



RENATA MILIANI MARTINEZ

**Preparação e caracterização de partículas coloidais
de pectina cítrica e de peptonas vegetais para
aplicação em cosméticos**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

RENATA MILIANI MARTINEZ

Preparação e caracterização de partículas coloidais de pectina cítrica e de peptonas vegetais para aplicação em cosméticos

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida pela aluna Renata Miliani Martinez e orientada pela Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "MHA Santana", is placed below the text.

CAMPINAS

2013

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M366p Martinez, Renata Miliani, 1987-
Preparação e caracterização de partículas coloidais de pectina cítrica e de peptonas vegetais para aplicação em cosméticos / Renata Miliani Martinez. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Pectina. 2. Peptonas. 3. Nanopartículas. 4. Cosméticos. 5. Reticulação. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and characterization of colloidal particles of citrus pectin and vegetable peptones for use in cosmetics

Palavras-chave em inglês:

Pectin
Peptone
Nanoparticles
Cosmetics
Crosslinking

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Helena Andrade Santana [Orientador]
Ana Silvia Prata
Samantha Cristina de Pinho

Data de defesa: 30-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Renata Miliani Martinez e aprovada em 30 de julho de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Professora Dra. Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP



Professora Dra. Ana Silvia Prata
Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP



Professora Dra. Samantha Cristina de Pinho
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP

*"When you wish upon a star, makes no difference who you
are. Anything your heart desires will come to you"*

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Helena Andrade Santana agradeço pela oportunidade, pela orientação e por ter aberto tantas portas.

À empresa Chemyunion pelo apoio financeiro e técnico, cooperando ativamente para a execução deste trabalho.

Ao Professor Edvaldo Sabadini do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da Unicamp pela utilização do reômetro e ao seu aluno de doutorado, Tiago Ito pela colaboração e disponibilidade.

Ao Gilson Barbosa Maia Jr., técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB), pelo auxílio e amizade em todos os momentos.

Aos colegas do LDPB, que estiveram presentes no período de disciplinas, de execução do projeto, seminários, congressos e comemorações no laboratório. O tempo de mestrado não teria sido tão proveitoso se vocês não estivessem comigo.

À minha amiga e exemplo de pesquisadora, Andréa Shimojo, por ter me ensinado a utilizar o reômetro, por tirar minhas dúvidas de química e por ser uma mãe no laboratório para todos.

Ao meu amigo Rafael Zômpero, por toda a consultoria em engenharia química, pelo exemplo de tranqüilidade e por ser um grande amigo em qualquer hora. Obrigada por todas as quartas.

À minha segunda família: Ivone, Paulo, Eduardo e João Paulo por terem me incentivado ativamente em todas as etapas deste trabalho. Por terem me acolhido em Campinas e por serem pessoas tão importantes para mim. Especialmente agradeço ao João, pela paciência, compreensão e por estar sempre ao meu lado, independente da distância entre nós.

À minha família oficial: Neusa, Eliseu, Mônica e Mariana, agradeço por ter tido a oportunidade de vivenciar todos esses momentos. Pelo apoio, pela atenção, pelo amor. À vocês minha gratidão eterna.

RESUMO

O uso de matérias-primas sustentáveis, biodegradáveis e biocompatíveis é de grande interesse em aplicações farmacêuticas e cosméticas. O mercado cosmético situa-se em pleno processo de desenvolvimento, principalmente na área de produtos capilares, apresentando vendas expressivas no Brasil. Esse crescimento acarreta na necessidade de produtos inovadores, polivalentes e seguros para oferecimento aos consumidores. Neste âmbito, as partículas poliméricas coloidais têm ocupado posição de destaque no cenário mundial, marcando a presença da nanotecnologia em produtos cosméticos. Uma grande variedade de matérias-primas naturais ou sintéticas são polieletrólitos, cuja reticulação eletrostática em condições controladas produz partículas coloidais. A pectina cítrica e as peptonas vegetais fazem parte dos polieletrólitos, cuja origem vegetal tem sido preferida para as aplicações em cosméticos, em substituição a produtos de origem animal ou inorgânica. Neste trabalho, foi estudada a produção de partículas coloidais de pectina cítrica e das peptonas de soja e trigo, reticuladas com cloreto de cálcio e goma guar quaternizada. Em todos os casos, a produção das partículas foi realizada em processo descontínuo, simples, escalonável e na ausência de solventes orgânicos, envolvendo o gotejamento de solução do agente reticulante sobre a solução do polieletrólito sob agitação mecânica. Os resultados mostraram que para a pectina cítrica, o tamanho e a polidispersidade das partículas foram controlados pelo grau de esterificação, agente reticulante e concentração inicial de eletrólito em solução. Para obtenção de partículas em escala nanométrica, a concentração da pectina foi de 10,0 g/l e a concentração do agente reticulante foi 1,0% (m/v). As partículas obtidas conferiram viscoelasticidade à mistura de solução de pectina e copolímero catiônico (poliquaternium-7). A viscoelasticidade foi dependente da proporção e do diâmetro das partículas de pectina, com contribuição semelhante das partículas micro e nanométricas para formações viscoelásticas. No caso das peptonas vegetais, as de trigo tiveram o seu melhor desempenho na formação de nanopartículas com menor polidispersidade. As partículas obtidas atenderam às características físico-químicas de composição, tamanho e polidispersidade requeridas para aplicações em cosméticos. As partículas de pectina, em particular, apresentaram-se promissoras para aplicações em produtos cosméticos capilares devido tamanho reduzido e potencial viscoelástico. Os fios de cabelo submetidos aos processos de transformação capilar foram o foco para a aplicação dessas partículas na tentativa de minimizar os danos pré-existentes.

Palavras-chave: Nanocosméticos, pectina cítrica, peptonas vegetais, reticulação eletrostática

ABSTRACT

The use of sustainable, biodegradable and biocompatible raw materials show great interest for pharmaceutical and cosmetic applications. The cosmetic market is situated in development process, particularly in the area of hair products, with significant sales in Brazil. This growth brings the need for innovative, versatile and safe products to consumers. In this context, polymeric colloidal particles have occupied a prominent position on the world stage, marking the presence of nanotechnology in cosmetics. A variety of materials are natural or synthetic polyelectrolytes, whose electrostatic crosslinking in controlled conditions produces colloidal particles. The citrus pectin and vegetables peptones are part of polyelectrolytes, whose vegetable source has been preferred for applications in cosmetics, replacing animal products or inorganic materials. In this work, we studied the production of colloidal particles of citrus pectin and soybean and wheat peptones, all crosslinked with calcium chloride and quaternized guar gum. In all cases, production of particles was performed in a batch process, simple, scalable and in the absence of organic solvents, involving the drip of crosslinking agent on the polyelectrolyte solution under mechanical stirring. The results showed that for citrus pectin, size and polydispersity of the particles was controlled by the degree of esterification, crosslinking agent and initial concentration of electrolyte in solution. To obtain nanometer scale particles the concentration of the pectin was 10.0 g/l and the concentration of crosslinking agent was 1.0% (m / v). The particles obtained impart viscoelasticity to the mixture of pectin and cationic copolymer (polyquaternium-7). The viscoelasticity depended on the proportion and the particle diameter of pectin, as the micro and nanometric particles were similar to viscoelastic formations. In the case of peptones, wheat had the better performance in the formation of nanoparticles with low polydispersity. The obtained particles met the physico-chemical composition, size and polydispersity required for applications in cosmetics. The pectin particles, in particular, were very promising for applications in cosmetic hair due small size and potential viscoelastic. Capillary transformation processes were the focus for the application of these particles in an attempt to minimize the pre-existing damaged hair.

Key-words: Nanocosmetics, citrus pectin, vegetable peptones, electrostatic crosslinking

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
APRESENTAÇÃO	xxiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	3
2.1 Metas	3
2.1.1 Pectina Cítrica.....	3
2.1.2 Peptonas Vegetais	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Nanotecnologia	4
3.1.2 Nanocarreadores.....	6
3.1.3 Preparação de nanopartículas por reticulação eletrostática	7
3.2 Preparações cosméticas	9
3.2.1 Nanocosméticos	10
3.3 Cabelo humano	11
3.3.1 Propriedades mecânicas do cabelo	14
3.3.2 Produtos cosméticos para cabelo.....	15
3.3.2.1 Produtos de transformação capilar	16
3.3.2.2 Produtos para coloração de cabelos.....	16
3.4 Reologia de dispersões	17
3.4.1 Reologia de suspensões.....	21
3.5 Pectinas.....	23
3.5.1 Gelificação.....	27
3.5.2 Partículas de pectina	28

3.6 Peptonas vegetais	30
3.6.1 Uso de proteínas hidrolisadas	34
3.6.2 Proteínas hidrolisadas em cabelos.....	34
3.6.3 Sistemas micro/nanoestruturados de proteínas hidrolisadas.....	35
3.7 Agentes Reticulantes	37
3.7.1 Goma guar quaternizada.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 <i>Effects of the esterification degree and the crosslinking agent on the properties of colloidal particles of citrus pectin</i>	40
1. Introduction.....	42
2. Materials and methods	43
2.1 Materials.....	43
2.2 Characterization of pectins.....	43
2.3 Production of pectin particles.....	44
2.4 Characterization of pectin particles	44
2.5 Statistical analysis	45
3. Results and discussion	45
3.1 Molecular weight and degree of esterification of pectins.....	45
3.2 Properties of the colloidal pectin particles.....	45
3.2.1 Influence of the crosslinking agent	45
3.2.2 Particle size polydispersity	46
3.2.3 Particle size distribution.....	47
3.3 Influence of pectin concentration.....	51
3.4 Morphology of particles.....	53
4. Conclusions.....	53

Acknowledgments	54
5. References.....	54
<i>4.2 Rheological properties of citrus pectin dispersions and its blends with polyquaternium-7 and colloidal particles.....</i>	<i>56</i>
1. Introduction	58
2. Materials and methods.....	60
2.1. Materials.....	60
2.2. Preparation of pectin particles	60
2.3. Physico-chemical characterization of pectin particles.....	61
2.4. Rheological characterization.....	61
3. Results and discussion	61
3.1. Physico-chemical properties of the particles	61
4. Rheological characterization	62
5. Conclusions.....	69
Acknowledgments	69
6. References.....	69
<i>4.3 Potential of vegetable peptones for production of colloidal particles by ionic crosslinking</i>	<i>71</i>
1. Introduction	73
2. Materials and methods.....	74
2.1 Materials.....	74
2.2 Characterization of peptone dispersions in different pH values	75
2.3 Preparation of peptone particles.....	75
2.4 Characterization of peptone particles	76
3. Results and discussion	76
3.1 Zeta potential and size of the peptone macromolecules with respect to pH	76

3.2. Mean diameter and distribution for the crosslinked particles.....	77
4. Conclusions.....	81
Acknowledgments	81
5. References.....	81
5. CONCLUSÕES	83
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das nanocápsulas e nanoesferas polimérica (Schaffazick et al, 2003).....	7
Figura 2: Representação esquemática das estruturas "ladder-like" (a) e "scrambled-egg" (b). A linha preta representa o poli íon negativo enquanto a linha cinza representa o poli íon positivo. (Hartig <i>et al</i> , 2007)	8
Figura 3: Evolução da indústria cosmética no Brasil (Fonte: ABIHPEC).	10
Figura 4: Representação esquemática da arquitetura do fio de cabelo. (a) Estrutura da fibra capilar (b) Seção transversal da fibra capilar humana. (Marcelino, 2008).....	13
Figura 5: Representação esquemática das ligações químicas presentes na queratina (Bhushan, 2008).	14
Figura 6: Curva de tensão-deformação para fibra de α -queratina. A (comportamento Hookeano), B (comportamento de reconstituição), C (comportamento pós-reconstituição), D (ponto de ruptura). Fonte: Wagner, 2006.	15
Figura 7: Respostas de um material ideal elástico, de um material ideal viscoso e de um material viscoelástico a uma deformação senoidal (ângulo de fase δ , taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$, tensão de cisalhamento e frequência angular ω) (Steffe, 1996).	19
Figura 8: Caracterização de fluidos, relacionando os parâmetros de tensão de cisalhamento e taxa de deformação.	20
Figura 9: Orientação das moléculas perante o escoamento com conseqüente quebra de agregados frente à tensão aplicada (Sato, 2005).	21
Figura 10: Sistemas de partículas em suspensão. (a) Suspensão diluída sem interação entre as partículas; (b) Suspensão estabilizada por interações estéricas; (c) Sistema floculado; (d) Suspensões parcialmente estáveis com alguma estrutura formada; (e) Sistema sedimentando (Sato, 2005).....	22
Figura 11: Vista tridimensional do arranjo polimérico na parede celular das plantas (Wilson et al, 1986).	24
Figura 12: Representação das ligações α -1,4 entre os monômeros da cadeia principal da pectina.....	25
Figura 13: Representação esquemática do modelo "egg-box" (Braccini et al, 2001).	28

Figura 14: Esquema genérico da ação enzimática na clivagem da ligação peptídica, em meio aquoso.....	30
Figura 15: Representação esquemática da obtenção de micropartículas de colágeno hidrolisado (CH) em esferas de sílica por deposição camada a camada (Adaptado de Suflet et al, 2010).....	36
Figura 16: Estrutura química da goma guar.....	38
Figura 17: Estrutura molecular do Jaguar C13®.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Evolução nas publicações científicas na área de nanotecnologia. (Fonte: Scopus) 4	
Tabela 2: Revisão do uso da pectina na obtenção de nanopartículas de PECs 30	30
Tabela 3: Relação dos pontos isoelétricos para os aminoácidos (Lehninger, 2003). 31	31
Tabela 4: Composição de aminoácidos totais e livres presentes em peptona de soja (PS), peptona de trigo (PT) e peptona de batata (PB). Fonte: Organotechnie..... 33	33
Tabela 5: Distribuição dos pesos moleculares das peptonas vegetais de batata (PB), de soja (PS) e de trigo (PT). Fonte: Organotechnie. (ND=não determinado) 33	33

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi organizado na forma de capítulos para melhor visualização dos resultados, sendo este exemplar organizado da seguinte forma:

- Introdução, ressaltando a importância do trabalho;
- Objetivos e metas;
- Revisão bibliográfica, contemplando os princípios considerados no desenvolvimento deste trabalho;
- Resultados e discussão, apresentados na forma de artigos científicos submetidos aos periódicos relacionados com os temas abordados;
- Conclusões;
- Sugestões para trabalhos futuros;
- Referências bibliográficas.

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um conceito dinâmico para o uso de componentes miniaturizados, que vem sendo explorada em diversas áreas do conhecimento (Ramsden, 2009). Sobretudo na área cosmética, o apelo para produtos nanotecnológicos vem sendo amplamente discutido, quanto à viabilidade técnica, segurança e eficácia. Desde os anos 90, grandes empresas cosméticas vêm se preocupando em disponibilizar produtos mais eficientes e com menores efeitos indesejados, através da nanotecnologia. De forma semelhante, os consumidores estão dispostos a utilizar os benefícios da tecnologia em prol da saúde e bem estar, dentro dos limites aprovados pelos órgãos de saúde e respeitando o meio ambiente. Assim, o uso de nanomateriais é de grande interesse para o mercado cosmético, em seu processo de ampla expansão atual (FIRJAN, 2010). O mercado para produtos capilares é um dos mais rentáveis e conta com o desenvolvimento de ativos que atuam principalmente na reparação de danos causados todos os dias aos fios.

A pectina é um polissacarídeo natural, extraído da casca de frutas cítricas, biocompatível e biodegradável. Sua cadeia principal é formada por ligações α -[1,4] entre resíduos de ácido D-galacturônico, interrompidas por ligações α -[1,2] dos resíduos de ramnose nas cadeias laterais (Williams *et al*, 2007). É um polímero formador de filme, utilizado principalmente pela indústria de alimentos como espessante em geléias. As propriedades nanomecânicas das pectinas são favoráveis para a aplicação em cabelos, pois suas características viscoelásticas podem promover aumento da resistência mecânica dos fios. Na forma de partículas a pectina cítrica tem sido usada como carreador de compostos bioativos. Nessas aplicações, tamanho e polidispersidade são importantes e apresentam limitações que dependem da técnica de preparação das partículas. A técnica de reticulação eletrostática é utilizada principalmente para obtenção de micropartículas de pectina que atuam na liberação controlada de ativos farmacêuticos (Sriamornsak *et al*, 1999). Uma grande limitação da técnica é a obtenção de diâmetros na faixa manométrica com baixa polidispersidade. Estudos para a obtenção de nanopartículas através dessa mesma técnica apresentam heterogeneidade no diâmetro dos nanocarreadores (Yu *et al*, 2009). Outras técnicas apresentam maior homogeneidade nas partículas obtidas, porém geralmente o diâmetro obtido é superior a 200 nm e a pectina deve estar associada à outra matéria-prima (Jones *et al*, 2011).

As peptonas vegetais são derivados da hidrólise aleatória de proteínas de trigo, batata, soja, entre outros. São utilizadas geralmente como suplemento microbiológico, porém o uso de proteínas hidrolisadas está relacionado com as indústrias de alimentos e cosméticos. O uso de proteínas vegetais hidrolisadas em cabelos apresenta grande efetividade na reposição de aminoácidos essenciais,

reparando os fios danificados (Gamez-Garcia, 1993). A aplicação do hidrolisado em sistemas miniaturizados foi constatada para a obtenção de micropartículas através de diversas técnicas, porém sistemas nanoestruturados ainda não foram estudados (Canabady-Rochelle *et al*, 2010; Suflet *et al*, 2011).

O uso de matérias-primas sustentáveis e biodegradáveis está sendo cada vez mais utilizado para a obtenção de carreadores coloidais. Além de sua atuação como veículo, esses materiais podem apresentar efeitos benéficos aos fios, agregando funções ao produto. Dentre essas matérias-primas, destaca-se uma vasta gama de polieletrólitos, capazes de produzir partículas coloidais para encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos. Os nanocarreadores de polieletrólitos podem ser formados por diversos mecanismos, porém a reticulação eletrostática apresenta vantagens devido sua rapidez, baixo custo e por não utilizar solventes orgânicos.

O processo de reticulação eletrostática prevê a formação de micro e nanopartículas através de interação eletrostática entre componentes com cargas opostas (Horn & Rieger, 2001). A interação entre os componentes pode ser decorrente da reticulação interfacial, gerando dobramento de cadeias poliméricas ou decorrer da reticulação *in situ*, gerando união dos fragmentos dispersos em emulsão coloidal, promovendo assim a formação de nanopartículas (Lambert *et al*, 2000).

Neste trabalho foram utilizados como polieletrólitos a pectina cítrica e as peptonas vegetais de soja e trigo. Esses polieletrólitos foram usados para a produção de partículas coloidais através de reticulação eletrostática. Como agentes catiônicos de reticulação, foram utilizados o cloreto de cálcio devido seu uso clássico em reticulação eletrostática e a goma guar quaternizada, devido seu amplo uso em produtos cosméticos. O trabalho completo é composto de duas partes: a primeira parte tem como foco o desenvolvimento tecnológico da produção de partículas coloidais por reticulação eletrostática e a sua caracterização físico-química. E a segunda parte, descreve o seu comportamento reológico. Esses dados serão utilizados para avaliar o aumento da resistência mecânica dos fios de cabelo.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de pectina cítrica e de peptonas vegetais, em processo escalonável, para aplicações em transformação capilar. Os complexos obtidos podem atuar na entrega de ativos lipofílicos como corantes e essências encapsulados ou vazios por suas propriedades.

2.1 Metas

Este objetivo foi atingido através de metas, determinadas para cada material:

2.1.1 Pectina Cítrica

1. Caracterização de duas pectinas cítricas quanto ao grau de esterificação e massa molar;

2. Preparação de partículas de pectina cítrica e de peptonas vegetais, ambas reticuladas com cloreto de cálcio e goma quar quaternizada através de adição do agente de reticulação sobre a solução de polímero sob agitação mecânica em várias condições operacionais de concentração de polímero e agente de reticulação;

3. Caracterização das partículas produzidas através do diâmetro hidrodinâmico e distribuição, potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura;

4. Estudo da influência do grau de esterificação, agente de reticulação e concentração de pectina cítrica no diâmetro médio, distribuição e potencial zeta de partículas de pectina cítrica;

5. Seleção das condições operacionais (grau de esterificação, agente de reticulação e concentração de pectina e reticulante) que favoreceram a predominância de nanopartículas nas dispersões;

6. Caracterização reológica dos componentes viscoso e elástico das dispersões de copolímero catiônico (poliquaternium-7) e pectinas, nas formas livre e contendo partículas de pectina.

2.1.2 Peptonas Vegetais

1. Seleção das condições operacionais (tipo de peptona vegetal, agente de reticulação e concentração de peptona e reticulante) que favoreceram a predominância de nanopartículas nas dispersões.

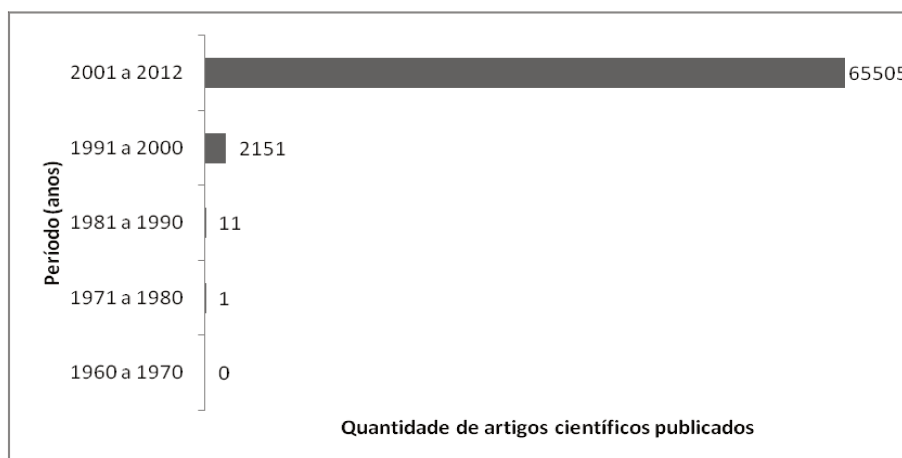
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Nanotecnologia

O conceito mais básico de nanotecnologia descreve a utilização de dispositivos ou a produção de materiais em escala nanométrica (1 nm a 1 μ m), ou seja, “a nanotecnologia é formada por um grupo de tecnologias emergentes nas quais a estrutura em questão é controlada em escala nanométrica para produzir novos materiais e dispositivos que tenham propriedades úteis e distintas” (US Foresight Institute, 2009) . Este conceito surgiu no advento do primeiro microscópio eletrônico em 1931, desenvolvido por Max Knoll e Ernst Ruska na Alemanha, quando foi possível a visualização de materiais nesta escala. Desta forma, a nanotecnologia evolui conforme a melhoria na precisão dos equipamentos utilizados na caracterização de componentes e é, portanto, um conceito dinâmico que sofre alterações conforme a necessidade.

O dinamismo deste conceito pode ser visualizado verificando-se a quantidade de artigos científicos publicados ao longo dos anos, desde 1960 até 2012 (Tabela 1). Nota-se que a nanotecnologia é uma área de conhecimento relativamente jovem e que está em ampla expansão, juntamente com outros ramos da tecnologia. Houve grande evolução nos últimos 10 anos, indicando alta demanda pela comunidade e evolução da precisão dos equipamentos de visualização e caracterização dos produtos em escala nanométrica.

