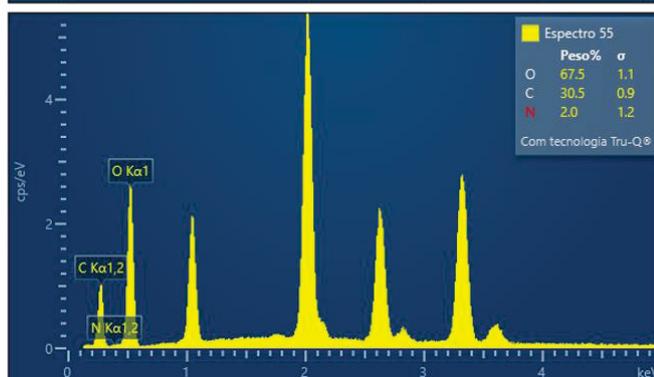
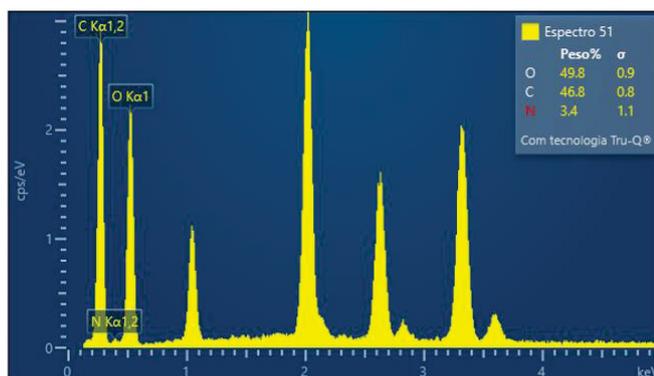
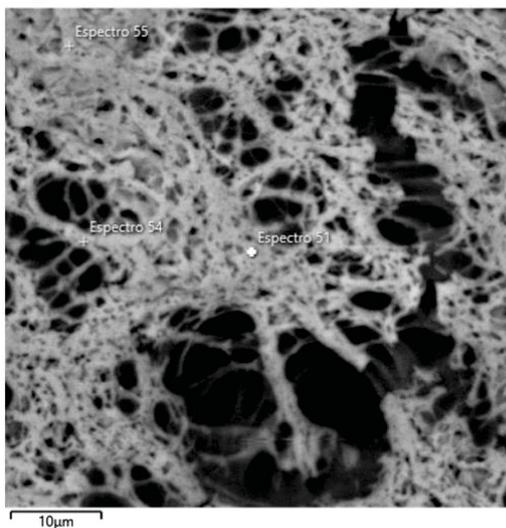
B) PEI/PC = 1:44, t = 168 h



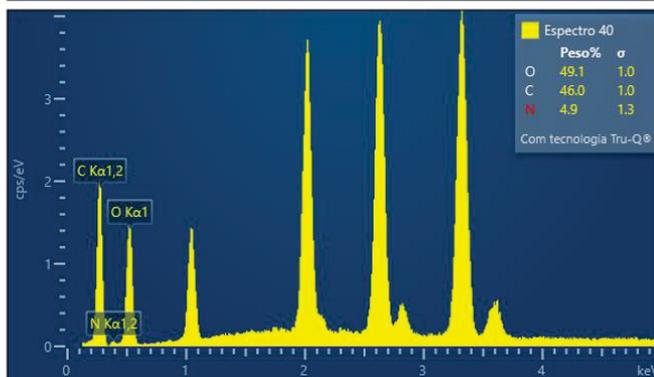
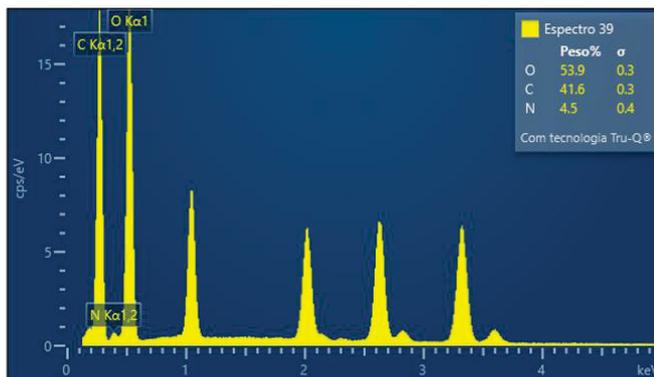
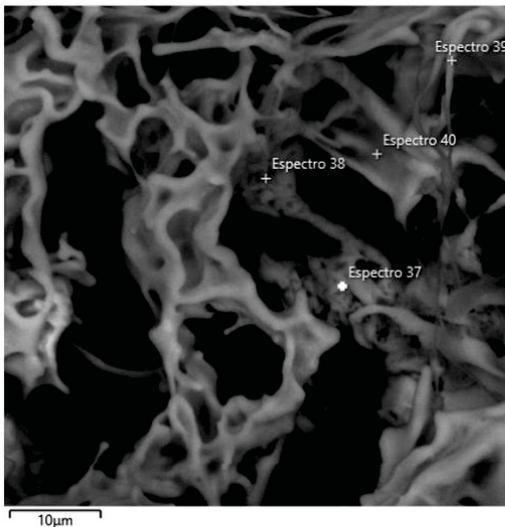
C) PEI/PC = 1:14, t = 0 h