Tabela 1: Evolução nas publicações científicas na área de nanotecnologia. (Fonte: Scopus)



A utilização de sistemas miniaturizados é de grande interesse do ponto de vista de fabricação, desempenho e atuação, visto que dispositivos em escala nanométrica necessitam de menor quantidade de energia para funcionar, são mais rápidos e eficientes devido menor distância entre os componentes ativos, podem ser

transportados com maior facilidade por serem menores e mais leves, a limpeza e a manipulação são facilitadas e necessitam de manutenção menos frequente, pois são compactos, dissipam menos calor e apresentam menores focos de contaminação (Fu *et al*, 2012).

Além das vantagens técnicas, os produtos nanotecnológicos apresentam alto valor agregado. O mercado de produtos nanotecnológicos para o ano de 2010 foi estimado em US\$383 bilhões (–FIRJAN, 2010). Existe uma dificuldade em avaliar ao certo o faturamento nesta área por ser uma vertente tecnológica muito dinâmica. Assim, as pesquisas podem ignorar as categorias mais antigas, como o carbono preto utilizado em borracha de pneus, que já se apresentava em escala nanométrica, e citar somente os nanotubos de carbono utilizados atualmente, por exemplo, subestimando os valores reais. O oposto pode acontecer, nos casos em que o prefixo “nano” é utilizado como forma de *marketing*, mesmo que o produto não possua nenhum nanomaterial (Berube, 2009), mascarando os dados das pesquisas. No entanto, é possível verificar que este mercado impulsiona um grande capital internacional, que ainda está em processo de expansão.

Esta expansão é considerável pelo grande escopo de aplicações dos nanomateriais. Na área de materiais não-carbônicos é possível citar os nanocompósitos formados para melhorar características indesejadas como dureza, resistência ao calor e condutividade elétrica, além dos materiais utilizados para recobrimento alterando as propriedades superficiais (Salmaso *et al*, 2012). Quanto aos materiais à base de carbono, podem-se citar os fulerenos e os nanotubos de carbono utilizados principalmente na área de eletrônica (Giacalone *et al*, 2010; Takahashi *et al*, 2011). Os nanodispositivos podem ser utilizados para a engenharia de ultraprecisão (Zou *et al*, 2011), nas indústrias automotivas e aeroespaciais, além de seu uso em catálise heterogênea (Lee *et al*, 2011). Pode-se verificar o uso de nanomateriais na suplementação de concreto em engenharia civil ou como um novo leque de superfícies para a arquitetura. Foram constatados avanços no uso da nanotecnologia para a geração de energia em células fotovoltaicas e de combustível (Peng *et al* 2011), além da facilidade quanto ao armazenamento de energia em dispositivos eletrônicos nanométricos e na emissão em forma de luz (Kim *et al*, 2012), através de diodos emissores de luz (*light-emitting diodes* - LEDs). Na área têxtil, os nanoaditivos conferem novas propriedades às fibras, como maior durabilidade e antisepsia no caso de impregnação com nanopartículas de prata (Ugur *et al*, 2010; Dastjerdi *et al*, 2010). Os nanomateriais podem ser utilizados na remediação de solos e lençóis freáticos contaminados, além de tratamento de água e resíduos industriais.

O uso da nanotecnologia aplicada à área da saúde une uma das práticas mais antigas da humanidade com um modelo inovador de intervenção no bem estar das pessoas. Por ser a aplicação mais direta dos nanomateriais na vida do ser humano e que, portanto, necessita de um controle rígido, é um dos campos que apresenta maior disponibilidade de informações e estudos na literatura (Cattaneo *et al*, 2010; Chakraborty *et al*, 2011). Dentro deste grupo é possível citar duas grandes aplicações: os dispositivos para implante, como próteses e suporte para tecidos (*scaffolds*), capazes de alterar a superfície de materiais já utilizados ou compor uma nova linha de nanomateriais com propriedades desejadas (Zhang *et al*, 2011) e os sistemas de nanocarreadores utilizados na encapsulação de fármacos, agentes diagnósticos para enfermidades, alimentos e cosméticos.

3.1.2 Nanocarreadores

Os nanocarreadores são responsáveis pelo armazenamento e entrega dos ativos em seu local de ação. Diferem quanto à composição química, mecanismo de encapsulação e liberação, arquitetura e propriedades físico-químicas. Os sistemas mais utilizados para entrega de ativos são as nanoemulsões, os lipossomas e as nanopartículas, sendo o último destacado a seguir por ser o tópico estudado neste trabalho.

Os principais sistemas nanoparticulados podem ser divididos de acordo com sua composição: as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) formados por lipídeos e as nanopartículas poliméricas, formadas por polímeros. As SLN diferem das NLC quanto à composição lipídica, pois apresentam apenas lipídeos sólidos, ao passo que as NLC são formadas pela mistura de lipídeos líquidos e sólidos, formando espaços entre o empacotamento dos lipídeos e facilitando a incorporação de ativos e sua liberação e, portanto apresentam maior eficiência de encapsulação (Muller *et al*, 2007). As nanopartículas poliméricas podem ser nanoesferas ou nanocápsulas, dependendo de sua arquitetura (Figura 1). As nanoesferas apresentam a porção polimérica coesa, de forma que o ativo esteja distribuído uniformemente na matriz. Já as nanocápsulas apresentam dois compartimentos distintos: invólucro e núcleo, com características distintas quanto a hidrofiliabilidade. Normalmente a porção polimérica é hidrossolúvel e deve se desintegrar para que o ativo seja liberado (Schaffazick *et al*, 2003).

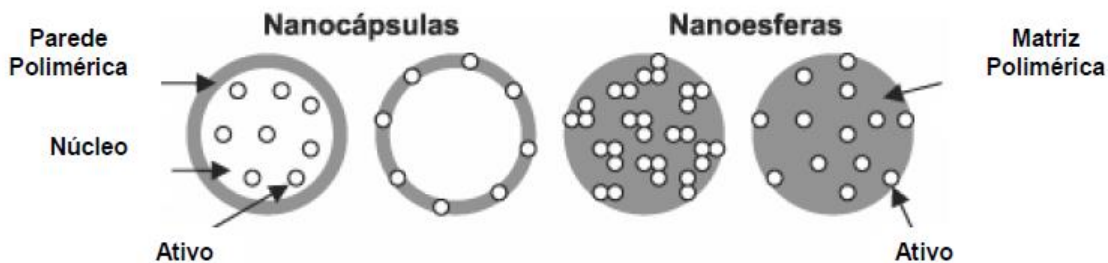


Figura 1: Representação esquemática das nanocápsulas e nanoesferas polimérica (Schaffazick et al, 2003).

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por diversas metodologias diferentes, que orientam a arquitetura da partícula obtida. Os métodos de produção de nanopartículas poliméricas podem ser divididos em três categorias. A primeira é polimerização *in situ* de monômeros dispersos em emulsão coloidal, propensa à formação de nanoesferas, como no caso da produção de cianoacrilato de alquila (Lambert *et al*, 2000). A segunda é a polimerização interfacial, que pode ocorrer pela interação entre o polímero e um agente externo, capaz de organizar as cadeias poliméricas em nanocápsulas normalmente, através do processo conhecido como coacervação simples ou complexa (Burgess, 1994). A simples ocorre quando o agrupamento das cadeias poliméricas ocorre por mudança de pH, temperatura ou pela presença de sais solúveis e a complexa ocorre geralmente na presença de polieletrólitos de carga oposta (Horn & Rieger, 2001). Finalmente, existe a precipitação de polímeros pré-formados, que exige necessariamente fases distintas para que as nanopartículas precipitem, podendo gerar tanto nanocápsulas quanto nanoesferas, como o poli ácido láctico – PLA (Quintanar-Guerrero *et al*, 1998).

3.1.3 Preparação de nanopartículas por reticulação eletrostática

A reticulação de polímeros é um tipo de coacervação, de forma que o agente promotor da união das cadeias poliméricas em estruturas nanométricas é chamado de reticulante. No caso da reticulação eletrostática, o polímero é denominado polieletrólito, devido à presença de grupamentos carregados positiva ou negativamente e o reticulante apresenta carga oposta à carga do polímero, atraindo os grupamentos carregados em unidades mais compactas de polímero, normalmente esferas ou cápsulas de dimensões micro ou nanométricas. Durante esse processo pode ocorrer a encapsulação de ativos pela internalização ou adsorção na superfície da estrutura formada.

Os polieletrólitos poliméricos podem ser utilizados na encapsulação de ativos para uso humano, visto que se degradam com baixa velocidade, sem alterar a função normal das células e utilizam como solvente a água (Matsusue *et al*, 1995). A

união de polieletrólitos de carga oposta funciona como uma coacervação, formando espontaneamente estruturas insolúveis, denominadas dispersões complexas de polieletrólitos (PECs), mantidas pelas ligações de hidrogênio, forças de *Van der Waals* e principalmente pelas interações eletrostáticas. A formação de PECs pode ser controlada pelas variáveis de força e localização dos sítios iônicos, pH, temperatura, intensidade de mistura, entre outros. Na formação dos PECs ocorre inicialmente o processo rápido de entrelaçamento mútuo dos polímeros, dependente dos tamanhos molares, seguido de mudança conformacional dos agregados pré-formados (Hartig *et al*, 2007).

Existem dois modelos estruturais de PECs discutidos na literatura, descritos pela massa molar, estequiometria e características dos grupos poli íons: a estrutura “*ladder-like*” e o modelo tipo “*scrambled-egg*” (Figura 2). O primeiro modelo descreve a formação dos complexos em nível molecular, por meio de adaptação conformacional no pareamento dos contra-íons. Este pareamento geralmente é insuficiente, devido a fracos grupos iônicos e grande diferença entre as dimensões moleculares dos polieletrólitos, gerando misturas de PECs solúveis e insolúveis. No segundo modelo ocorre a incorporação de diversas cadeias poliméricas no interior das partículas, geralmente com dimensões semelhantes e com fortes grupos iônicos, facilitando a formação de PECs insolúveis (Thunemann *et al*, 2004).

No caso da reticulação eletrostática, ocorre a formação de PECs solúveis ou insolúveis dependendo das condições experimentais. Os complexos obtidos podem seguir tanto a estrutura “*ladder-like*” quanto o modelo “*scrambled-egg*”, como a quitosana (Guerra *et al*, 1998) e a pectina (Braccini *et al*, 2001).

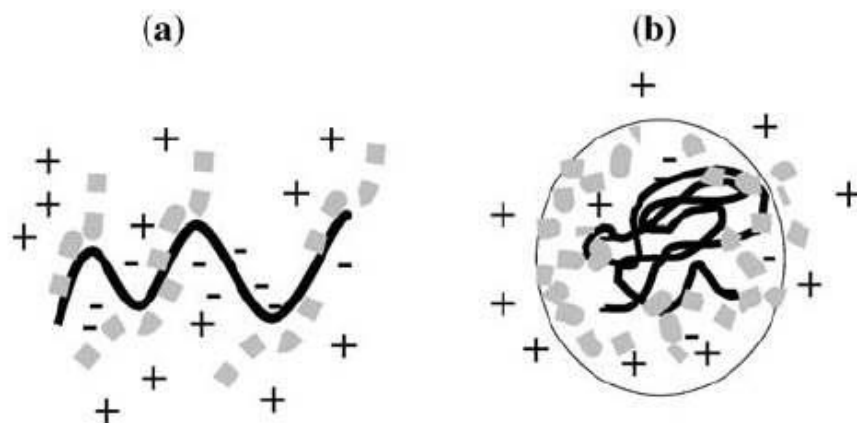


Figura 2: Representação esquemática das estruturas "ladder-like" (a) e "scrambled-egg" (b). A linha preta representa o poli íon negativo enquanto a linha cinza representa o poli íon positivo. (Hartig *et al*, 2007)

Alguns parâmetros-chave devem ser considerados no estudo dos nanocarreadores, como tamanho, polidispersidade, composição química e formato, incluindo porosidade (Ramsden, 2009). Conhecendo-se esses parâmetros, a escolha da nanopartícula a ser utilizada envolve conhecimentos prévios sobre o ativo a ser encapsulado e seu sítio de ação. Várias indústrias já utilizam esses conhecimentos para o desenvolvimento de nanoprodutos nas áreas farmacêutica e alimentícia. No entanto, a área de cosméticos vem se destacando na utilização de tal tecnologia, devido à grande demanda do mercado.

3.2 Preparações cosméticas

A preocupação com a beleza e bem-estar é inerente ao ser humano e sempre esteve presente na história das civilizações, no entanto, somente em 1910, o primeiro salão de beleza do mundo foi inaugurado em Londres, por Helena Rubinstein. No Brasil, foi a partir dos anos 50, devido a incentivos fiscais, que as empresas de grande porte, como a americana *Avon* e a francesa *L'Oréal*, inauguraram suas filiais. A partir daí surgiram inúmeras indústrias cosméticas no país. Essas empresas contribuem para o crescimento desse segmento (Figura 3), garantindo ao Brasil a terceira colocação no *ranking* do mercado mundial de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (ABIHPEC, 2012).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os cosméticos “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”. No Brasil, são classificados como produtos de grau de risco I, quando não necessitam de informações detalhadas quanto ao modo de uso (por exemplo: batom labial, esmalte e máscara para cílios) e de grau de risco II, quando necessitam de comprovação de segurança e/ou eficácia, além de informações quanto ao uso e restrições (por exemplo: depilatório químico, bronzeador e repelente de insetos).

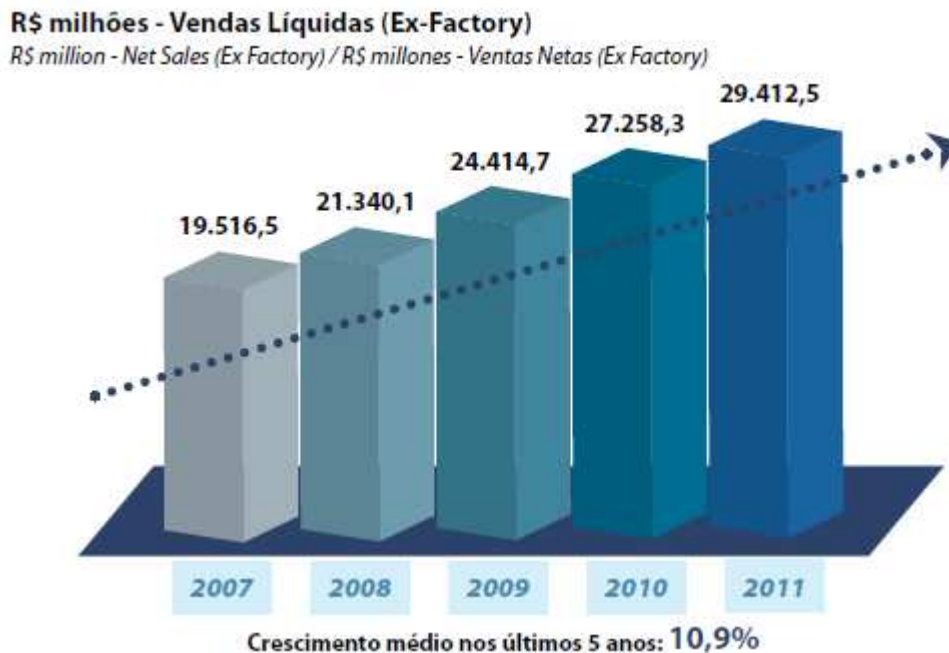


Figura 3: Evolução da indústria cosmética no Brasil (Fonte: ABIHPEC).

Dentre os produtos cosméticos disponíveis no mercado, a classe que movimentou maior capital de exportação em 2012 foram os produtos para cabelos, totalizando US\$6,7 bilhões (ABIHPEC), correspondente 22,8% do total do setor. A valorização desta linha de produtos indica grande demanda por parte do mercado consumidor internacional, merecendo mais estudos na área.

3.2.1 Nanocosméticos

Os nanocosméticos são classificados como grau de risco II, pois apresentam estruturas com diâmetro reduzido, que podem levar a diferenças no perfil de permeação, aumentando as chances de toxicidade e por isso esses produtos devem passar por estudos de segurança e eficácia (Fronza *et al*, 2007). Normalmente os nanocosméticos são nanopartículas lábeis, ou seja, são partículas que se dissolvem física ou quimicamente após a sua aplicação e, portanto, apresentam riscos sanitários menores que as partículas insolúveis (fulerenos, nanotubos de carbono, etc).

Os nanocosméticos foram introduzidos em 1986, pela empresa *Dior*, através de lipossomas pelo produto *Capture*. Na década de 90, a *L'Oréal* iniciou suas pesquisas no ramo nanotecnológico até que em 1995 introduziu os primeiros produtos na forma de nanocápsulas poliméricas. A partir desse momento, inúmeros produtos foram lançados no mercado cosmético. Em 2001, o *Primordiale* da *Lancôme* foi lançado. Constituído por vitamina E nanoencapsulada, o produto

promete uma larga distribuição da vitamina pelas camadas da pele (Jansen *et al*, 2001). Em 2005, a companhia alemã Dr. Ripler introduziu no mercado os primeiros produtos contendo as NLCs, através do produto *NanoRepair Q10 Cream* e *NanoRepair Q10 Serum* (Muller *et al*, 2007). Atualmente existem diversos produtos nanotecnológicos no mercado internacional, tais como o *RevitaLift*, lançado em 2011 pela *L'Oréal* e inclusive nacional, como o *Nanoserum* (creme anti-sinais para a área dos olhos), o primeiro produto nanotecnológico brasileiro, fabricado pelo O Boticário em 2006.

O uso de nanotecnologia em cosméticos pode ser categorizado de acordo com as características distintas para cada sistema nanoestruturado. Existem as nanoemulsões, formadas por um sistema bifásico de nanogotas entre 50 a 100 nm, utilizadas normalmente em condicionadores e loções devido as suas propriedades óticas e sensoriais desejadas, como transparência, fluidez e suavidade ao toque. Não apresentam riscos adicionais aos consumidores quando comparados aos relatados para emulsões comuns, visto que ambos são compostos por uma mistura entre água e óleo (Kogan *et al*, 2006). Os lipossomas e as nanopartículas poliméricas/lipídicas podem ser utilizados como carreadores de ativos cosméticos, principalmente para aplicação cutânea, como citado anteriormente.

Dentre os produtos nanotecnológicos aplicados no setor de produtos capilares, destaca-se o Uvinil T 150, que contém um filtro UV-B encapsulado em nanopartículas lipídicas (Zulli *et al*, 2001) e que garante até cem vezes maior afinidade do filtro aos fios de cabelo. Em 2002, as nanopartículas poliméricas formadas por polímeros e copolímeros hidrofóbicos foram patenteadas (Shefer *et al*, 2002). Essas partículas são formadas por um núcleo sólido e uma superfície externa catiônica, garantindo a liberação controlada de ativos e marcadores sensoriais, como os agentes condicionantes catiônicos, a fim de melhorar o sistema de deposição nos cabelos. Em 2008, foram desenvolvidas as nanopartículas de sericina, extraídas da proteína da seda. Essas partículas foram obtidas por coacervação complexa da proteína com polímeros catiônicos e recobertas com agentes tensoativos catiônicos, conferindo brilho e condicionamento aos fios (Marcelino, 2008).

3.3 Cabelo humano

É importante conhecer a arquitetura do cabelo humano para facilitar o entendimento sobre sua interação com os produtos para cabelos. O cabelo humano é um anexo epidérmico, ou seja, possui características distintas, porém é proveniente da epiderme. É dividido em duas porções: o folículo piloso e o fio de cabelo propriamente dito, foco dos produtos cosméticos.

O fio de cabelo é uma fibra de 50 a 100 μm de diâmetro, constituído de quatro camadas distintas: medula, cutícula, córtex e o cimento intercelular (Figura 4). A medula é a porção mais interna e nem sempre está presente, portanto é pouco visada para a aplicação cosmética. O córtex é formado pelo empacotamento de células corticais, ricas em proteínas contendo agrupamento enxofre (queratina), dispostas paralelamente ao sentido da fibra capilar. Sua organização confere certa elasticidade ao fio e, portanto essa estrutura é responsável pelas propriedades mecânicas das fibras (Feughelman *et al*, 1997). Devido a alta compactação das células corticais, são poucos permeáveis por líquidos em geral, porém são menos resistentes à agentes oxidantes. A cutícula é composta basicamente pela proteína queratina, disposta em escamas sobrepostas, atuando na proteção do córtex. Quando íntegra, a cutícula forma uma superfície contínua, limitando o contato com os outros fios e permitindo a reflexão da luz. No entanto, processos de secagem com secador e escovação dos fios podem deformar a cutícula através da abertura de suas extremidades ou até remover a cutícula completamente (Bhushan, 2008; Robins *et al*, 2002). A difusão de substâncias para o interior dos cabelos pode ocorrer pela via transcelular (através da cutícula) ou pela via intercelular (entre as cutículas, pelo cimento intercelular). A via intercelular é mais aceita, pois este caminho apresenta componentes mais pobres em ligações cruzadas dissulfídicas, facilitando o transporte. No entanto, quando os cabelos apresentam danos, a quantidade de pontes de dissulfeto diminui, tornando a difusão mais rápida (Pötsch *et al*, 1996). O cimento intercelular apresenta propriedades adesivas, facilmente atacadas por enzimas, porém resistente a agentes alcalinos e agentes redutores (Smith *et al*, 2002).

Os fios de cabelo são constituídos majoritariamente por proteínas queratinosas, que totalizam entre 65 a 95% de sua composição estrutural. O restante dos componentes está dividido entre água, lipídios estruturais e livres, pigmentos e traços de outros elementos (Robbins, 2002). A melanina presente no córtex é responsável pela coloração dos fios. Esse pigmento é produzido pelos melanócitos do bulbo capilar e é uma característica codificada geneticamente (Bolduc *et al*, 2001).

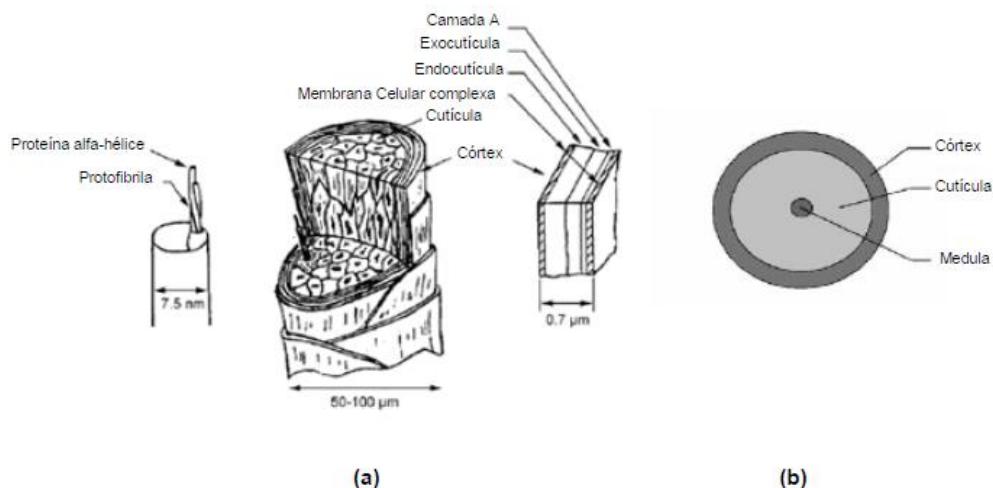


Figura 4: Representação esquemática da arquitetura do fio de cabelo. (a) Estrutura da fibra capilar (b) Seção transversal da fibra capilar humana. (Marcelino, 2008)

O encadeamento de aminoácidos da queratina apresenta maior quantidade de grupamentos carboxílicos em relação aos grupamentos amino e, portanto, a superfície dos fios de cabelo apresenta carga total negativa (Fronza *et al*, 2007). Dentre os principais aminoácidos que compõe a estrutura da queratina estão a cisteína (15,9%), serina (12,2%), o ácido glutâmico (12,2%), a prolina (8,4%), a treonina (7,6%) e a arginina (6,5%) (Valkovic, 2000, Bhushan 2008). A cisteína, presente de forma mais abundante nas moléculas de queratina, possibilita a junção entre as cadeias polipeptídicas através de pontes dissulfeto e assim estabiliza as fibras de queratina. Além disso, outras ligações mais fracas, como as forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio podem atuar na ligação entre as cadeias (Figura 5). Os produtos cosméticos atuam nessas forças de interação entre os fios, para que o resultado esperado seja obtido (Bolduc *et al*, 2001).

Os fios de cabelo podem ser danificados pela escovação mecânica, temperatura elevada de utensílios de modelagem ou radiação UV, entre outros (Harisson *et al*, 2004). No caso da exposição dos fios à radiação UV ou agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, a cisteína presente na queratina sofre oxidação, de forma que as pontes dissulfeto são oxidadas a sulfonato, aumentando a quantidade de cargas negativas nos fios. Essa alteração das cargas negativas afeta o aspecto dos fios e a adsorção de agentes catiônicos na superfície dos cabelos (Stranick, 1996). Assim, existe a demanda de tratar os cabelos agredidos, utilizando produtos adequados para cada necessidade.

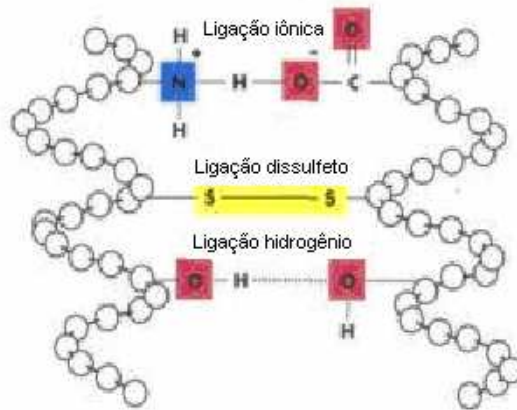


Figura 5: Representação esquemática das ligações químicas presentes na queratina (Bhushan, 2008).

3.3.1 Propriedades mecânicas do cabelo

As propriedades mecânicas do cabelo estão geralmente associadas ao córtex capilar. Isso ocorre pois dentre as estruturas do fio, o córtex é o majoritário e apresenta em sua composição os cristais de α -queratina (Robbins *et al*, 1991; Nogueira *et al*, 2006). A α -queratina apresenta ligações de hidrogênio intramoleculares em estruturas helicoidais entre as carbonilas e grupos aminos secundários. No caso da β -queratina as ligações de hidrogênio são intermoleculares. Portanto, a queratina em conformação beta apresenta estrutura amorfa e menos resistente à tração mecânica. O uso de produtos capilares alisantes geralmente acarreta em quebra de parte das ligações de hidrogênio da α -queratina, transformando-a em conformação beta.

O comportamento da fibra de α -queratina (em fios de cabelo no sentido longitudinal) quando submetida a uma tensão pode ser visualizado em forma de curva de tensão-deformação disposta na figura 6.

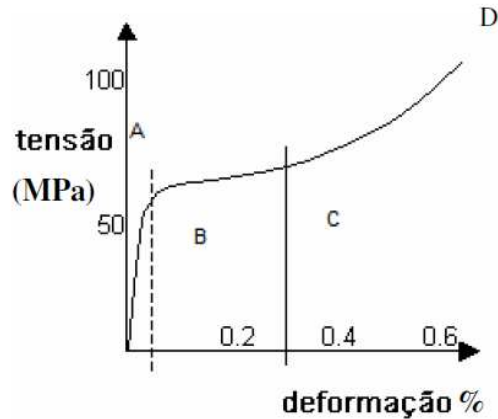


Figura 6: Curva de tensão-deformação para fibra de α -queratina. A (comportamento Hookeano), B (comportamento de reconstituição), C (comportamento pós-reconstituição), D (ponto de ruptura).
Fonte: Wagner, 2006.

Inicialmente as fibras apresentam comportamento de sólidos elásticos (*Hookeanos*), pois o aumento da deformação é proporcional à tensão aplicada até 2% de deformação, de forma que removendo a carga aplicada as fibras voltam imediatamente ao seu comprimento original. O módulo elástico (ou de armazenamento) pode ser obtido através da determinação da inclinação da reta na região A. Na região de reconstituição (deformação variando entre 2 e 30%) a deformação aumenta rapidamente com pequenas variações de tensão. Esses valores de deformação são suficientes para que cerca de 30% das cadeias de queratina alfa passem à conformação beta, porém essa transformação é reversível quando em condições controladas como imersão em água a 52°C por 24hs (Feughelman, 2002). Na região pós-reconstituição (acima de 30% de deformação) ocorre cisalhamento entre as cadeias e quebra das ligações de forma irreversível, até o ponto de ruptura. A deformação necessária para a ruptura das fibras está relacionada com as condições do córtex quanto aos danos causados por tratamentos cosméticos ou efeitos do ambiente (Wagner, 2006). Dentre os efeitos que afetam as propriedades mecânicas dos fios estão temperatura, umidade relativa, diâmetro da fibra, estrutura e composição protéica. O uso de produtos cosmético pode atuar beneficiando as características naturais dos fios, interferindo indiretamente nas propriedades mecânicas dos cabelos.

3.3.2 Produtos cosméticos para cabelo

Os produtos para cabelos podem atuar na limpeza, ondulamento, alisamento, condicionamento e coloração dos fios de cabelo, classificados como grau de risco I ou II, dependendo de sua atuação. Existem os produtos para tratamentos específicos, como queda de cabelo, caspa e antiparasitários, que não serão abordados neste tópico.

Os agentes de limpeza utilizam geralmente em suas formulações uma mistura de surfactantes aniônicos, catiônicos e não-iônicos, capazes de remover a oleosidade, limpando a superfície dos fios. Os xampus são compostos por uma gama de compostos, a fim de promover a limpeza e algum tratamento específico para os cabelos e ao couro cabeludo. Atualmente, os xampus são compostos por mais de 30 componentes, entre surfactantes, agentes condicionantes e aditivos, que alteram a viscosidade, a quantidade de espuma ou a capacidade promotora de penetração ou adsorção dos ativos aos fios (Trueb, 2007).

3.3.2.1 Produtos de transformação capilar

Transformação capilar é dada pela modificação permanente das características naturais dos fios, como morfologia e coloração. Dentre os produtos utilizados nesse processo estão os alisantes, agentes de ondulação e tinturas.

Os produtos de ondulamento e alisamento podem ser temporários ou permanentes, atuando de formas semelhantes em ambos os casos. Os tratamentos temporários atuam nas ligações mais fracas intra e intermoleculares da queratina, como as ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals*, portanto, modelam o fio sob alta temperatura até a próxima lavagem. Os tratamentos permanentes atuam nas ligações mais fortes das moléculas de queratina, as pontes dissulfeto, através de um mecanismo redox. A cutícula passa por um processo de abertura em pH básico, posteriormente um agente redutor é adicionado para romper as pontes dissulfeto, o fio é então modelado de forma lisa ou ondulada e finalmente um agente oxidante consolida a nova estrutura da queratina (Zviak *et al*, 1986).

3.3.2.2 Produtos para coloração de cabelos

Existem diversos produtos para alteração da coloração dos fios disponíveis no mercado. Esses produtos contêm a presença de pigmentos, que podem ser sintéticos ou naturais. Os pigmentos naturais são geralmente extraídos de plantas, como o caso da *henna*, do pau-brasil e da camomila, porém seu uso é limitado devido à dificuldade em prever a intensidade da tonalidade final. Assim, os pigmentos sintéticos são mais utilizados em formas de tinturas. As tinturas podem ser classificadas quanto ao seu tempo de ação. Geralmente, são denominadas como gradual, temporária, semipermanente e permanente (Brown, 1997).

A coloração gradual geralmente apresenta metais em sua composição, de forma que a interação desses metais (prata, bismuto ou chumbo) com os resíduos de cisteína dos fios acarreta em formação de sais metálicos. Esses sais depositados nas camadas das cutículas dos fios são removidos gradativamente com a lavagem

dos cabelos. Alguns estudos revelam que o uso desse tipo de coloração é antigo, visto que uma preparação cosmética egípcia de cerca de 4000 anos atrás descreve o uso de cristais de galena (PbS). Análises mais recentes indicam que esses cristais apresentam caráter nanométrico (Walter *et al*, 2006).

Colorações temporárias apresentam em sua composição pigmentos ácidos, de altos pesos moleculares e solúveis em água. Por serem maiores em tamanho, ficam depositadas sobre o cabelo temporariamente até que sejam removidas pela lavagem dos cabelos. Desta forma, cabelos danificados, que apresentam maior porosidade retêm de forma mais eficiente esse tipo de coloração (Bolduc *et al*, 2001).

As colorações semipermanentes apresentam baixo peso molecular, são geralmente sintéticas, com moléculas para-substituídas como diaminas, aminofenóis e fenóis. Por serem menores, são capazes de penetrar no córtex capilar, permanecendo por mais tempo sobre os fios (Draelos, 1991).

Finalmente, as colorações permanentes são resultantes de uma reação oxidativa irreversível aos fios. Os compostos intimamente relacionados ao processo de oxidação são os orto e para-aminofenóis e agentes oxidantes (geralmente peróxido de hidrogênio), que reagem com os fenóis, beta-aminofenóis e meta-diaminobenzenos para a formação dos pigmentos (Bolduc *et al*, 2001).

Apesar da ampla gama de produtos disponíveis no mercado, não existem relatos sobre o uso de materiais em escala nanométrica para a encapsulação de pigmentos para uso em colorações capilares.

Para as diversas aplicações em cabelos, são utilizadas matérias-primas de fontes variadas. No entanto, o mercado consumidor está cada vez mais se preocupando com produtos que não causem danos ao ambiente e que sejam de fontes renováveis. Assim, os polímeros, proteínas e hidrolisados protéicos de origem vegetal têm se destacado perante outras fontes para compôr as formulações cosméticas capilares. Neste trabalho, serão abordadas as pectinas e os hidrolisados protéicos de batata, soja e trigo.

3.4 Reologia de dispersões

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento de materiais frente a uma tensão ou deformação. Enquanto a resistência de um fluido ao escoamento é descrita como viscosidade (Steffe, 1996).

O comportamento ideal dos materiais após a aplicação de uma força externa pode ser descrito como sólido elástico, quando segue a Lei de Hooke, ou como

líquido viscoso, quando obedece a Lei de Newton. No entanto, em alguns casos o comportamento é intermediário entre sólidos elásticos e líquidos viscosos e, portanto o sistema é descrito pela combinação desses dois elementos e o sistema é denominado viscoelástico. Todos os biopolímeros apresentam essa característica (Chronakis & Kasapis, 1995). A viscoelasticidade nesse caso é dada pelo emaranhamento das cadeias ou partículas que deslizam com o cisalhamento.

A determinação da viscoelasticidade pode ser realizada por testes estáticos ou dinâmicos e é realizada por meio de equipamentos denominados reômetros. Nesses ensaios é determinada a relação entre tensão de cisalhamento (τ) em Pa, taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) em s^{-1} e tempo em s. Para os ensaios estáticos, a tensão é mantida constante e a variação da deformação é determinada em função do tempo. Já no caso dos ensaios dinâmicos (ou oscilatórios), uma tensão ou deformação oscilatória senoidal (a uma frequência ω) é aplicada e são determinadas a diferença de fase entre a tensão e a deformação oscilatórias, além da taxa de amplitude (Tadros, 2010). Neste caso, a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação oscilam como uma curva senoidal, com deslocamento de fase entre 0 e $\pi/2$. Para materiais for puramente elásticos (*Hookeanos*), o deslocamento de fase é 0, já para materiais puramente líquidos (*Newtonianos*), o deslocamento é de $\pi/2$ (90°) (Figura 7).

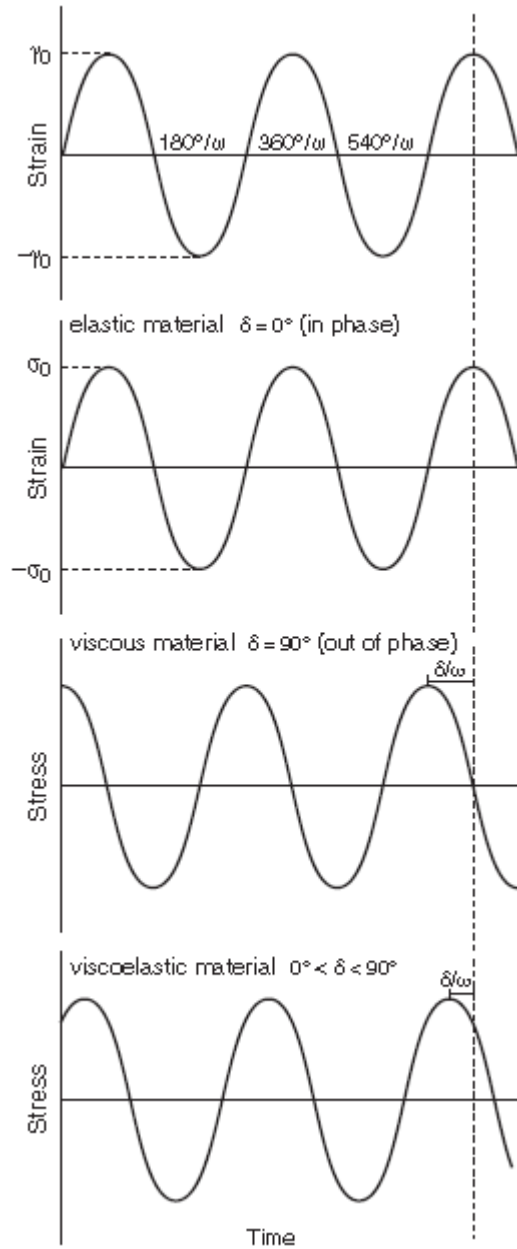


Figura 7: Respostas de um material ideal elástico, de um material ideal viscoso e de um material viscoelástico a uma deformação senoidal (ângulo de fase δ , taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$, tensão de cisalhamento e frequência angular ω) (Steffe, 1996).

Geralmente são utilizados os ensaios dinâmicos para materiais que apresentam interações intermoleculares em solução ou conformações macromoleculares como no caso dos sistemas coloidais (Tadros, 2010).

Existem modelos reológicos para a caracterização de fluidos, relacionando os parâmetros de tensão de cisalhamento e taxa de deformação (Figura 8). Para os

fluidos newtonianos, esses parâmetros são relacionados utilizando a viscosidade (η) em Pa.s como constante de proporcionalidade, através da Lei de Newton descrita pela Equação 1 (Barnes *et al*, 1989):

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 1})$$

Para os fluidos não-newtonianos, a viscosidade é descrita como aparente e depende da taxa de deformação, dando origem aos outros modelos. O modelo de *Herschel-Bulkley* engloba todos os modelos e por isso pode ser usado para descrever o comportamento de diversos tipos de fluidos.

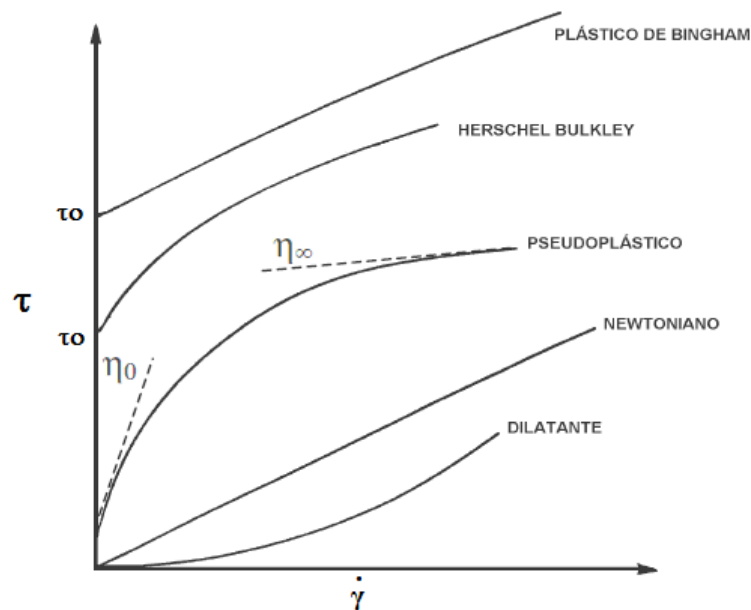


Figura 8: Caracterização de fluidos, relacionando os parâmetros de tensão de cisalhamento e taxa de deformação.

De maneira geral, os materiais complexos apresentam comportamento pseudoplástico e tixotrópico, isto é, a viscosidade aparente diminui a medida que a taxa de deformação e o tempo de cisalhamento aumentam. Isso ocorre devido à alteração da orientação das moléculas na direção do escoamento e à quebra de agregados frente à tensão aplicada, tornando a resistência ao movimento cada vez menor (Figura 9) (Barnes *et al*, 1989).

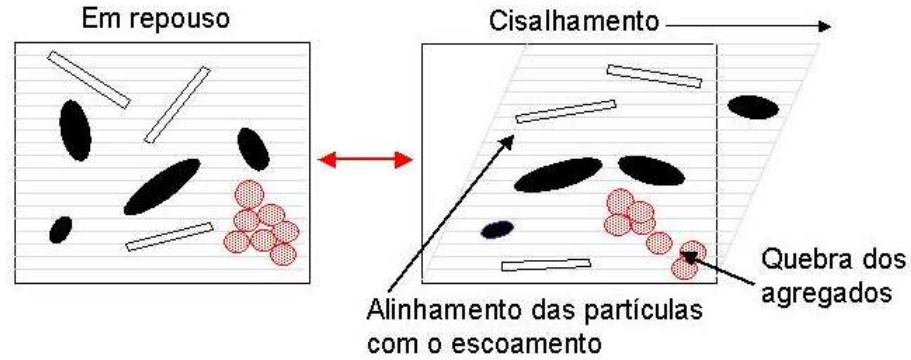


Figura 9: Orientação das moléculas perante o escoamento com conseqüente quebra de agregados frente à tensão aplicada (Sato, 2005).

A resposta obtida através dos testes dinâmicos é interpretada pelo módulo de armazenamento ou de elasticidade (G'), o módulo de perda ou de viscosidade (G'') e o ângulo de fase (δ), normalmente calculado como $\tan \delta = G''/G'$ (Mendieta-Taboata *et al*, 2008). Os módulos representam os graus relativos em que um material consegue se recuperar com uma resposta elástica (G') ou com uma resposta viscosa (G''), à medida que a taxa de deformação (freqüência) varia. Geralmente, os componentes G' e G'' aumentam linearmente com o aumento da freqüência, porém um deles se sobrepõe ao outro, aumentando mais rapidamente. No caso de um sólido perfeitamente elástico, G'' é zero e toda a energia é armazenada no módulo G' . Já para fluidos perfeitamente viscosos, ocorre o oposto. No ponto onde $G'=G''$, a freqüência é denominada freqüência cruzada (f_c) e o sistema avaliado apresenta características de redes entrelaçadas. O ângulo de fase representa a capacidade do material na conversão de energia mecânica em calor. Esse parâmetro é útil na caracterização de sistemas poliméricos, pois indica o quanto um material é mais caracteristicamente elástico ou viscoso (Shimojo, 2011).

3.4.1 Reologia de suspensões

As suspensões são caracterizadas pela presença de duas fases: uma fase sólida dispersa em uma fase líquida. Em casos de sistemas diluídos, praticamente não ocorre interação entre as partículas, enquanto os sistemas mais concentrados podem apresentar quatro tipos de interações (Figura 10).

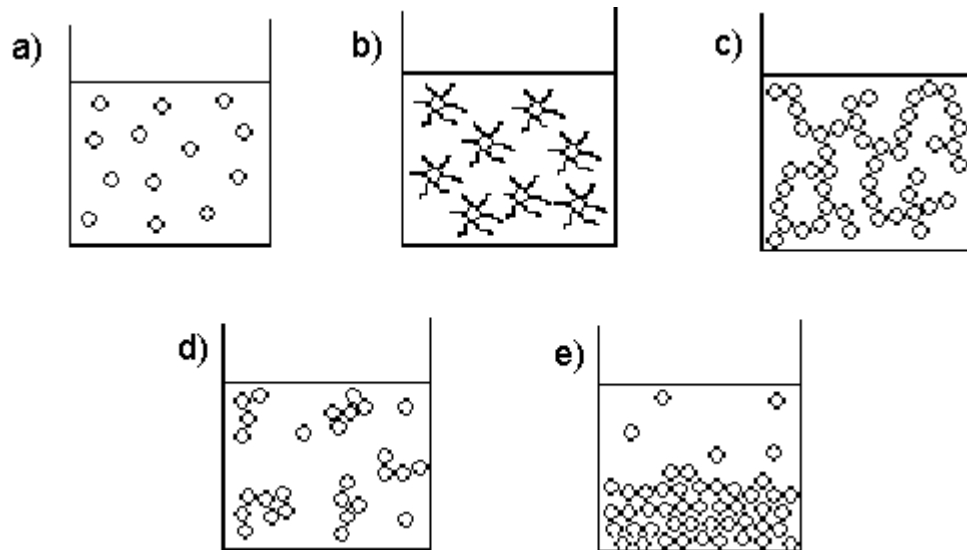


Figura 10: Sistemas de partículas em suspensão. (a) Suspensão diluída sem interação entre as partículas; (b) Suspensão estabilizada por interações estéricas; (c) Sistema flocculado; (d) Suspensões parcialmente estáveis com alguma estrutura formada; (e) Sistema sedimentando (Sato, 2005).

A interação tipo esfera-sólida (conhecida também como estabilidade neutra) ocorre quando as forças atrativas e repulsivas atuam controlando o sistema através do movimento Browniano e das interações hidrodinâmicas. Neste caso as partículas comportam-se como esferas sólidas, de forma que quando o sistema atinge a concentração limite de partículas, o comportamento de escoamento é alterado repentinamente de viscoso para elástico.

A interação eletrostática ocorre quando as partículas em suspensão apresentam cargas de superfície. Essas cargas possibilitam a formação de uma dupla-camada composta por contra-íons e co-íons adsorvidos física ou quimicamente, dependendo da concentração de eletrólito e da valência dos contra-íons. A repulsão entre os íons da dupla-camada determina o comportamento reológico desse tipo de suspensão.

A interação estérica ocorre na presença de grupos não iônicos adsorvidos ou de polímeros em camadas solvatadas. Quando os grupos adsorvidos em partículas distintas se aproximam pode ocorrer interpenetração, compressão ou uma mistura entre as duas interações. Nessa região ocorre repulsão estérica, determinando assim o comportamento reológico da suspensão.

Finalmente, as interações atrativas ocorrem naturalmente entre átomos ou moléculas quando estão a pequenas distâncias. As forças atrativas são conhecidas como forças de *Van der Waals*, provenientes das interações dipolo-dipolo, dipolo induzido ou forças de dispersão de London. A atração entre moléculas ou partículas

acarreta em deslocamento de líquido na suspensão, caracterizando o comportamento reológico deste tipo de suspensão. Em casos de alta concentração da fase dispersa, podem ocorrer sistemas parcialmente ou totalmente floculados.