D) PEI/PC = 1:14, t = 168 h



E) PEI/PC = 1:8, t = 0 h



F) PEI/PC = 1:8, t = 168 h

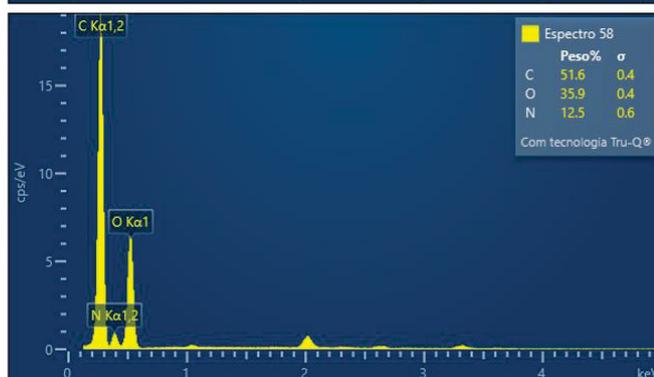
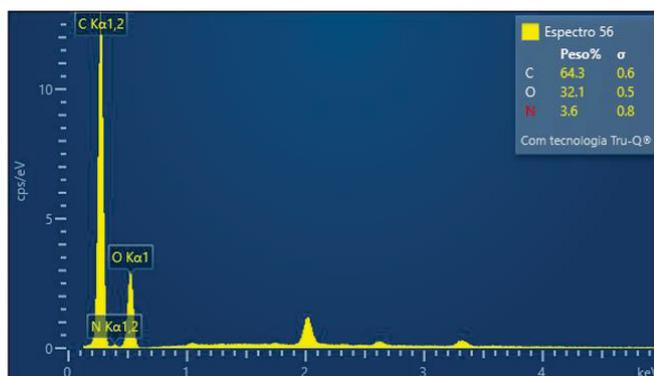
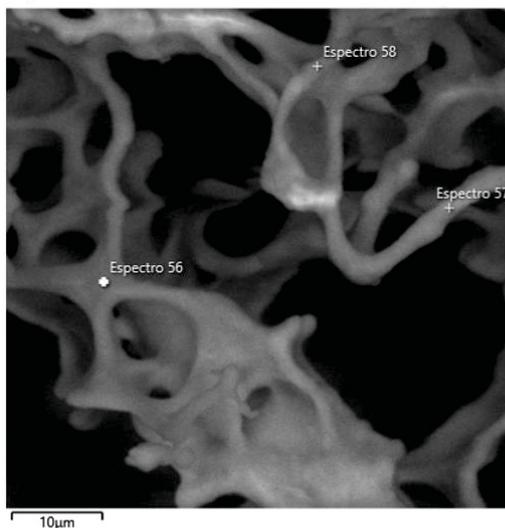


Figura 37. Espectros de EDS dos complexos nas proporções PEI:PC de 1:44 (A, B), 1:14 (C, D) e 1:8 (E, F). Fonte: A Autora, 2024.

Tabela 3. Distribuição de tamanho por intensidade das amostras 1 a 14 da curva de titulação obtido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (A Autora, 2024).

| Amostra | Representação PEI:PC (m/m) | Pico (nm)* | σ (nm) | Área do pico (%) |
|---------|----------------------------|------------|---------------|------------------|
| 1 | 1:200 | 596 | 236 | 99 |
| 2 | 1:80 | 747 | 381 | 92 |
| 3 | 1:44 | 685 | 470 | 99 |
| 4 | 1:29 | 611 | 393 | 88 |
| 5 | 1:22 | 537 | 254 | 49 |
| 6 | 1:17 | 769 | 446 | 61 |
| 7 | 1:14 | 5247 | 443 | 49 |
| 8 | 1:11 | 2081 | 296 | 51 |
| 9 | 1:9 | 690 | 163 | 55 |
| 10 | 1:8 | 499 | 85 | 100 |
| 11 | 1:7 | 431 | 89 | 57 |
| 12 | 1:5 | 292 | 94 | 99 |
| 13 | 1:4 | 357 | 89 | 100 |
| 14 | 1:3 | 347 | 81 | 100 |

*Pico de maior área

Tabela 4. Distribuição de tamanho por número das amostras 1 a 14 da curva de titulação obtido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (A Autora, 2024).

| Amostra | Representação PEI:PC (m/m) | Pico (nm)* | σ (nm) | Área do pico (%) |
|---------|----------------------------|------------|---------------|------------------|
| 1 | 1:200 | 464 | 213 | 100 |
| 2 | 1:80 | 105 | 43 | 90 |
| 3 | 1:44 | 326 | 234 | 48 |
| 4 | 1:29 | 310 | 196 | 40 |
| 5 | 1:22 | 379 | 284 | 100 |
| 6 | 1:17 | 332 | 282 | 100 |
| 7 | 1:14 | 264 | 56 | 68 |
| 8 | 1:11 | 214 | 35 | 67 |
| 9 | 1:9 | 190 | 65 | 94 |
| 10 | 1:8 | 487 | 101 | 100 |
| 11 | 1:7 | 79 | 19 | 64 |
| 12 | 1:5 | 252 | 74 | 100 |
| 13 | 1:4 | 316 | 83 | 100 |
| 14 | 1:3 | 311 | 76 | 100 |

*Pico de maior área