O balanço entre as interações atrativas e repulsivas acarreta na estabilidade dos sistemas coloidais, determinada pela teoria DLVO (*Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek*). Dependendo das características químicas dos componentes de cada fase da suspensão, tamanho e formato das partículas, efeitos de superfície e presença de aditivos pode-se observar os comportamentos descritos (Ferguson & Kembrowski, 1991). Para o caso de cosméticos, o controle da reologia é essencial para a avaliação da estabilidade em longo prazo e para o controle do sensorial do produto.

3.5 Pectinas

As pectinas são moléculas de polissacarídeos complexos, encontrados em plantas superiores, ou seja, em plantas que apresentam vascularização desenvolvida. Estão presentes nas paredes celulares das células vegetais, onde atuam na manutenção da rede de celulose e ainda como agente hidratante (Muralikrishna & Taranathan, 1994). Podem ser encontradas em tecidos vegetais macios, quando estes se encontram em divisão celular acelerada e sob alta umidade, sugerindo um papel no movimento de água e outros fluidos vegetais vitais para o crescimento das plantas.

Estes polissacarídeos conferem firmeza estrutural às células vegetais, analogamente ao colágeno nas células animais (Figura 8), de forma que a conexão entre as pectinas e as fibras de celulose, além de sua orientação e de suas propriedades mecânicas é responsável pela força da parede celular vegetal (Preston, 1979). Algumas pectinas possuem modificações estruturais, como glicosilações com xiloglicanos, para que possam se ligar covalentemente às fibras de celulose (Jarvis *et al*, 1981).

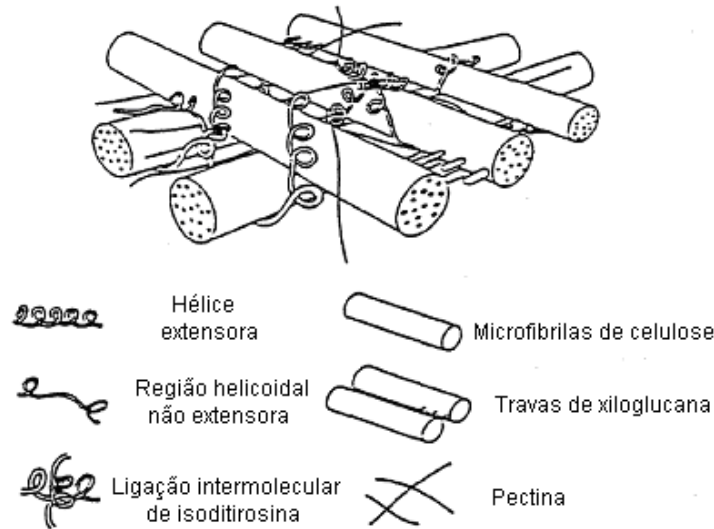


Figura 11: Vista tridimensional do arranjo polimérico na parede celular das plantas (Wilson et al, 1986).

Frutas suculentas, que acabam por perder sua rigidez com o amadurecimento, são exemplos da presença das pectinas que sofreram degradação enzimática e solubilização da protopectina (Mollendrof et al, 1993). Essas enzimas atuam como glicosidases, removendo as cadeias laterais de açúcares neutros das pectinas. No entanto, alguns autores relatam outros mecanismos não hidrolíticos para a diminuição da rigidez dos frutos suculentos, como perda da força iônica dos fluidos que estão presentes na camada de solvatação da parede celular vegetal (Fishman *et al*, 1989).

Dentre as principais fontes de pectinas estão as cascas de frutas cítricas e maçã, pois estão presentes em alta quantidade e com fácil extração. Comercialmente é importante definir a fonte de pectina, visto que cada fonte gera um produto com diferentes capacidades gelificantes e desta forma pode-se escolher qual polissacarídeo é mais interessante para a finalidade desejada (May, 1990).

As pectinas são polidispersas e heterogêneas quanto ao peso molecular e estrutura química e possuem características físico-químicas distintas, dependendo de sua fonte, forma de extração e outras condições ambientais. Mais de 17 monossacarídeos já foram encontrados na estrutura das pectinas, porém de forma geral, essas moléculas são formadas por ligações [1(4)] α -D-ácido galacturônico, com diferentes graus de grupamentos carboxílicos metilesterificados (Figura 9). É um polímero aniônico e relativamente rígido (Williams *et al*, 2007). Sua estrutura é formada pela cadeia principal rica em grupamentos galacturônicos, interrompida e dobrada em intervalos sucessivos por unidades de ramnose (muitas dessas

unidades carregam ainda outras ramificações), alternando com blocos não ramificados, onde as unidades de ramnose são raras (Voragen *et al*, 1995). Assim, a pectina é caracterizada como um copolímero em blocos. Essas ramificações estão conectadas à cadeia principal por ligações α -[1(2)] e podem ser removidas por enzimas pécnicas ou extraídas por processos químicos (Aspinall *et al*, 1968; Barret *et al*, 1965; De Vries *et al*, 1982). Muitas dessas ramificações são caracterizadas como açúcares neutros, que podem compor entre 10 e 15% do peso total da pectina (Thibault & Rinaudo, 1986). Geralmente são arabinose, ramnose, galactose e xilose.

Os grupos presentes nas ramificações da cadeia principal estão sendo estudados como possíveis fatores modificadores das ligações de hidrogênio dentro dos anéis de ácido D-galacturônico, alterando assim as características nanomecânicas das cadeias isoladas. Assim, essas alterações nas ligações de hidrogênio poderiam promover uma modificação no alongamento das cadeias, tornando o polímero menos rígido (Zhang *et al*, 2005). Estudos sobre as características mecânicas da pectina indicam superfície lisa e regular devido seu alto poder lubrificante (Stokes *et al*, 2011). Além de apresentar propriedades viscoelásticas que podem ser moduladas por variação de temperatura e presença de co-solutos (Brandão & Andrade, 1999; Kasapis *et al*, 2000; Erçelebi *et al*, 2009).

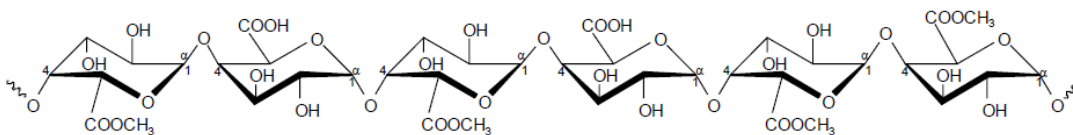


Figura 12: Representação das ligações α -1,4 entre os monômeros da cadeia principal da pectina.

As pectinas podem ser classificadas de acordo com seu grau de metoxilação (*Degree of Methoxylation* – DM ou *Degree of Esterification* - DE): alto grau de metoxilação (HM) quando o total de grupamentos metoxílicos é superior a 50% e baixo grau de metoxilação (LM), quando o total de grupamentos metoxílicos é inferior a 50%. O grau de metoxilação (ou esterificação) interfere em diversas características físico-químicas da pectina, como a solubilidade em água.

A solubilidade da pectina é geralmente facilitada quando a massa molar do polímero é menor e quando existem mais grupos carboxílicos livres na molécula (no caso de pectinas de LM). Entretanto, outros fatores, como pH e temperatura, afetam a solubilização do polímero. O pó comercial de pectinas tende a se hidratar rapidamente, formando aglomerados de porções de pectina semi-secos circundados de uma porção altamente hidratada. Esses aglomerados tendem a se dissolver vagorosamente.

Por ser um polieletrólito, a pectina sofre alterações físico-químicas em sua estrutura de acordo com as condições do meio. Quando solubilizada em meio básico, as cadeias de pectina tendem a se degradar por meio de duas reações opostas, levando à perda de suas propriedades funcionais. Inicialmente, os grupos metoxilados sofrem saponificação, de forma que a cadeia poligalacturônica fica desprotegida e sobre beta-eliminação. A beta-eliminação ocorre somente na presença dos grupos metoxilados e, portanto é inibida perante a saponificação. A predominância de uma reação sobre a outra é controlada pela temperatura e pH. De forma que, em condições alcalinas, temperaturas mais elevadas facilitam a beta-eliminação. Um incremento no pH acarreta em desmetilação predominando sobre a beta-eliminação (Renard & Thibault, 1996).

A reação de beta-eliminação ocorre pela remoção do hidrogênio do carbono 5 e do grupamento glicosídico no carbono 4, promovendo a formação de um composto insaturado que absorve luz a um comprimento de onda de 235 nm. Assim, o monitoramento da absorbância da amostra nesse comprimento de onda pode indicar degradação (Kiss, 1974). Apesar do destaque na incidência desse mecanismo de degradação em pH alcalino, alguns estudos revelam que o mesmo mecanismo pode ocorrer em pH ácido (2,5 a 4,5). Esses dados são relevantes, visto que a maioria dos processos industriais que utilizam a pectina apresenta característica ácida, principalmente na indústria de alimentos.

A beta-eliminação neste caso pode ser confundida com a hidrólise ácida. No entanto, existe um marcador para avaliar o tipo de degradação. A beta-eliminação promove o aumento na taxa de açúcares redutores, proporcional ao aumento na taxa de uronidatos insaturados. No caso da hidrólise ácida, o aumento na taxa de açúcares redutores não é acompanhado pela presença dos uronidatos insaturados. Assim, o monitoramento nesses compostos pode ser utilizado para diferenciar as reações (Diaz *et al*, 2007). Em pH ácido (na faixa de 4,5), a hidrólise ácida é facilitada frente à beta-eliminação. No entanto, pectinas com alto grau de esterificação protegem as cadeias frente esse tipo de degradação, diminuindo a taxa de hidrólise (Diaz *et al*, 2007).

A degradação da pectina acarreta em diminuição da viscosidade natural do polímero e diminuição da massa molar. A viscosidade está intimamente relacionada com as características intrínsecas ao polímero, como volume, massa molar, cargas de superfície e deformabilidade e às características do meio, como pH, temperatura e força iônica. Quando em solução, a pectina pode estar disposta em diversas conformações, como vara, vara segmentada, anéis, áreas circulares ou blocos de moléculas. Essas conformações estão relacionadas com a viscosidade (Brownlee, 2011). A conformação de vara apresenta essa nomenclatura por estar

estendida. As pectinas de massa molar na faixa entre 20.000 e 200.000 g/mol apresentam geralmente essa conformação em água. Em temperaturas maiores, a pectina tende a se contrair, adquirindo uma nova conformação (Masuelli, 2011).

3.5.1 Gelificação

A capacidade de formar géis é motivo de utilização das pectinas pela indústria de alimentos, como espessantes de geléias, por exemplo. A gelificação das pectinas é descrita classicamente na presença de íons cálcio, no entanto, outros agentes catiônicos podem ser utilizados nesse processo.

Os géis são estruturas contínuas tridimensionais formadas por uma malha de moléculas poliméricas. Observando os géis a nível molecular, os géis aquosos devem necessariamente apresentar zonas de junção entre as moléculas do polímero, segmentos de junções entre polímeros relativamente móveis e água entremeada na rede polimérica (Jarvis, 1984).

As zonas de junção estão relacionadas com a união entre duas cadeias poliméricas. Podem envolver uma única ligação covalente ou uma combinação entre diversas ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as cadeias. Essa é uma etapa crítica no processo de gelificação, pois prevê a formação de uma rede hidratada ou de um precipitado. Geralmente os géis de pectina são homogêneos, formadores de uma malha rica em água (Axelos & Thibault, 1991). Alterações no grau de esterificação, presença de açúcares neutros ou acetilação modificam drasticamente a formação das zonas de junção, alterando a textura do gel. As cargas negativas naturais da pectina acabam por causar repulsão entre as cadeias, interferindo nesta etapa.

Geralmente, pectinas HM formam géis em meio ácido (pH abaixo de 3,6) na presença de alta concentração de açúcares. Esses açúcares são responsáveis pela estabilização das zonas de junção, através da promoção de interações hidrofóbicas entre os grupos metoxi. No caso das pectinas LM, a formação de géis se dá pela presença de íons cálcio, que atuam como uma ponte entre os grupos carboxílicos das cadeias poliméricas (Davies *et al*, 1980; Walkinshaw & Arnott, 1981).

As zonas de junção dos géis reticulados com cálcio são descritas pelo modelo conhecido como “*egg-box*” ou caixa de ovo na tradução para o português (Figura 10). Neste modelo, pares de cadeias helicoidais 2_1 são empacotados com os íons cálcio localizados entre elas. Existem átomos de oxigênio das cadeias de ácido D-galacturônico envolvidos na coordenação dos íons cálcio. O complexo formado utiliza os orbitais não preenchidos do cálcio na coordenação, de forma que os

átomos de oxigênio dos grupos hidroxila, os oxigênios presentes nos anéis de ácido D-galacturônico e aos átomos de oxigênio presentes nas cadeias laterais participam do processo de ligação entre as cadeias, através de sua densidade eletrônica (Kohn, 1987).

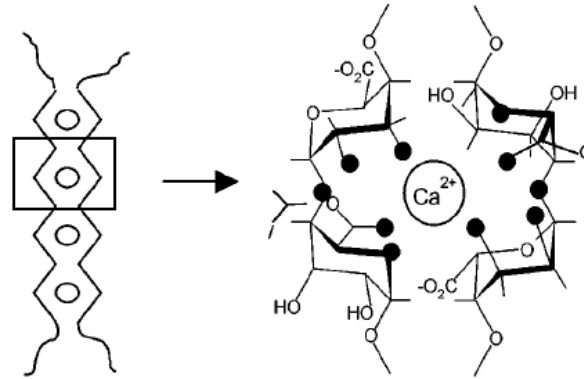


Figura 13: Representação esquemática do modelo "egg-box" (Braccini et al, 2001).

O cálcio é um íon particularmente efetivo no processo de gelificação devido seu raio iônico (0,1 nm) ser grande o suficiente para que se coordene com os átomos de oxigênio dispostos entre as cadeias. Os grupos metoxi auxiliam no processo de gelificação, prevenindo a formação de zonas de junção nos segmentos inter-junções, tornando a malha de gel mais flexível (Thakur *et al*, 1997). Devido à facilidade das pectinas em formar géis, alguns estudos relatam esse potencial na formação de partículas micro e nanométricas.

3.5.2 Partículas de pectina

Existem diversas metodologias que podem ser empregadas para a obtenção de partículas de pectina. Geralmente, é necessária a presença de um agente reticulante (ou agente de *crosslinking*) capaz de manter a arquitetura da malha de pectina em sua forma particulada. Em alguns casos, é necessária a complexação de outros componentes, poliméricos ou não, para que se obtenham as características desejadas de solubilidade, estabilidade ou tamanho. Por ser biocompatível, biodegradável e hidrossolúvel, a pectina é citada como potencial polímero na obtenção de micropartículas em formulações farmacêuticas de liberação controlada (Sriamornsak *et al*, 1999).

O método mais simples para a obtenção de micropartículas de pectina é a gelificação iônica, utilizando o cloreto de cálcio como agente reticulante. Ogonczyk e colaboradores desenvolveram em 2011 um dispositivo microfluídico para a

gelificação da pectina dentro do microcanal, obtendo micropartículas na faixa de 40 a 100 µm de diâmetro. Outros agentes reticulantes podem ser utilizados na gelificação iônica da pectina, como o acetato de zinco (El-Gibaly, 2002). Neste caso, o antiinflamatório cetoprofeno foi encapsulado em microesferas de pectina com aproximadamente 1,9 a 2,2 mm de diâmetro.

O método de coacervação complexa é utilizado na obtenção de micropartículas de pectina, geralmente associada a outro polímero ou proteína. O uso de micropartículas de pectina para liberação controlada de ativos no cólon é estudado, devido à presença de enzimas pectinases no intestino, auxiliando na clivagem das ligações glicosídicas da pectina e liberando o ativo encapsulado. Assim, muitos autores descrevem seus sistemas de liberação, geralmente de pectina associada a outro composto, submetidos à secagem em *spray-drying*.

O uso de amido de milho associado à pectina em micropartículas é responsável pela alta eficiência de encapsulação, além de promover a proteção do diclofenaco de sódio em pH gástrico. O diclofenaco de sódio é liberado por meio de difusão e/ou erosão das micropartículas (Desai, 2005). Microesferas de pectina e quitosana são descritas como sistemas para a liberação controlada de vancomicina no cólon, devido a capacidade mucoadesiva da quitosana associada à dissolução da pectina na presença das pectinases intestinais. O pH alcalino do cólon auxilia na liberação do fármaco (Bigucci *et al*, 2009).

Outros métodos, como a desidratação de emulsões podem ser citados na obtenção de micropartículas de pectina. Esposito e colaboradores demonstraram em 2001 a encapsulação dos antibióticos tetraciclina e metronidazol em diversas condições de processo. No entanto, as microesferas obtidas apresentaram tamanhos irregulares, agregados ou superfície áspera e porosa, além de sua rápida dissolução em meio aquoso, indicando que o esse método não apresenta grande controle da preparação de micropartículas de pectina.

A obtenção e aplicação de micropartículas de pectina possuem grande acervo na literatura, de forma que os sistemas citados são apenas alguns exemplos das tecnologias desenvolvidos nessa finalidade. Por outro lado, a obtenção de sistemas nanoparticulados envolvendo a pectina é um campo pouco estudado. Geralmente a obtenção de nanopartículas de pectina se dá pela associação do polímero a uma outra matéria-prima, protéica na maioria dos casos, para a formação de um complexo polieletrólítico. Esse processo exige alteração do pH ou temperatura para que seja efetivo. Existem alguns artigos de revisão que citam as diversas metodologias e materiais utilizados na obtenção das nanopartículas, bem como as condições experimentais utilizadas e os resultados obtidos (Tabela 2).

Tabela 2: Revisão do uso da pectina na obtenção de nanopartículas de PECs (Fonte: Jones et al, 2011).

Protein	Polysaccharide	Thermal conditions (T, t, pH _i)	Particle properties (d; ζ)	Experimental variables (source)
<i>Type 1 particles</i>				
β-Lg (0.5%)	BP (0.1%)	80 °C, 15 min, pH 5.8	300 nm; -32 mV; pH 5	pH _i , pH _F , [PS], T (Santipanichwong et al., 2008)
LF (0.2%)	HMP (0.1%) DM 54	91 °C, 20 min, pH 7	285 nm; -44 mV	pH _i , pH _F , [PS], T (Peinado et al., 2010)
	Car (0.1%)		380 nm; -62 mV	
	Alg (0.1%)		495 nm; -62 mV	
β-Lg (0.1%)	HMP (0.05%) DM 54	85 °C, 15 min, pH 5.8	430 nm; -33 mV; pH 4.5	pH _i , pH _F , I _p , T, preparation method (Jones et al., 2010b)
<i>Type 2 particles</i>				
β-Lg (0.5%)	BP (0.1%) DM 50	83 °C, 15 min, pH 5	361 nm; -30 mV; pH 4.8	pH _i , pH _F , [PS], T (Jones et al., 2009)
β-Lg (0.5%)	BP (0.1%) DM 50	83 °C, 15 min, pH 5	357 nm; -31 mV; pH 5	pH _F , I _p , I _z (Jones and McClements, 2008)
β-Lg (0.1%)	BP (0.1%) DM 50	85 °C, 25 min, pH 5	199 nm; pH 4.5	pH _F , Cosolvents (Chanasattru et al., 2009)
β-Lg (0.5%)	HMP (0.25%) DM 71	85 °C, 18 min, pH 4.75	309 nm; -25 mV; pH 5	pH _i , pH _F , T (Jones et al., 2010a)
	LMP (0.25%) DM 32		225 nm; -43 mV; pH 5	
	Car (0.25%)		687 nm; -59 mV; pH 5	
β-Lg (0.1%)	HMP (0.05%) DM 71	83 °C, 15 min, pH 4.75	213 nm; -32 mV; pH 5	pH _i , pH _F , [PS], I _p , T (Jones et al., 2010c)
	LMP (0.05%) DM 32		238 nm; -24 mV; pH 5	
β-Lg (0.1%)	HMP (0.05%) DM 54	85 °C, 15 min, pH 4.75	304 nm; -33 mV; pH 4.5	pH _i , pH _F , I _p , T, preparation method (Jones et al., 2010b)
β-Lg (0.5%)	HMP (0.25%) DM 54	Variable	250-600 nm; -38 mV; pH 4.75	pH _i , I _p , [P], T, t (Jones and McClements, 2010d)
β-Lg (0.5%)	Chitosan (0.1%)	80 °C, 20 min, pH 4.5	140 nm; +20 mV; pH 5	pH _i , pH _F , I _p , T, preparation method (Hong and McClements, 2007)

Yu e colaboradores descreveram em 2009 a obtenção de nanopartículas formadas apenas por pectina através de uma metodologia inovadora. Neste estudo, foram utilizados dois íons para estabilização das cadeias de pectina em um arranjo tridimensional nanoparticulado: o cátion cálcio e o ânion bicarbonato. Foram obtidas nanoesferas e nanovesículas sensíveis ao pH, de forma que o ativo encapsulado (fluoracil) foi liberado de forma controlada. No entanto, as partículas obtidas apresentam distribuição larga em diâmetros, passando de um sistema nano para microestruturado. Assim, o presente trabalho sugere a obtenção de nanopartículas de pectina através de gelificação eletrostática com maior controle da distribuição de diâmetro das partículas obtidas.

3.6 Peptonas vegetais

As peptonas são polipeptídeos puros ou em mistura com proteínas. São obtidas pela hidrólise enzimática de proteínas de fontes animais, microbianas ou vegetais em meio ácido. A enzima pepsina atua nas ligações peptídicas presentes nas proteínas, clivando-as de forma aleatória (Figura 12). Portanto, o produto final apresenta segmentos de proteínas de diversos tamanhos e composições de aminoácidos ou proteínas inteiras, que não sofreram a ação hidrolítica.

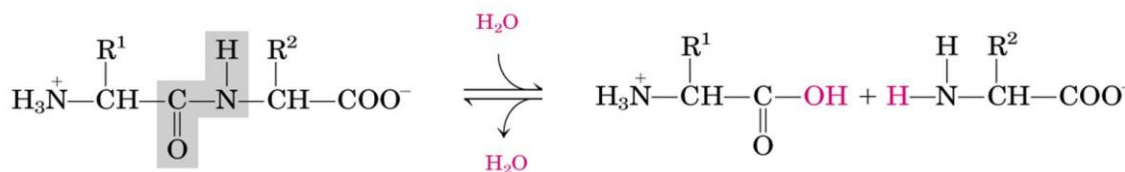


Figura 14: Esquema genérico da ação enzimática na clivagem da ligação peptídica, em meio aquoso.

Por serem derivados protéicos, as peptonas podem se apresentar como aminoácidos livres ou ligados entre si por ligações peptídicas. Os aminoácidos são

compostos orgânicos que apresentam pelo menos um grupo carboxílico e um grupo amino. Esses grupos são geralmente descritos em sua forma não ionizada, mas podem estar carregados em sua forma de zwitterion, isso é, com ambos grupos ionizados. Podem existir grupos carregados na cadeia lateral dos aminoácidos, como no caso do aspartato e glutamato que podem apresentar carga negativa em sua cadeia lateral, enquanto a lisina, arginina e histidina podem apresentar cargas positivas. Devido suas características estruturais, os aminoácidos são geralmente solúveis em água (dependendo de sua cadeia lateral), degradam a altas temperaturas e apresentam dependência do pH para determinação da carga da molécula.

Para a determinação das cargas dos aminoácidos é necessário conhecer o conceito de ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico é o pH no qual a molécula não apresenta carga total. O aminoácido pode estar em sua forma de zwitterion e ainda não apresentar carga total (Lehninger, 2003). Cada aminoácido apresenta um ponto isoelétrico diferente. De forma geral, em faixas de pH acima do ponto isoelétrico, a carga do aminoácido é negativa, enquanto valores de pH abaixo desse ponto geralmente viabilizam o aparecimento de cargas positivas. Isso ocorre devido à disponibilidade de grupos ácidos (H^+) que interagem com os grupos ativos do aminoácido (grupo carboxílico e grupo amino). Na tabela 3 pode-se verificar o ponto isoelétrico de cada aminoácido.

Tabela 3: Relação dos pontos isoelétricos para os aminoácidos (Lehninger, 2003).

	pKa do COOH	pKa do NH₃	Ponto Isoelétrico
Alanina	2,34	9,69	6,02
Arginina	2,01	9,04	10,76
Aspartato	2,10	9,82	2,98
Cisteína	2,05	10,25	5,02
Glutamato	2,10	9,47	3,08
Glicina	2,34	9,60	5,97
Histidina	1,77	9,18	7,64
Isoleucina	2,36	9,68	6,02
Leucina	2,36	9,68	6,02
Lisina	2,18	8,95	9,74
Metionina	2,28	9,21	5,74
Fenilalanina	1,83	9,13	5,48
Prolina	1,99	10,60	6,30
Serina	2,21	9,15	5,68
Tirosina	2,20	9,11	5,63
Treonina	2,63	10,43	6,53
Triptofano	2,38	9,39	5,89
Valina	2,32	9,62	5,97

As peptonas vegetais são componentes amplamente utilizados em cultivos microbianos, como fontes nutricionais de compostos nitrogenados. Diferente dos meios de cultura mais clássicos, como o extrato de levedura, as peptonas são extraídas de vegetais, reduzindo assim a contaminação do microorganismo ou do produto de interesse por componentes provenientes do próprio meio de cultura. Ainda, as peptonas vegetais apresentam um caráter de matéria-prima sustentável, segura e de fácil manipulação, principalmente por sua alta solubilidade em água. Existem diversas fontes para a extração de peptonas de vegetais, sendo as mais comuns a batata, trigo, ervilha, pêra e soja.

Existem diversos relatos apontando uma otimização no crescimento de bactérias e na produção de componentes de interesse em função do uso de peptonas vegetais como fonte nutricional quando comparados a outros meios de cultura (Zisu & Shah, 2003; Izawa *et al*, 2010). Recentemente, o aumento na concentração de ácido hialurônico e um aumento na massa molar do ácido hialurônico foi obtido pela suplementação do meio de cultura com peptonas vegetais, principalmente com o uso de peptonas de soja e trigo (Benedini, 2012). Assim, as peptonas vegetais apresentam características nutricionais desejadas aos microorganismos e podem substituir alguns componentes no meio de cultura em determinadas ocasiões.

Devido sua grande utilização em microbiologia, existem diversas empresas que fornecem peptonas vegetais prontas para serem incorporadas às culturas. Essas empresas disponibilizam assim a composição dos aminoácidos livres e totais presentes nas peptonas (Tabela 4).

Tabela 4: Composição de aminoácidos totais e livres presentes em peptona de soja (PS), peptona de trigo (PT) e peptona de batata (PB). Fonte: Organotechnie.

Aminoácidos	PS (g.100g ⁻¹)		PT (g.100g ⁻¹)		PB (g.100g ⁻¹)	
	Total	Livre	Total	Livre	Total	Livre
Alanina	2.6	0.7	2.1	0.4	2.8	1.3
Arginina	3.8	1.5	3.1	0.7	2.6	2.1
Ác. aspártico	5.8	0.3	2.9	0.1	6.7	1.2
Cisteína	1.1	0.1	2.0	0.1	0.0	0.0
Ác. glutâmico	11.0	2.1	29.0	0.3	6.3	1.6
Glicina	2.4	0.5	3.1	0.7	2.8	0.7
Histidina	1.3	0.3	2.1	0.4	1.4	1.4
Isoleucina	2.6	0.4	2.2	0.2	3.2	1.9
Leucina	3.8	1.3	4.7	1.5	5.4	4.2
Lisina	3.8	0.9	1.7	0.3	4.3	2.6
Metionina	0.5	0.2	1.4	0.3	0.0	0.9
Fenilalanina	2.3	0.7	3.4	0.5	1.9	1.5
Prolina	2.6	0.1	9.2	0.0	3.0	1.0
Serina	2.7	0.8	4.3	0.7	2.8	1.7
Treonina	2.2	0.4	2.2	0.3	3.1	2.5
Triptofano	0.4	0.2	0.4	0.1	1.3	1.1
Tirosina	1.7	0.4	1.8	0.5	2.1	2.1
Valina	2.5	0.6	2.9	0.2	3.7	2.5

Nota-se que existe uma grande quantidade de aminoácidos essenciais disponíveis na composição das peptonas vegetais, de forma que a escolha da peptona é dependente da composição de aminoácidos desejada.

As peptonas pertencem à família das proteínas hidrolisadas, porém nem toda proteína hidrolisada é considerada uma peptona. Esses materiais diferem quanto ao tamanho de suas cadeias. Geralmente, as peptonas apresentam menor tamanho, podendo chegar aos aminoácidos livres, dependendo do grau de hidrólise. No caso de uma proteína hidrolisada alcançar essa característica, passa a ser denominada peptona.

A distribuição de pesos moleculares das peptonas comerciais indica que apresentam tamanho reduzido, como observado na tabela 5.

Tabela 5: Distribuição dos pesos moleculares das peptonas vegetais de batata (PB), de soja (PS) e de trigo (PT). Fonte: Organotechnie. (ND=não determinado)

	PB (g.100 g-1)	PS (g.100 g-1)	PT (g.100 g-1)
> 10 000 Da	1,2	0,0	0,0
1 000 - 10 000 Da	15,1	2,6	2,5
500 - 1 000 Da	13,0	14,1	37,0
300 - 500 Da	19,1	27,3	42,4
< 300 Da	51,6	56,0	18,1
Peso molecular médio	ND	227 Da	474 Da

3.6.1 Uso de proteínas hidrolisadas

As proteínas hidrolisadas são utilizadas pela indústria de alimentos ou de cosméticos, e são geralmente provenientes de vegetais, como a soja e o trigo. O processo de hidrólise de proteínas é decorrente das condições do meio em que a proteína está inserida. Dentre os fatores que influenciam drasticamente a hidrólise das proteínas estão o pH e a temperatura. Quando em presença de base ou ácido forte diluído e temperatura elevada, ocorre a hidrólise das proteínas, formando α -aminoácidos. A hidrólise pode ocorrer pela presença de enzimas que clivam as ligações peptídicas, como a pepsina e a erepsina presentes no corpo humano. Em ambos os casos a hidrólise ocorre de forma aleatória, dificultando assim o controle do tamanho do hidrolisado final.

Alguns estudos relatam a viabilidade da hidrólise seletiva e geralmente enzimática (Chaudry et al, 1997). Neste caso, as enzimas apresentam em seu sítio de ação alguns componentes que selecionam o substrato, ou necessitam de algum ativador para que iniciem o processo hidrolítico. Para tanto, é necessário modificar estruturalmente o sítio ativo ou a proteína que será clivada para que a enzima possa atuar. Os produtos à base de proteína hidrolisada são utilizados pela indústria de alimentos, pois poupam algumas etapas no processo de digestão e podem conferir características desejadas aos alimentos, como reduzir a carga alergênica do leite (Beresteijn et al, 1998).

No caso da indústria de cosméticos, existem diversos estudos, geralmente patenteados por grandes empresas, sobre o uso de proteínas hidrolisadas, para aplicações em pele e principalmente em cabelos.

3.6.2 Proteínas hidrolisadas em cabelos

O apelo para o uso dessa matéria-prima em cabelos está baseado na perda de proteína natural dos fios (queratina) por processos agressivos diários, como a escovação, exposição à luz UV e processos químicos como coloração ou alisamento. Desta forma, as proteínas hidrolisadas podem atuar na reposição da cutícula danificada e agir como um escudo protetor às agressões externas (Cannell & Nighi, 2000).

Em 1993, Gamez-Garcia demonstrou um estudo da aplicação de proteínas hidrolisadas de trigo em fios de cabelo, comprovando o aumento na resistência à tração mecânica das fibras, quando ainda molhadas ou durante o processo de secagem. Esse efeito foi conferido à capacidade das proteínas se trigo impedirem a perda de água pelo cabelo, atuando assim como um agente hidratante. Em 1999,

Chahal e Challoner desenvolveram a metodologia de sorção dinâmica de vapor, eficiente para a comprovação da manutenção da umidade dos fios pelas proteínas hidrolisadas de trigo, corroborando com os resultados obtidos anteriormente. Ainda nesse sentido, Swift e colaboradores determinaram em 2000 a estrutura capilar responsável por esses efeitos, através da marcação da proteína hidrolisada de trigo com agentes fluorescentes e verificação dos fios em microscópio de varredura confocal a laser. Os resultados indicam a extensa penetração dos peptídios nos fibras, principalmente na região da endocutícula e córtex, distribuídos nas porções nucleares, na matriz intermacrofibrilar e em toda a extensão dos limites celulares.

Existem diversas formulações comerciais contendo proteínas hidrolisadas para a aplicação em cabelos, geralmente combinadas com outros componentes. Como exemplo, pode-se citar os produtos Hydrotriticum 2000® e Cropeptide W ® da Croda Inc., compostos por proteína parcialmente hidrolisada de trigo apenas e com a proteína combinada com amido hidrolisado de trigo, como agente formador de filme. Proteínas hidrolisadas de seda combinadas com silicones são promissoras, por unirem sinergicamente as características de hidrofiliabilidade do hidrolisado com a hidrofobicidade dos silicones, conferindo retenção da coloração, hidratação e substantividade aos fios (Koyanagi, 2007).

Nota-se a necessidade em se obter uma matéria-prima com tamanho suficiente para penetrar nos fios saudáveis ou danificados, conferindo as características desejadas. E, portanto, a incorporação de um sistema micro e nanoestruturado pode promover maior permeação dos componentes hidrolisados nas fibras capilares, impedindo que esse composto seja facilmente removido pela água durante a lavagem.

3.6.3 Sistemas micro/nanoestruturados de proteínas hidrolisadas

Alguns estudos foram realizados no sentido de verificar a formação de micro ou nanopartículas de proteínas hidrolisadas. O próprio processo de hidrólise das proteínas pode contribuir para a formação de agregados micro/nanométricos do produto hidrolisado. Jong e Peterson, em 2008, descreveram a obtenção de nanoagregados da ordem de 150 nm através da hidrólise alcalina de proteína de soja. Esses nanoagregados quando misturados a compostos de estireno-butadieno conferem maior elasticidade ao látex.

Ainda utilizando a soja como matéria-prima, foram obtidas micropartículas da ordem de 1 a 4 µm através de processamento em spray-drying do hidrolisado protéico misturado a uma solução contendo ácido cítrico e carbonato de cálcio (Canabady-Rochelle et al, 2010). O experimento foi proposto para a utilização das micropartículas na indústria de alimentos. O carbonato de cálcio é utilizado como

suplementação de cálcio em alimentos ou bebidas, no entanto o sal apresenta baixa solubilidade em meios aquosos e tende a se cristalizar. Na tentativa de reduzir a cristalização e aumentar sua solubilidade, foi proposto o uso de um agente acidificante (ácido cítrico) e de um agente quelante (proteínas hidrolisadas de soja). Desta forma, ocorre a ligação entre os resíduos de aspartato e glutamato, negativamente carregados presentes no hidrolisado protéico, com os íons cálcio positivamente carregados.

Outras matérias-primas foram testadas na obtenção de sistemas microestruturados de proteínas hidrolisadas, como o caso do colágeno. O hidrolisado de colágeno, na faixa de pH estudado, apresentou cargas positivas, e portanto foi submetido à deposição camada a camada em partículas de óxido de zinco, seguida de recobrimento com polieletrólito negativamente carregado. Assim, por meio de atração eletrostática foi realizada a deposição do hidrolisado de colágeno para a obtenção de micropartículas da ordem de 40 a 50 μm (Suflet et al, 2010). O processo de obtenção dessas partículas pode ser observado na figura 15. Visto que o colágeno é um componente naturalmente encontrado no corpo humano, esse sistema particulado foi proposto como dispositivo de liberação controlada de ativos para indústrias farmacêuticas.

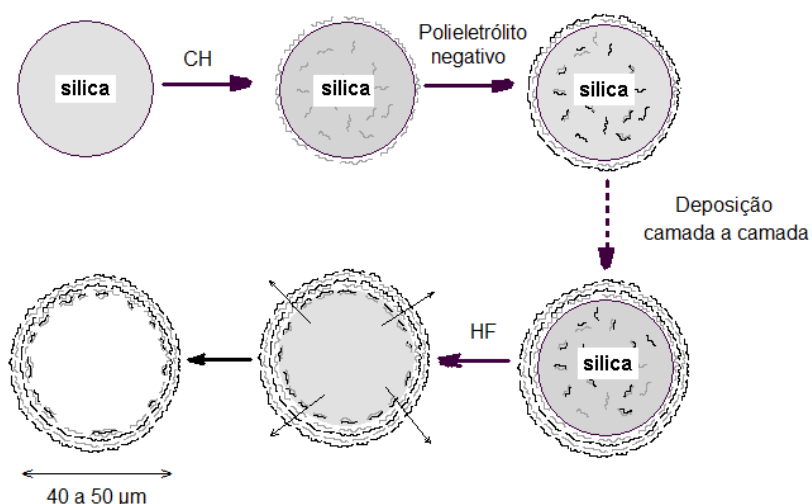


Figura 15: Representação esquemática da obtenção de micropartículas de colágeno hidrolisado (CH) em esferas de sílica por deposição camada a camada (Adaptado de Suflet et al, 2010).

O uso de proteínas hidrolisadas em matrizes de spray-drying pode promover benefícios, pois se trata de componentes ativos na proteção ou liberação do ativo encapsulado. Em estudos realizados com a caseína hidrolisada para a encapsulação de óleo de peixe, os autores propõem a matriz de proteína hidrolisada devido sua hidrofiliicidade, promovendo a encapsulação do sistema lipofílico oleoso.

Porém a oxidação do óleo foi rápida, indicando baixa eficiência de encapsulação neste caso (Drusch et al, 2012). O tamanho das partículas obtidas não foi publicado nesse estudo.

É possível verificar que o ramo de sistemas microestruturados utilizando proteínas hidrolisadas é carente de estudos. No entanto, as aplicações apresentadas indicam grande potencial dessa matéria-prima em matrizes de partículas micrométricas ou como ingredientes ativos de dispositivos de liberação controlada. Portanto, o presente trabalho pretende reunir as características nutricionais das peptonas com os benefícios de sistemas micro e nanoestruturados para a aplicação em cosméticos, através da reticulação eletrostática.

3.7 Agentes Reticulantes

Estudos relatam o uso do cloreto de cálcio como agente reticulante clássico em métodos de gelificação iônica de polímeros aniônicos como a pectina e o alginato (Sinjan, 2003; Esposito et al, 2001). No entanto, os produtos obtidos não são utilizados para aplicações capilares. Marcelino (2008) descreve o uso da goma guar quaternizada como agente reticulante na produção de nanopartículas de sericina para aplicação em produtos capilares.

3.7.1 Goma guar quaternizada

A goma guar quaternizada é obtida a partir da planta Guar (*Cyamopsis tetragonoloba L.*) e modificada sinteticamente para que possua o grupamento quaternário de amônio, passando a ser guar hidroxipropiltrimonium cloreto. Sua massa molar varia entre 50 a 2500 KDa (Dias, 2003).

Este composto é considerado um hidrocolóide natural, oriundo do endosperma das sementes da planta guar, de estrutura intermediária entre esférica (como a amilopectina) e linear (como a celulose). Sua cadeia principal apresenta unidades de manose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, de forma que a cada segunda unidade existe uma ramificação de unidades de galactose unidas por ligações α -1,6 (Figura 16). Alguns grupamentos hidroxila livres podem estar presentes na cadeia principal ou nas cadeias laterais, como na maioria dos polissacarídeos naturais (Ray et al, 2005).

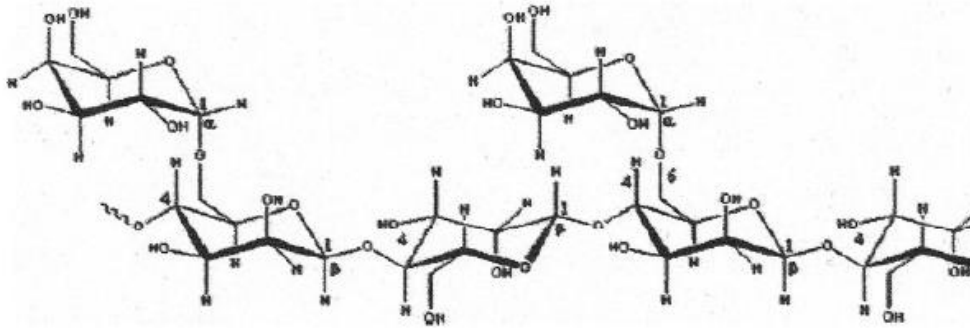


Figura 16: Estrutura química da goma guar.

Quando em sua forma quaternizada, a goma guar é comercializada pela empresa Rhodia como Jaguar C13®. Trata-se de um polímero de alta massa molar (Figura 17), que apresenta excelentes propriedades condicionantes para produtos cosméticos para a pele e o cabelo. Este componente pode ser utilizado em xampus, cremes e outros produtos de cuidado pessoal (Rhodia, 2012).

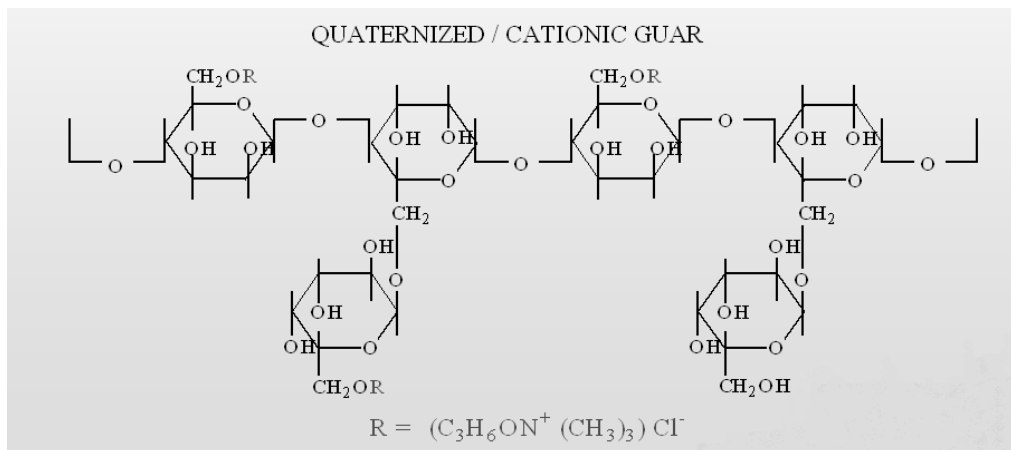


Figura 17: Estrutura molecular do Jaguar C13®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item está apresentado na forma de capítulos contendo os artigos submetidos aos periódicos científicos relacionados aos temas estudados.

O primeiro artigo apresentado (*Effects of the esterification degree and the crosslinking agent on the properties of colloidal particles of citrus pectin*) trata-se da influência do grau de esterificação e dos agentes de reticulação nas propriedades de partículas coloidais de pectina cítrica. Este trabalho demonstra a preparação e caracterização de partículas coloidais de dois tipos de pectina cítrica, que diferem quanto ao grau de esterificação e massa molar. Para tanto foram utilizados dois agentes de reticulação: o cloreto de cálcio e a goma guar quaternizada.

O segundo artigo (*Rheological properties of citrus pectin dispersions and its blends with polyquaternium-7 and colloidal particles*) trata-se do estudo das propriedades reológicas de dispersões aquosas de pectina cítrica na presença do copolímero poliquaternium-7 e de partículas coloidais (micro e nanométricas) de pectina.

O terceiro artigo (*Potential of vegetable peptones for production of colloidal particles by ionic crosslinking*) apresenta a preparação e caracterização de partículas coloidais de dois tipos de peptonas vegetais na presença dos agentes de reticulação cloreto de cálcio e goma guar quaternizada.

4.1 *Effects of the esterification degree and the crosslinking agent on the properties of colloidal particles of citrus pectin*

Artigo submetido ao periódico científico *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*

Effects of the esterification degree and the crosslinking agent on the properties of colloidal particles of citrus pectin

MARTINEZ, R. M.^a, SANTANA M. H. A.^{a*}

^aLaboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

*Corresponding author – Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

+ 55 19 35213921 lena@feq.unicamp.br

Abstract

Pectin is a natural, anionic, biodegradable and biocompatible polysaccharide extracted from citrus peels that has gelation capability due to its electrostatic interactions with cationic ions. The aim of this study was to investigate the effects of crosslinking agents (i.e., calcium chloride or quaternized guar gum) on the mean diameter, polydispersity, zeta potential and morphology of colloidal particles of citrus pectin. These particles were generated from two different pectins, which have a degree of esterification of 79% for pectin A and 56.5% for pectin B, using a facile and scalable production process. The results showed that the production of nano-sized pectin particles is feasible in a bottom-up process. The mean diameter can be controlled by the nature of the crosslinking agent, the degree of esterification and the concentration of pectin. The performance of divalent ions, such as calcium, is better for the highest degrees of esterification (i.e., in A pectin), while the polymeric crosslinking agents, such as quaternized guar gum, performed better at the lowest concentrations (2.0 g/L) of pectin A and the highest concentrations (10.0 g/L) of pectin B. These results contribute to the production of nano-sized pectin particles for applications in various fields.

Keywords: Citrus pectin, crosslinking, colloidal particles.

1. Introduction

Biopolymers are widely used by the pharmaceutical and food industries due to their biodegradable and biocompatible properties¹. Among these biopolymers, citrus pectin is an attractive polysaccharide that is easily extracted from citrus peels, which are sustainably available in subtropical and tropical climates. Pectin is an anionic polymer formed by residues of D-galacturonic acid linked by α -[1,4] glycosidic linkages in the backbone and methyl-esterified carboxyl groups. The side chains are linked by α -[1,2] linkages with neutral sugars, such as rhamnose². The amount of methyl-esterified carboxyl groups determines the degree of esterification (DE) of the pectins, where a DE over 50% characterizes highly esterified pectins. The DE is related to the pectin properties of water solubility, molecular weight and reactivity to calcium and can be modified by chemical or enzymatic reactions³. In general, pectin applications are associated with its gelation ability in the presence of cationic agents, such as calcium chloride (CaCl_2). It is known that calcium binds with high selectivity to D-galacturonic acid groups, inducing the pectin chains to come closer together in the presence of calcium binding with high selectivity for the formation of junction zones in the gel structure⁴.

The wide range of pectin types obtained from various extraction processes have primarily been used as flat gels or in the form of microparticles in food, pharmaceutical and cosmetic applications^{5,6,7}. They might be used as carriers for drug delivery or the structures can present properties themselves.

The classical method for obtaining microparticles of pectin gels is the ionic method, which uses calcium chloride as a crosslinking agent. The calcium ion is particularly effective in the gelation process because its ionic radius (0.1 nm) is large enough to coordinate with the oxygen atoms arranged between the pectin chains. The methoxy groups assist the gelation process by preventing the formation of junction areas between interjunctions segments, resulting in a more flexible gel structure⁸.

In 2011, Ogonczyk and colleagues⁷ developed a microfluidic device for gelating pectin inside a microchannel and obtained microparticles in the range of 40 to 100 micrometers in diameter. Other cationic agents have been studied for crosslinking pectin, such as magnesium and zinc acetate, which were used to encapsulate pharmaceutical actives in microparticles that were 1.9 to 2.2 μm in diameter^{9,10,11}. Cationic polymers have also been cited as pectin crosslinking agents, such as chitosan⁸. In this context, the use of quaternized guar gum (QGG) is proposed as a crosslinking agent due to its effectiveness in obtaining sericin nanoparticles¹². Guar gum is obtained from the plant Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and synthetically modified with a quaternary ammonium group. The molar mass

range of guar gum is 50-2500 kDa¹³. Nanoparticles are beneficial to several biological applications reported in the literature, due to their properties related to area and surface energy^{14,15,16}. However, studies on production of pectin nanoparticles are limited. Highly polydisperse nanoparticles have been prepared from 74% galacturonic acid (approx.) pectin crosslinked with sodium bicarbonate and calcium hydroxide⁸. The formation of nanoparticles from pectin and protein was reported in a recent investigation of protein and polysaccharide complexes¹⁰.

Herein, we present a systematic study of the influence of the degree of esterification and the concentration of citrus pectin on the properties of colloidal particles produced by ionic crosslinking with calcium chloride (CaCl₂·2H₂O) and quaternized guar gum (QGG) under mechanical stirring.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Two commercial pectins, which were both extracted from citrus peel fruits with different DE, were purchased from CPKelco (Limeira, SP, Brazil). Sodium hydroxide, calcium chloride (CaCl₂·2H₂O), silver nitrate and all of the other chemicals were of analytical grade. QGG (Jaguar C13®) was obtained from Rhodia (Campinas, SP, Brazil). Ultrapure water was used throughout the experimental studies.

2.2 Characterization of pectins

The pectins were characterized by their molecular weight (M_w) and DE. For the average molecular weight, the Mark Houwink-Sakurada equation (Eq. 1) was applied, where the k (0.3) and a (0.613) parameters were estimated for a 0.1 mol/L sodium phosphate buffer at pH 7.0 and 25°C¹⁰. The viscosity data (Eq. 2) were obtained using a Cannon-Fenske viscometer with a capillary number of 100. The determinations were performed in triplicate.

$$[\eta] = k[M_w]^a \quad (\text{Eq. 1})$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_r - 1}{C} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

where η is the intrinsic viscosity, η_r is the relative viscosity, and C is the pectin concentration in g/L.

The DE was characterized using a titrimetric method². Briefly, the samples were prepared with 5 g of each pectin, and the samples was stirred with 5 mL of HCl (2.7 M) and 100 mL of ethanol (60% v/v) for 10 min, followed by filtration through a

glass funnel under vacuum using a membrane with a porosity of 45 μm . The retained pectin was washed six times with 15 mL of the same HCl-ethanol mixture cited above, followed by washing with ethanol (60% v/v) until the filtrate exhibited a negative response for the reaction with silver nitrate, which indicated the absence of chloride ions. Finally, the collected pectin was washed with anhydrous ethanol and dried at 105°C. The DE was determined by titration. The dried sample (500 mg) was transferred to a 250 mL flask and moistened with 2 mL of ethanol and 150 mL of carbon dioxide-free water. After complete dissolution, the solution was titrated with 0.1 M NaOH in the presence of a phenolphthalein indicator (five drops), and the result was recorded as the initial titer. Then, 20 mL of 0.5 M NaOH was added under stirring, and the mixture was allowed to stand for 15 min to de-esterify the pectin prior to the addition of 20 mL of 0.5 M HCl, which was followed by shaking until the pink color disappeared. Phenolphthalein (three drops) was added, and the solution was titrated with 0.1 M NaOH until a faint pink color persisted after vigorous shaking (end-point). This titration result was recorded as the final titer. The DE was calculated using equation 3.

$$\text{DE}(\%) = [\text{final titer} / (\text{initial titer} + \text{final titer})] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

2.3 Production of pectin particles

Each pectin was dissolved in ultrapure water to form a 10.0 g/L mother solution under mechanical stirring (300 rpm) for 6 hours. The pH of the solution was corrected to 7.0 with 0.5 M NaOH to guarantee that all of the pectin carboxyl groups were ionized and available for ionic interaction. Lower concentrations (i.e., 7.5 g/L, 5.0 g/L and 2.0 g/L) were obtained by water dilution. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and QGG were dissolved in ultrapure water under mechanical stirring (300 rpm) for 10 min to form solutions with concentrations of 10.0 g/L and 1.0 g/L, respectively. These solutions were used as crosslinking agents at the mass ratios ($\times 100$) of 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 for $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: pectin and 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 for QGG: pectin. The particles were produced via ionic crosslinking via the addition of the crosslinking agents under mechanical stirring (300 rpm). The total volume of crosslinking agent solution was divided into three parts, added gradually in 15 minutes intervals.

2.4 Characterization of pectin particles

The pectin particles were characterized by measuring the mean diameter, polydispersity and zeta potential using a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, UK) at a fixed angle of 173° and a temperature of 25°C.

The morphology of the particles was characterized using a high-resolution scanning electron microscope (Leica, Leo 440-i-SEM, England). A droplet of the

suspension was dried naturally over double-adhesive tape attached to an aluminum stub for one week. Then, the stubs were coated with gold to a thickness of ~92 Å under an argon atmosphere. The coated samples were randomly scanned.

2.5 Statistical analysis

The variance was analyzed using the ANOVA method, and the media were compared using Tukey's test at a 5% probability level ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1 Molecular weight and degree of esterification of pectins

Table 1 shows the results obtained for the Mw and DE for the two studied pectins. The pectin with the highest Mw was named pectin A, while the one with the lowest Mw was named pectin B. The DE determinations revealed that both are highly esterified pectins because their values are above 50%. Pectin A has a DE that is 2.5 times greater than that of pectin B.

Table 1. Intrinsic viscosity $[\eta]$, molecular weight (Mw) and degree of esterification (DE) of pectins A and B

Pectin	$[\eta]$ (L/g)	Mw (g/mol)	DE (%)
A	407.575	129,143	79.09
B	141.835	54,229	56.54

3.2 Properties of the colloidal pectin particles

3.2.1 Influence of the crosslinking agent

The zeta potential describes the particle's electrophoretic mobility based on the balance between negative and positive ions present on the Stern layer. Figure 1 shows the zeta potential measurements for the pectins as function of the mass ratio between crosslinker: pectin. Pectin B exhibited a greater modulus value for the zeta potential than pectin A due to its smaller DE resulting from an increased availability of carboxyl groups. In both cases, the zeta potential ranged from -30 to -60 mV, which provide the particles with colloidal stability due to the predominance of repulsive forces¹⁷. However, for the range of mass ratios studied, the polyelectrolyte complexes from QGG did not significantly change the zeta potential (i.e., differences less than 5%). This behavior indicated that the large chains in the QGG were internalized into the particles and that the pectin groups at the surface were not changed. In contrast, due to the small size of the Ca^{2+} ions, the zeta potential of the particles increased slightly with their weight ratios relative to pectin, as expected.

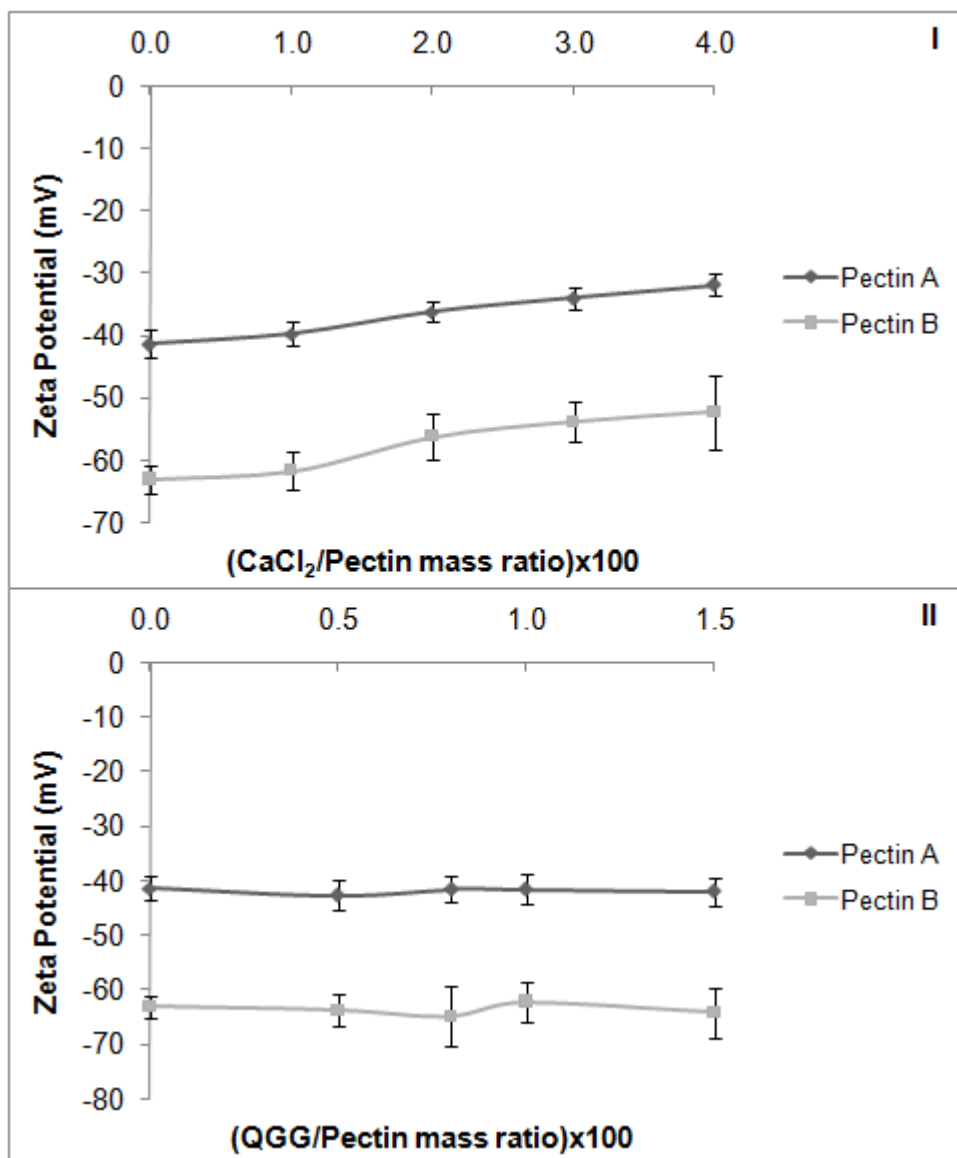


Figure 1. Zeta potential of the pectin particles crosslinked with CaCl₂·2H₂O (I) and QGG (II). The pectin concentration was 2.0 g/L. The degree of esterification of the pectins was 79.09% (A) and 56.54% (B).

3.2.2 Particle size polydispersity

Homogeneity of the particle sizes is desirable for various applications. Figure 2 shows the size polydispersity of the crosslinked particles produced from pectins A and B. According to Tukey's test ($p < 0.05$), no significant differences in polydispersity were obtained, except for the particles crosslinked with CaCl₂·2H₂O at 3.0 and 4.0 % mass ratios.

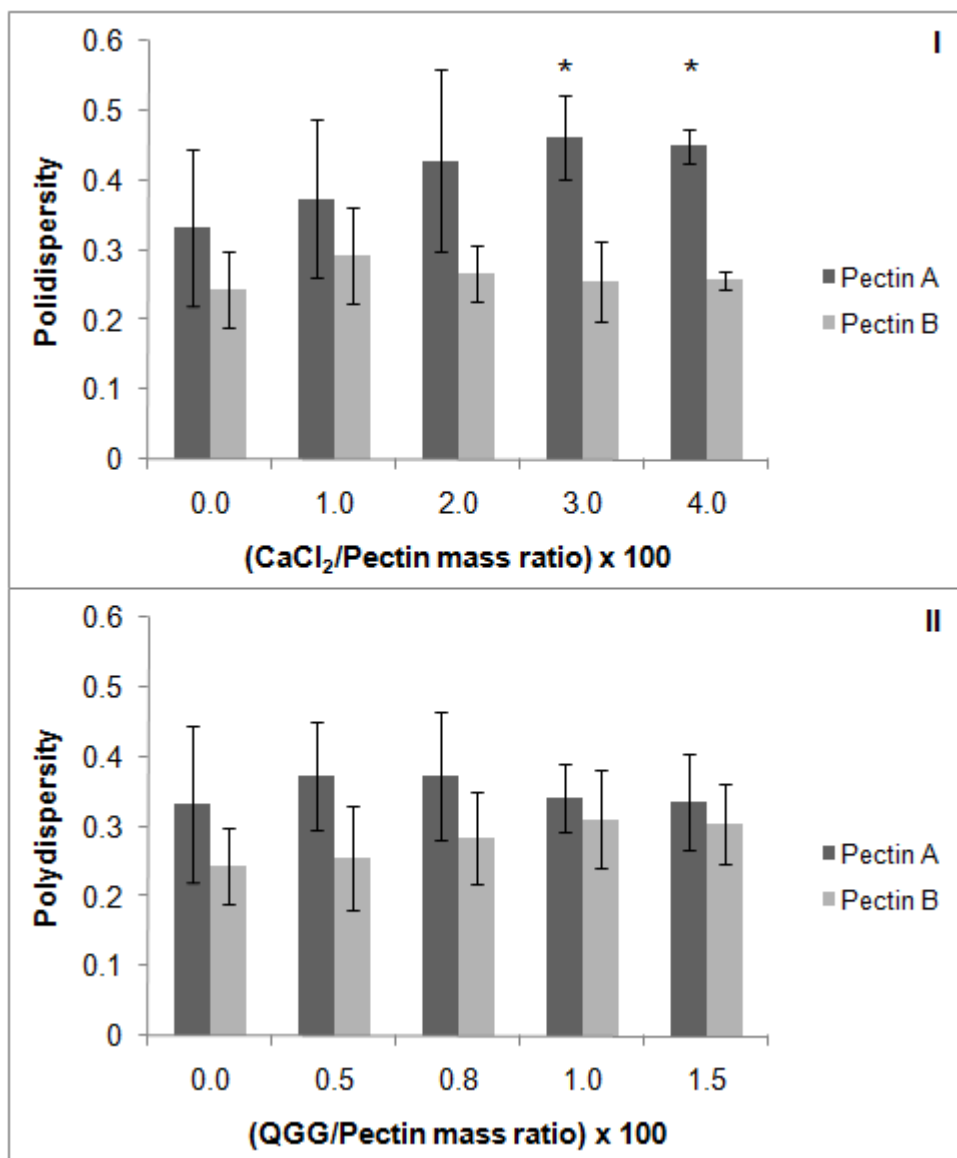


Figure 2. Size polydispersity of the particles from pectins A and B crosslinked with CaCl₂.2H₂O (I) and QGG (II). According to Tukey’s test at 5% probability ($p < 0.05$), the values are equal except for the featured with *.

3.2.3 Particle size distribution

The size distributions of the particles were determined in terms of number ($N \propto d$) and intensity of scattered light ($I \propto d^6$). At the mass ratios studied, CaCl₂.2H₂O only effectively crosslinked pectin A. For pectin B, the size distribution remained unchanged in relationship to the initial pectin in the solution. According to the N and I distributions, the particles size distributions were similar to the various mass ratios with one main population, between 100 and 1000 nm, and structures above 1000

nm. Pectins A and B were both crosslinked with QGG with similar distributions. In both cases, the mean diameter decreased as the mass ratio increased.

Figure 3 shows the size distributions of the particles at mass ratios of 4.0% and 1.0% for $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and QGG, respectively. According to the N distributions, the particles crosslinked with QGG had the smallest population for pectin A, while for pectin B, the number of particles was similar in both populations. When the particles were crosslinked with $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a similar range of sizes with most of the population between 100 and 1000 nm was observed for pectin A. Therefore, the DE of the pectins affects the crosslinking and the size distribution of the particles. Higher DE such as in pectin A is prone to crosslinking with both agents.

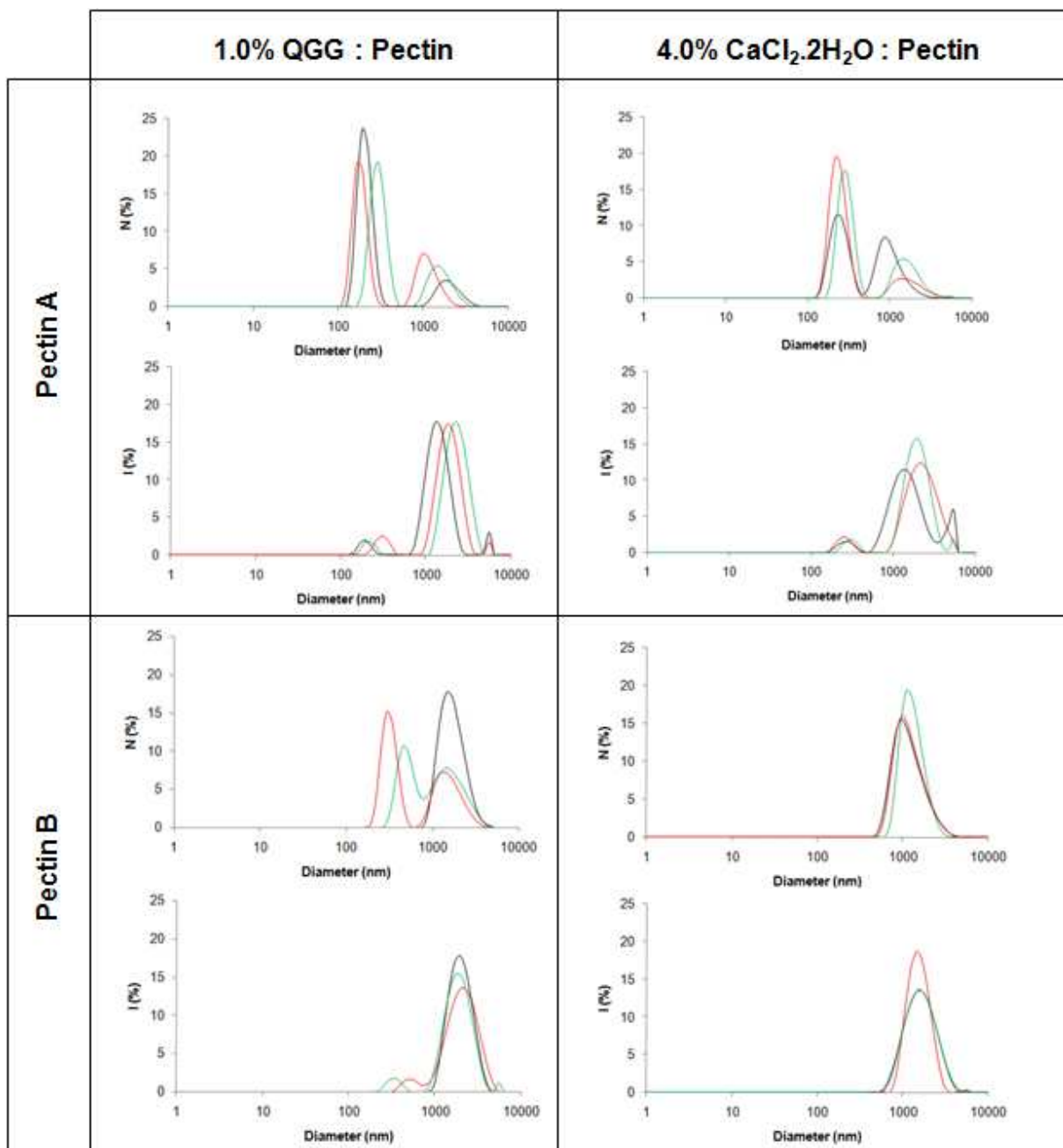


Figure 3. Size distributions for pectin A and B particles crosslinked with the mass ratios: 1.0% QGG: pectin and 4.0% CaCl₂·2H₂O: pectin. The concentration of the pectins was 2.0 g/L.

As proposed by Fan and collaborators¹⁸ for chitosan nanoparticles, there are two main driving forces that maintain the structure of polymer chains. These driving forces are electrostatic repulsion between ionized groups and attractive hydrogen bonding interactions. In addition to acting as a physical bridge between chains, the

cationic agent approaches the chains, neutralizing negative charges and minimizing repulsion. Therefore, the sum of all of the forces controls the size of the particles.

Figure 4 shows the primary interactions of the pectin sites and the crosslinking agents, which controls the formation and size distribution of the particles.

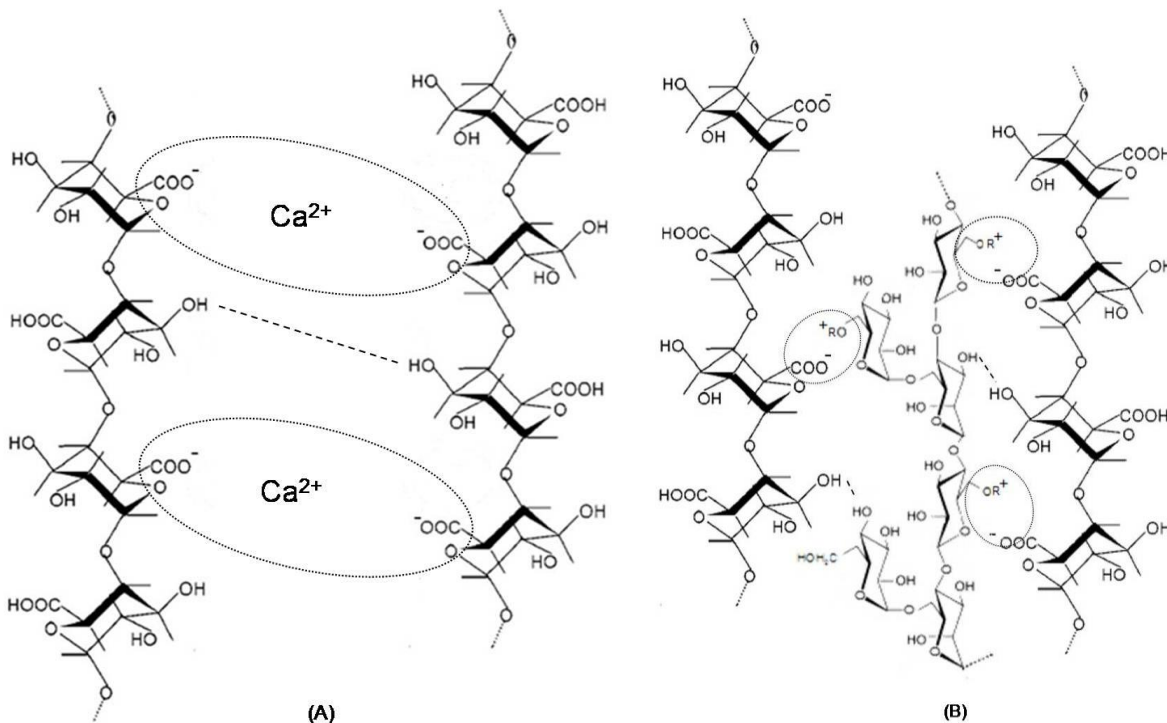


Figure 4. Schematic representation of the primary interactions between the pectin chains and the crosslinking agents, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (A) and QGG (B). The hydrogen bonds are represented by dashed lines, and the electrostatic interactions are represented by circles.

According to Figure 4, despite the divalent charge on the Ca^{2+} ions, the polymeric nature of the QGG promotes more interactions among the pectin chains, especially hydrophobic interactions with the cyclic groups of the pectins.

Although pectin B exhibits a higher availability of negative charges, which favors repulsion between pectin chains, the attraction overcomes the repulsion, and nano-sized particles are formed when QGG is used. However, divalent calcium ions were not sufficient to join the greatest number of sites available in pectin B. Therefore, the particles were considerably larger due to repulsion between sites with the same charge and interparticle connections. Therefore, the performance of the Ca^{2+} ions is better for pectins with a high DE, such as pectin A.

3.3 Influence of pectin concentration

To produce particles in the nano-sized range, the effects of pectin concentration were studied using only the QGG crosslinking agent. The influence of the pectin concentration is shown in Figure 5. Although there were slight variations, nano-sized particles were favored by a lower pectin concentration (2.0 g/L) for pectin A and by a higher concentration (10.0 g/L) for pectin B. This behavior indicates that the amount of QGG was able to crosslinking the available sites at the lowest concentration of pectin A. The highest concentration favored aggregation, which increased the diameter of the particles. In addition, the higher availability of binding sites in pectin B matched the amount of QGG, which favored the nano-sized particles due to a reduction in the interchain repulsion, resulting in the avoidance the interparticle connections.

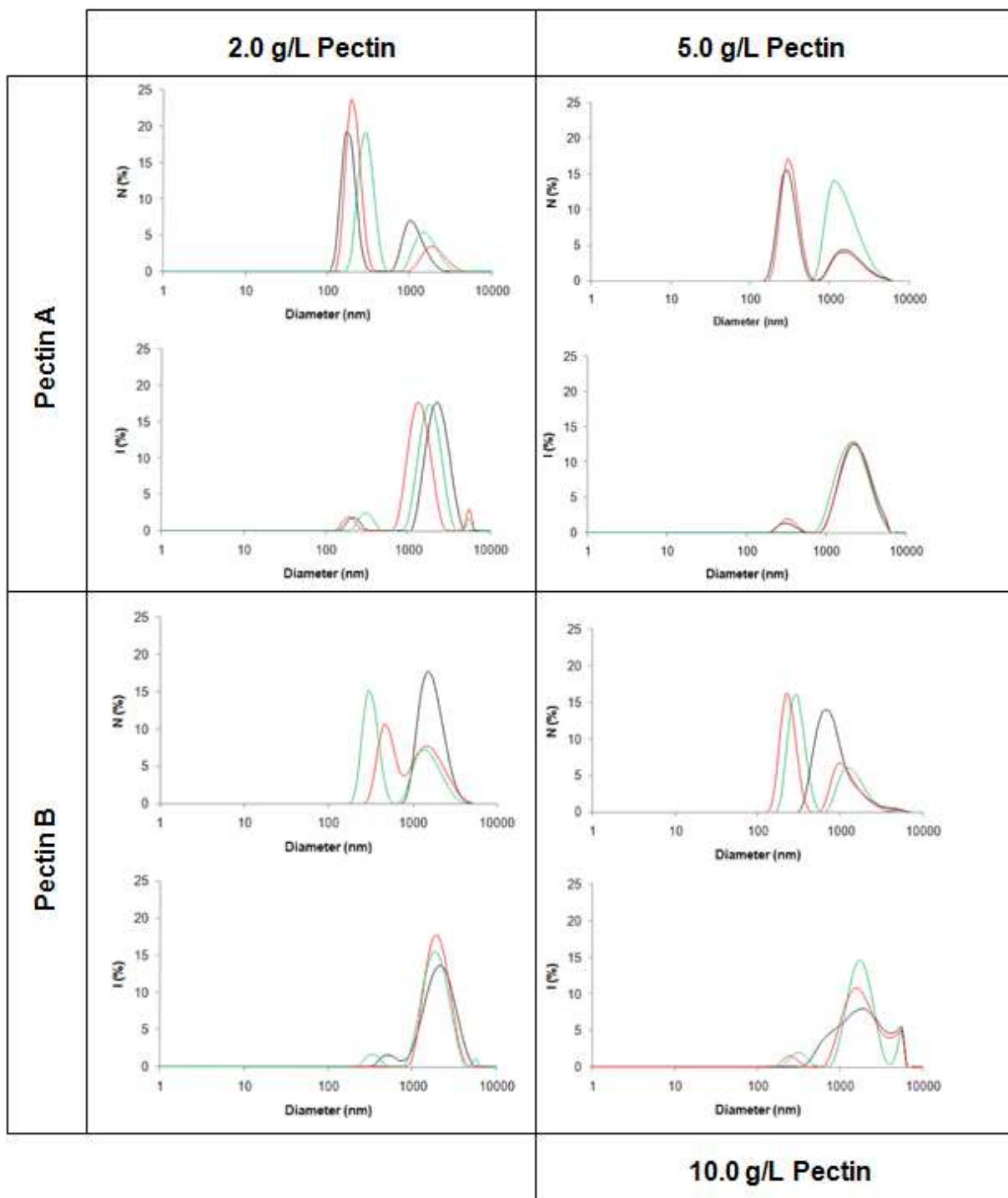


Figure 5. Influence of the pectin concentration on the size distributions. Particles crosslinked by 1.0% QGG: pectin mass ratio.

3.4 Morphology of particles

The morphology of the QGG crosslinked particles is spherical, as shown in Figure 6 for both pectins. The SEM images confirm the previous results. Clearly, the best dispersions of the nano-sized particles (lower aggregation) were obtained at 2.0 g/L for pectin A (Figure 6I) and at 10.0 g/L for pectin B (Figure 6IV).

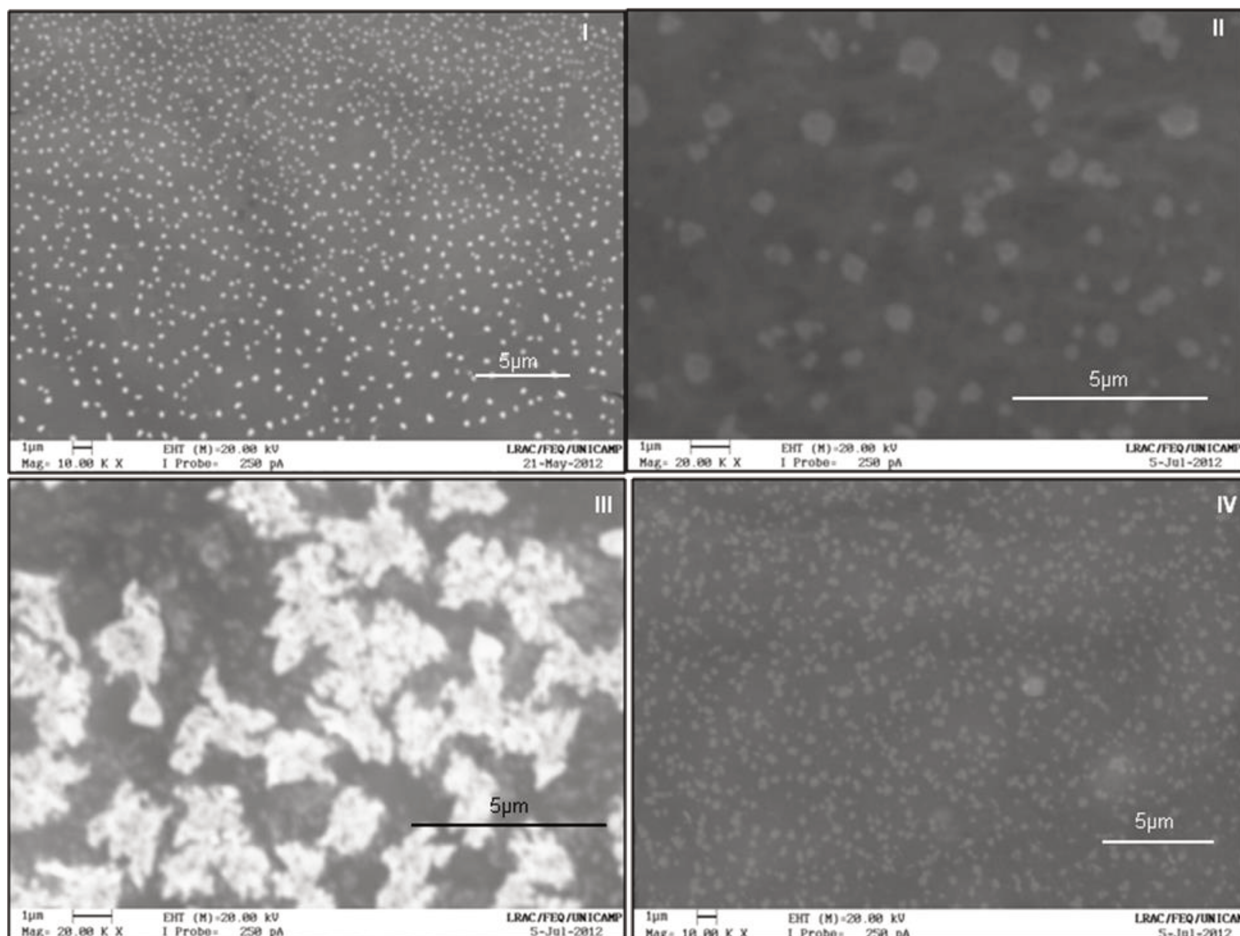


Figure 6. SEM images of the pectin particles crosslinked with 1.0% QGG: pectin mass ratio. Pectin A at 2.0 g/L (I), pectin A at 5.0 g/L (III), pectin B at 10.0 g/L (IV) and pectin particles crosslinked with 4.0% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ with a pectin mass ratio for pectin B of 2.0 g/L (II).

4. Conclusions

The production of predominantly nano-sized particles (10^2 nm order of magnitude) of citrus pectin is feasible by ionic crosslinking. The production process in one step is facile and scalable. The mean size and distribution can be controlled by the nature of the crosslinking agent, the degree of esterification and the concentration of pectin. The performance of divalent ions, such as calcium, is better

for the highest degrees of esterification (i.e., pectin A), while polymeric crosslinking agents, such as QGG, produce nano-sized particles with both degrees of esterification. The best dispersions (low aggregation) are produced with the lowest concentrations (2.0 g/L) of pectin A and with the highest concentrations (10.0 g/L) of pectin B.

Acknowledgments

The authors would like to thank Chemyunion Quimica for the financial support.

5. References

- 1. D. Mohnen, Pectin structure and biosynthesis, Current Opinion in Plant Biology, 11 (2008)**
- 2. L. Liu, J. Cao, J. Huang, Y. Cai and J. Yao, Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark, Bioresource Technology, 101 (2010)**
- 3. J. V. Diaz, G. E. Anthon and D. M. Barret, Nonenzymatic Degradation of Citrus Pectin and Pectate during Prolonged Heating: Effects of pH, Temperature, and Degree of Methyl Esterification, J. Agric. Food Chem., 55, 13 (2007)**
- 4. I. Braccini and S. Perez, Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited, Biomacromolecules, 2 (2001)**
- 5. F. Sansone, T. Mencherini, P. Picerno, M. d'Amore, R. P. Aquino, M. R. Lauro, Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts, J. Food Engineering, 105, 3 (2011)**
- 6. D. Ogonczyk, M. Siek and P. Garstecki, Microfluidic formulation of pectin microbeads for encapsulation and controlled release of nanoparticles, Biomicrofluidics, 5, (2011)**
- 7. F. Bigucci, B. Luppia, L. Monaco, T. Cerchiarab and V. Zecchi, Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin, J. Pharmacy and Pharmacology, 61 (2009)**
- 8. B.R. Thakur, R. K. Singh, A. K. Handa, M. A. Rao. Chemistry and Uses of Pectin — A Review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 37 (1997)**
- 9. C. Yu, H. Cao, X. Zhang, F. Zhou, S. Cheng, X. Zhang and R. Zhuo, Hybrid Nanospheres and Vesicles Based on Pectin as Drug Carriers, Langmuir, 25, 19 (2009)**

- 10.** O. G. Jones, D. J. McClements, Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein–polysaccharide complexes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 167 **(2011)**
- 11.** N. Arslan, Extraction of pectin from sugar-beet pulp and intrinsic viscosity-molecular weight relationship of pectin solutions, *J. Food Science and Technology*, 32, 5 **(1995)**
- 12.** A. G. Marcelino, M. R. Rossan, M. H. A. Santana, J. E. S. Silveira, M. D. V. Pereda, C. Nogueira, Nanopartículas de sericina no tratamento cosmético para o cabelo, *Cosmetics & Toiletries*, 20 **(2008)**
- 13.** L. C. Dias, Stable alkaline hair bleaching compositions and method for use thereof. U.S. Patent 6,540,791, April 01 **(2003)**
- 14.** R. Gentilini, S. Bozzini, F. Munarin, P. Petrini, L. Visai and M. C. Tanzi, Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering, *Journal of Applied Polymer Science*, n/a-n/a **(2013)**
- 15.** H. Kokkonen and J. Tuukkanen, *Biomaterials for Stem Cell Therapy - State of Art and Vision for the Future*, Edited Loredana De Bartolo and Augustinus Bader, CRC Press **(2013)**, chapter 4, pp. 87-109.
- 16.** F. Munarin, S. G. Guerreiro, M. A. Grellier, M. C. Tanzi, M. A. Barbosa, P. Petrini and P. L. Granja, Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering, *Biomacromolecules*, 12, 3 **(2011)**
- 17.** M. M. Mady and M. M. Darwish, Effect of chitosan coating on the characteristics of DPPC liposomes, *Journal of Advanced Research*, 1, 3 **(2010)**
- 18.** W. Fan, W. Yan, Z. Xu and H. Ni, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90 **(2012)**

4.2 Rheological properties of citrus pectin dispersions and its blends with polyquaternium-7 and colloidal particles

Artigo submetido ao periódico científico *Journal of Applied Polymer Science*

Rheological properties of citrus pectin dispersions and its blends with polyquaternium-7 and colloidal particles

MARTINEZ, R. M.^a, SHIMOJO A. A. M^a., SANTANA M. H. A.^{a*}

^aLaboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

*Corresponding author – Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

+ 55 19 35213921 lena@feq.unicamp.br

Abstract

This paper reports on the rheological behavior of a 5% (w/w) citrus pectin (CP) dispersion, its blends with polyquaternium-7 (PQ) and also with 200 nm nanoparticles (NP) and 1.8 μm microparticles (MP) of CP. The viscous (G'') and elastic (G') moduli of the CP dispersion were similar, whereas G' was higher than G'' for PQ. The 1:20 (w/w) blend of CP and PQ enhanced the viscoelastic profile of CP and also decreased its cross-over frequency. NP and MP were equally effective in enhancing the viscoelastic properties of CP. The best viscoelastic behavior was obtained with 1:20:0.4 (w/w) CP:PQ:(NP or MP) composition. The association of CP with PQ and/or MP or NP tended to change the behavior of CP and PQ dispersions from pseudoplastic to Newtonian. Cox-Merz superposition was observed for CP:PQ and CP:(MP or NP). These findings contribute for modulation of the rheological properties of CP dispersions for specific applications.

Key-words: citrus pectin, polyquaternium-7, colloidal-particles, rheology

1. Introduction

Pectin is an anionic heteropolysaccharide that is formed by residues of D-galacturonic acid linked by α -[1,4] glycosidic linkages in the backbone. The side chains are linked by α -[1,2] linkages with neutral sugars, such as rhamnose¹. The number of carboxyl groups methyl-esterified in the backbone determines the degree of esterification (DE) of pectins; a DE over 50% characterizes highly esterified pectins and values below 50% describe low esterified pectins. The DE can be modified by chemical or enzymatic reactions². For pectins, the biopolymer conformation plays an important role in the rheological behavior and is affected by intra- and intermolecular interactions among the polysaccharide chains. The DE, pH, ionic strength, temperature and co-solutes are the main factors used to modulate this behavior into the desired rheological properties³. Pectins are among the most versatile commercially available stabilizers. The gelling, thickening and stabilizing attributes make pectin an essential additive in the production of many food products. In the pharmaceutical industry, pectin is used to reduce blood cholesterol levels and treat gastrointestinal disorders. Other applications of pectin include use in edible films, as a paper substitute, and in foams and plasticizers, for which viscoelastic properties are important technologically.

Polyquaterniums are polycationic polymers that are widely used in cosmetic products, particularly products for hair care, such as conditioners, shampoo, hair mousse, hair spray and hair dye. Some polyquaterniums have antimicrobial properties and are used in contact lens solutions. Different polyquaterniums are distinguished by a numerical value, which is not associated with their chemical structure but with the order they were registered. Polyquaternium-7 (PQ), which was used in this work, is a copolymer of acrylamide and diallyldimethylammonium chloride. Figure 1 shows the molecular structures of an esterified pectin and polyquaternium-7.

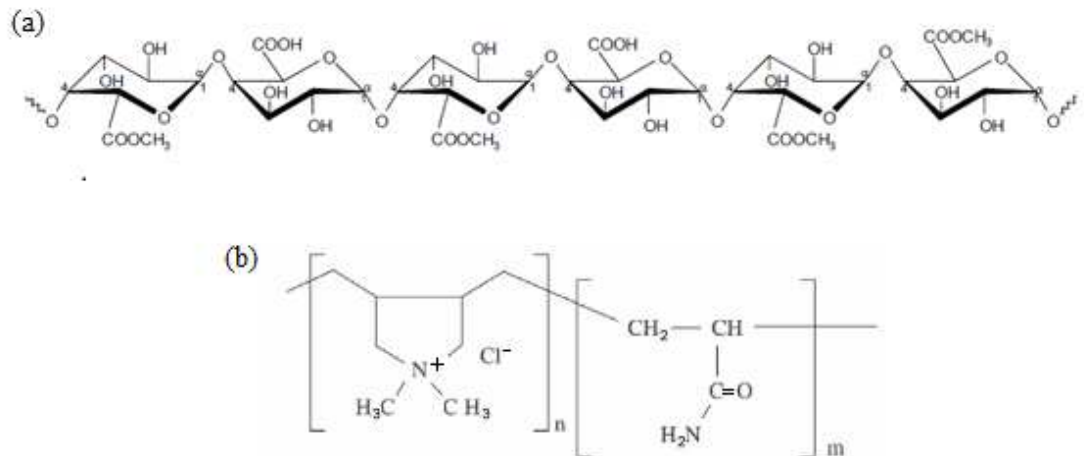


Figure 1. Molecular structures of an esterified pectin (a) and polyquaternium-7 (b).

Complexes of polyelectrolytes exhibit a broad spectrum of properties that are governed by the characteristics of the individual components (e.g., properties and positions of ionic sites, charge density, and rigidity of macromolecular chains) and the chemical environment (e.g., solvent, ionic strength, pH, and temperature)^{4,5}. In addition to foods, these properties have generated various other applications, mainly in the cosmetic and pharmaceutical fields, such as for the development of rheologically smart fluids as well as for carriers for the release of pharmacologically active compounds^{6,7}. Polyelectrolyte complexes have considerable potential for many practical applications, such as thickener additives, to form membranes with selective retention ability or as a model to study complex living systems in which biomacromolecules are ionically associated^{4,5}.

The functional properties of biopolymers depend on the presence of ordered structures capable of stably associating into long-range networks or packed aggregates, which determine their rheological behavior⁸. These interactions can be monitored by oscillatory measurements of solid-like and liquid-like responses, which characterize the storage (or viscoelastic) and the loss (or viscous) moduli, G' and G'' , respectively, in addition to the dynamic (η^*) and steady-shear viscosity (η).

Viscoelastic behavior has previously been reported for pectin solutions and is influenced by the temperature and co-solutes. Generally, a decrease in the viscosity is observed when the temperature is increased due to pectin degradation^{9,10,11,12}. Co-solutes, usually sucrose, may be used to promote an increase in the viscosity of a pectin solution. The polysaccharides entangled with pectin chains strengthen the gel

network, increasing the viscosity of the system¹³. Dilute pectin solutions exhibit Newtonian behavior with minimal rearrangement of the polymer chains. The transition to pseudoplastic (shear-thinning behavior) is observed under high shear rates when the polymer chains do not undergo considerable rearrangement. Pectin branching plays an important role in the viscoelastic behavior; at a zero-shear rate, the solution shows a higher shear rate dependence on viscosity and a higher storage modulus (G'). Therefore, associating compounds that bind with pectin forming networks intensifies the viscoelastic character^{13,14}.

Although the rheological behavior of polyquaterniums has been studied, the combination of polyquaterniums with natural polymers is scarce and specific. Previous studies with acacia gum have shown that the polymer enhanced the viscoelastic properties by forming polyelectrolyte complexes¹⁵. To the best of our knowledge, there are no studies reported in the literature on the rheological properties of the polyelectrolyte complex of CP and PQ or on the inclusion of colloidal particles to the dispersions of those complexes.

This study aims to show the rheological behavior of CP dispersions its blends with PQ and the inclusion of nano or microparticles of citrus pectin. Oscillatory measurements were used for the characterization of the rheological behavior of the CP systems. The rheological properties are important because reflect the microstructure of the system. Initially, the isolated dispersions of CP (5% w/w) and PQ (10% w/w), as well as the blend CP: PQ, were characterized. Afterwards, the effects of the inclusion of nano or microparticles of CP to fluid CP, PQ or to CP-PQ were also characterized and compared. The results could provide a deeper insight into the potential of CP, its polyelectrolyte complexes, and the association of nano and microparticles to CP dispersions or their complexes for specific applications.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pectin extracted from citrus peel fruits (DE= 56 %, MW = 54.229 g/mol) was purchased from CPKelco (Limeira, SP, Brazil). Polyquaternium-7 (Mirapol 550 P®) and quaternized guar gum (Jaguar C13®) were obtained from Rhodia (Campinas, SP, Brazil). All other reagents were purchased from Merck unless otherwise specified.

2.2. Preparation of pectin particles

Initially, CP and quaternized guar gum (QGG) were separately dispersed in ultrapure water under mechanical stirring for 6 h. The pH of the dispersions was adjusted to 7.0 with 0.5 M NaOH to guarantee that all carboxyl groups of the pectin

were ionized and available for ionic interactions. Pectin was used in two concentrations: 10.0 g/L and 20.0 g/L. The particles were produced through polyelectrolyte complexation by ionic crosslinking, for which QGG was gradually added to the solutions of pectin at 15 min intervals under mechanical stirring (Rushton turbine at 300 rpm). QGG was 1.0 % (w/w) in relation to pectin.

2.3. Physico-chemical characterization of pectin particles

The pectin particles were characterized by their hydrodynamic mean diameter, polydispersity and zeta potential, which were measured using a Nano Series ZS Zetasizer (Malvern Instruments, UK) at a fixed angle of 173° and a temperature of 25°C. The measurements were performed in mili-Q water.

2.4. Rheological characterization

The rheological measurements were performed using a RheoStress 1 Haake Rheometer (Haake Inc., Germany). Table 1 shows the analyzed pectin systems. The measurements were performed in the steady and oscillatory regimes at 25°C ± 0.1°C using a parallel plate geometry of 20 mm. The oscillatory measurements were performed in the linear region at a stress of 1.188 Pa and in the frequency range of 0.1-100 Hz. The steady shear measurements were obtained at shear rates of 0.1-50 s⁻¹. The citrus pectin systems used for rheological characterization are shown in table 1.

Table 1. Citrus pectin systems used for rheological characterization.

System*	Composition
CP	Fluid Pectin 5% w/w
PQ	Fluid Polyquaternium-7 (10% w/w)
CP:PQ	1:20 (w/w) fluid pectin:polyquaternium complexes
CP:NP	5:1 (w/w) fluid pectin:nanoparticles
CP:MP	5:2 (w/w) fluid pectin:microparticles
PQ:MP	50:1 (w/w) fluid polyquaternium-7:pectin microparticles
CP:PQ:NP	1:20:0.4 (w/w) fluid pectin:polyquaternium-7:pectin nanoparticles
CP: PQ:MP (A)	1:20:0.4 (w/w) fluid pectin:polyquaternium-7:pectin microparticles
CP:PQ:MP (B)	1:50:3.6 (w/w) fluid pectin:polyquaternium-7:pectin microparticles

* CP - Citrus Pectin; PQ- Polyquaternium-7; MP - Pectin microparticles
NP - Pectin nanoparticles

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical properties of the particles

The CP particles were characterized by their mean hydrodynamic diameter, polydispersity and zeta potential. Table 2 shows the results for NP and MP. Although the polydispersity of NP was approximately twice that of MP, both were less than 0.5. The produced particles were electrostatically stable (high absolute zeta potential value) with a negative zeta potential for interaction with the medium.

Table 2. Cumulative mean hydrodynamic diameter (Z-average), polydispersity (PI) and zeta potential (ZP) of the nano and microparticles of citrus pectin.

Particle	Pectin Concentration (g/L)	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)
Nanoparticles (NP)	10.0	216.5 (\pm 69.43)	0.365 (\pm 0.05)	-59.0 (\pm 0.95)
Microparticles (MP)	20.0	1833 (\pm 90.74)	0.203 (\pm 0.02)	-56.7 (\pm 2.05)

4. Rheological characterization

The viscous and viscoelastic responses of the systems, which were quantified by dynamic oscillatory measurements, represent the storage (G') and loss (G'') moduli as functions of the frequency. The moduli are defined in terms of the amplitude ratio and phase shift relative to the strain, as defined by Eq. 1 and 2¹⁶.

$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cos (\delta) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$G'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \sin (\delta) \quad (\text{Eq. 2})$$

where (σ_0 / γ_0) is the amplitude ratio, δ is the phase shift, σ_0 is the amplitude of the shear stress, and γ_0 is the amplitude of the strain equal to L/h . When the motion of the upper (oscillating) plate is $L \sin (\omega t)$, ω is the frequency expressed in $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$, which is equivalent to $\omega/(2\pi)$ Hz, and h is the distance between the plates.

In this work, both the G' and G'' moduli increased with frequency. Because the storage modulus usually represents the elastic character and the loss modulus describes the viscous behavior, this result suggests that enhancement in the structural entanglement increases the G' modulus, whereas structural breakdown increases the G'' modulus.

Figure 2 shows the dynamic characterization of the systems as controls: CP, PQ and CP:PQ. The curves are straight lines, characteristic of diluted dispersions. For both the CP and PQ systems and their complexes, the G' and G'' moduli were similar at low frequencies, with G'' slightly higher than G' . In all cases, there is a

tendency for cross-over at the approximate frequencies ($\log \omega_0$) 3.89 rad.s^{-1} (CP), 1.54 rad.s^{-1} (PQ) and 2.00 rad.s^{-1} (CP:PQ).

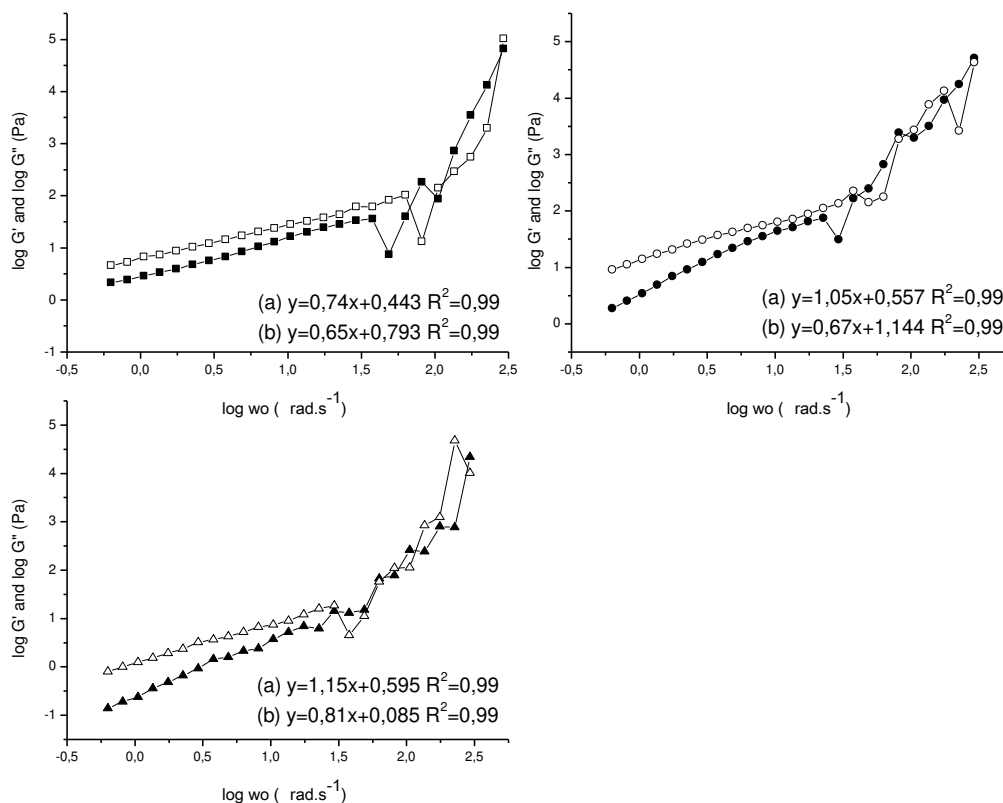


Figure 2. Storage G' (closed symbol) and loss G'' (open symbol) shear moduli of hydrogels at 25°C as a function of the angular frequency: (\blacktriangle) and (\triangle) CP + PQ; (\bullet) and (\circ) PQ; (\blacksquare) and (\square) CP. The model fits and their equations are shown: (a) G' and (b) G'' .

The influences of NP and MP on the dynamic behavior of the CP dispersion are comparatively shown in Figure 3. The viscous response G'' dominates G' at low frequencies, but at high frequencies, G' approaches G'' as a result of the progressive storage of energy by the contortion of the chains into strained conformations.

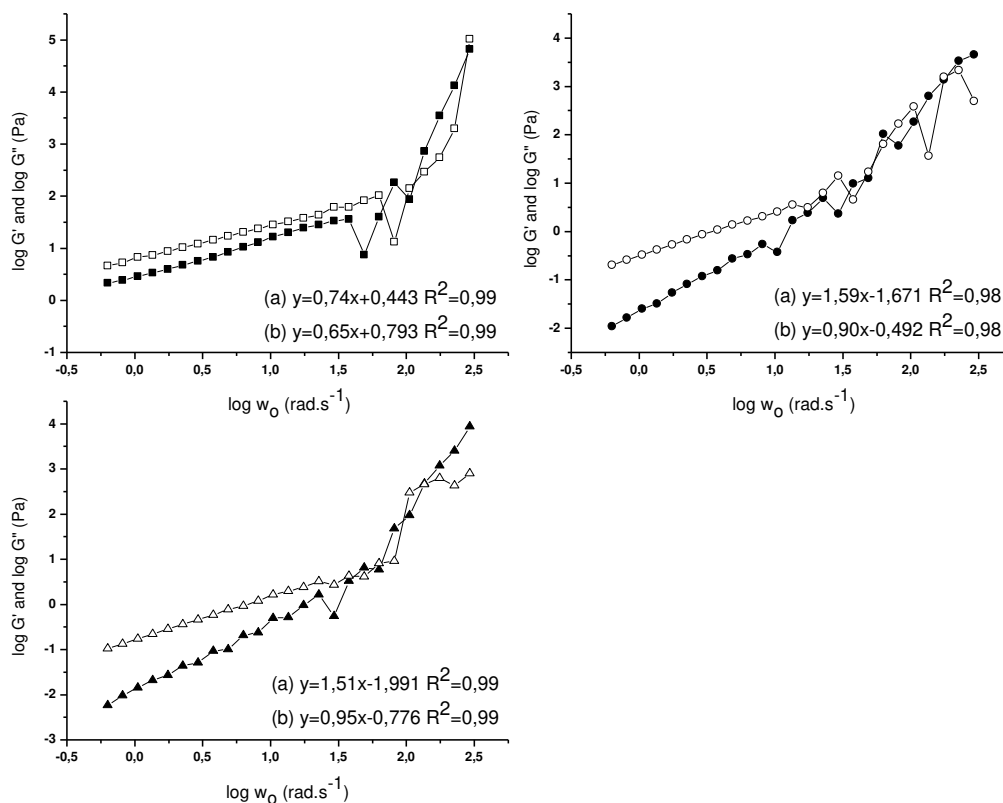


Figure 3. Storage G' (closed symbol) and loss G'' (open symbol) shear moduli of hydrogels at 25°C as a function of the angular frequency: (\blacktriangle) and (\triangle) CP + MP; (\bullet) and (\circ) CP + NP; (\blacksquare) and (\square) CP. The model fits and their equations are shown: (a) G' and (b) G'' .

The addition of nano or microparticles enhanced the viscoelastic behavior of CP, increasing G' from 0.74 Pa (CP) to 1.51 Pa (CP+NP) and 1.59 Pa (CP+MP) when twice the amount of microparticles was added. In contrast, the cross-over frequency ($\log \omega_0$) was lower for the CP+MP system (1.71 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) than for CP+NP (2.03 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) or CP (3.89 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$). The negative zeta potential measured for the nanoparticles may cause rearrangements in the CP chains due to repulsion, and the particles may fill spaces among the chains, compressing the polymer. This behavior has been observed for other polymers, such as hyaluronic acid, in which NP and MP were efficient at increasing the viscoelasticity of the fluid polymer¹⁷.

Figure 4 shows the dynamic behavior of PQ and the effect of its associations with MP, as well as for the systems CP:PQ:(MP or NP). The profiles were similar to CP, with G'' higher than G' at low frequencies.

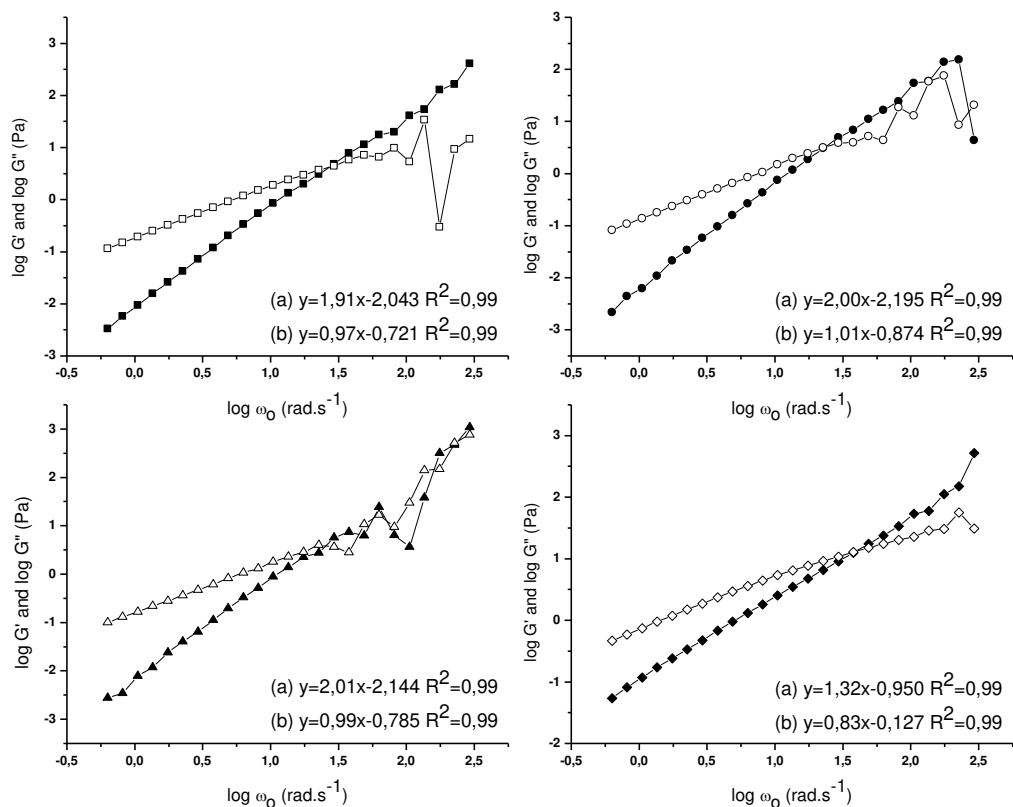


Figure 4. Storage G' (closed symbol) and loss G'' (open symbol) shear moduli of hydrogels at 25°C as a function of the angular frequency: (■) and (□) PQ + MP; (●) and (○) CP + PQ + NP; (▲) and (Δ) CP + PQ + MP (A); (◆) and (◇) CP + PQ + MP (B). The model fits and their equations are shown: (a) G' and (b) G'' .

Table 3 summarizes the values of the G' and G'' moduli, as well as the cross-over frequencies, in terms of $\log \omega_0$, for the studied systems. MP increased G' (1.91 Pa) compared to pure PQ (1.05 Pa) and slightly decreased the cross-over frequency (1.54 to 1.41 Pa) compared with the reduction of the cross-over to CP:MP (1.71 Pa) and CP (3.89 Pa). The proportion of CP:PQ also influenced the parameters, as shown for CP:PQ:MP (A) and (B).

Table 3. G' and G'' slopes and intercepts determining the cross-over frequency (ω_0) from pectin samples and its derivatives.

System	Composition w/w	G' (Pa)		G'' (Pa)		Intercept log ω_0
		Slope	R ²	Slope	R ²	
CP	5%	0.74	0.99	0.65	0.99	3.89
PQ	10%	1.05	0.99	0.67	0.99	1.54
CP:PQ	1:20	1.15	0.99	0.81	0.99	2.00
CP:NP	5:1	1.51	0.99	0.95	0.99	2.03
CP:MP	5:2	1.59	0.98	0.90	0.98	1.71
PQ:MP	50:1	1.91	0.99	0.97	0.99	1.41
CP:PQ:NP	1:20:0.4	2.00	0.99	1.01	0.99	1.33
CP:PQ:MP(A)	1:20:0.4	2.01	0.99	0.99	0.99	1.33
CP:PQ:MP(B)	1:50:3.6	1.32	0.99	0.83	0.99	1.68

The increase in the G' in mixtures of CP with PQ and/or NP/MP indicates greater structural entanglement tending to gel-like behavior. The pectin gels exhibit junction zones stabilized by hydrogen bonds and hydrophobic interactions between chains¹⁸. In pectin dispersions systems where the hydrogen bonds outweigh the hydrophobic interactions the behavior tend to be pseudoplastic¹⁹.

The overall resistance of the sample to the applied deformation may be characterized by the unresolved complex modulus, G* (Eq. 3).

$$G^* = (G'^2 + G''^2)^{1/2} \quad (\text{Eq. 3})$$

The frequency of oscillation ω (rad.s⁻¹) can be considered as the oscillatory analogue of the shear rate and the complex dynamic viscosity η^* (Pa.s), which describes the total resistance to dynamic shear and is defined as:

$$\eta^* = G^* / \omega = (G'^2 + G''^2)^{1/2} / \omega \quad (\text{Eq. 4})$$

For dilute solutions, η^* is virtually independent of the frequency, analogous to the behavior of Newtonian liquids under steady shear, where the viscosity remains independent of the shear rate.

Figure 5 shows the behavior of the shear viscosity, η , and the complex viscosity, η^* , as functions of $\dot{\gamma}$ and ω , respectively. The curves show pseudoplastic behavior for CP with a strong tendency toward Newtonian behavior for the complex CP:PQ. The complex also lowered the viscosities compared to the pure polyelectrolytes.

The superimpositions of η and η^* at equal frequencies (ω) and shear rates (γ), known as the Cox-Merz rule and defined by $\eta^*(\omega) = \eta(\gamma = \omega)$, is applicable to fluids with a homogeneous structure, such as random-coil polysaccharide solutions. Good superposition of $\eta(\gamma)$ and $\eta^*(\omega)$ was observed for the pure polyelectrolytes and their complexes. The addition of the particles to CP further lowered both viscosities and increased the tendency for Newtonian behavior, as shown in Figures 5 (a) and (b).

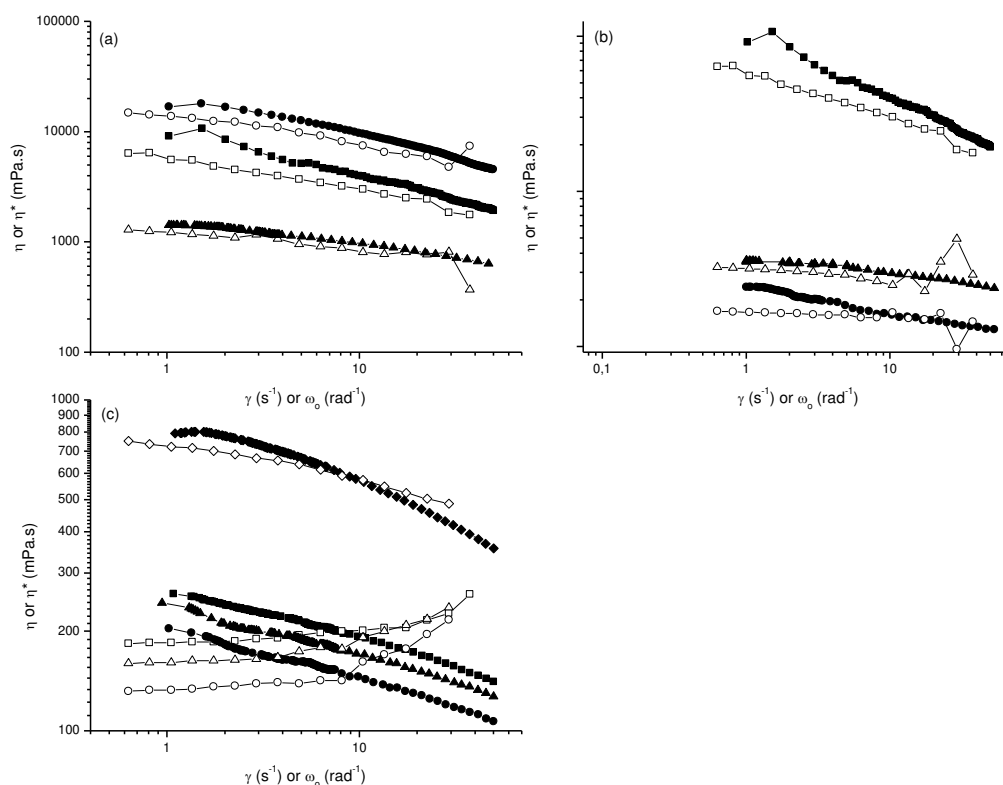


Figure 5. Cox-Merz plot of pectin and its derivatives at 25°C. Closed symbol (η) and open symbol (η^*). (a): (\blacktriangle) and (\triangle) CP + PQ; (\bullet) and (\circ) PQ; (\blacksquare) and (\square) CP. (b): (\blacksquare) and (\square) CP; (\blacktriangle) and (\triangle) CP + MP; (\bullet) and (\circ) CP + NP (c): (\blacksquare) and (\square) PQ + MP; (\bullet) and (\circ) CP + PQ + NP; (\blacktriangle) and (\triangle) CP + PQ + MP (A); (\blacklozenge) and (\blacklozenge) CP + PQ + MP (B).

However, the systems PQ:MP and CP:PQ:(MP or NP) (A) (Figure 5c) showed a strong deviation between the viscosities: at low frequencies, the shear-viscosity had a pseudoplastic shear-thinning behavior, whereas the complex viscosity had a Newtonian behavior. At high frequencies, the complex viscosity increases with the frequency because of the high G' values, as in Eq. 4. This is uncommon behavior

because, in most cases of deviations, the complex viscosity is higher than the shear viscosity, which is caused by hyperentanglement or by the presence of aggregates. The proportion of the components also had an important role in the rheological behavior, such as for the system CP:PQ:MP (B), which showed pseudoplastic shear-thinning behavior for both viscosities compared to the uncommon behavior described for CP:PQ:MP (A).

Therefore, in the case of the PQ systems, the presence of the particles led to different behavior compared to CP due to the interactions among the particles with the opposite charge of PQ, which must be further investigated. The behavior was also dependent on the proportion of CP:PQ:MP.

Table 4 shows that the Ostwald de Waele power law ($\eta = k \gamma^{n-1}$) parameters confirm the tendency for changing the behavior from pseudoplastic to Newtonian for the various systems containing particles.

Table 4. K and n values in the pseudoplastic domain of η versus γ determined from the flow curves of pectin and its blends with polyquaternium -7 and the nano and microparticles.

Samples*	K	n
PQ	23988	0.59
CP + PQ	1531	0.79
CP	10914	0.56
CP + MP	373	0.90
CP + MP + NP	312	0.89
CP + MP + NP	245	0.83
PQ + MP	271	0.85
CP + PQ + NP	205	0.85
CP + PQ + MP (A)	239	0.85
CP + PQ + MP (B)	914	0.79

*The compositions of the systems are presented in Table 1.

For the polymers dispersions, the more pronounced pseudoplastic behavior reflects the low residual stress due to high hydration. However, the inclusion of MP and/or NP tend to disrupt the water solvation for the formation of new electrostatic interactions, hydrophobic and hydrogen bonds, so that the systems tend to the Newtonian behavior.

5. Conclusions

The rheological properties of CP dispersions may be modulated by the blending with PQ and also with MP or NP with negative zeta potential. In both cases, the particles increased the viscoelasticity of the systems and reduced the cross-over frequency. The particles also reduced the shear-viscosity and the complex viscosity and changed the systems to Newtonian behavior. The CP systems followed the Cox-Merz rule, but strong deviations were observed for the PQ systems, even when including CP, which was also dependent on the proportion of CP:PQ:MP. Therefore, the blending of CP dispersions with PQ and with the colloidal particles modulates its rheological properties and opens opportunities for applications when higher viscoelasticities are required.

Acknowledgments

The authors would like to thank Chemyunion Quimica for the financial support and Professor Edvaldo Sabadini of the Chemical Institute of the University of Campinas for the use of the rheometer.

6. References

1. Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y. and Yao, Y. *Bioresource Technology*. **2010**, 101, 3268-3273.
2. Diaz, J. V., Anthon, G. E. and Barret, D. M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 13, 5131-5136.
3. Stephen, A. M.; Phillips, G. O.; Williams, P. A. *Food Polysaccharides and their applications*; CRC Press Taylor & Francis Group, 2006; Chapter 11 , pp 353-411, 2ed.
4. Racapé, E., Thibault, J. F., Reitsma, J. C. E. and Pilnik, W. *Biopolymers*. **1989**, 28, 8, 1435-1448.
5. Ralet, M. C., Dronnet, V., Buchholt, H. C. and Thibault, J.F. *Carbohydrate Research*. **2001**, 336, 2, 117-125.
6. Thibault, J. F. and Rinaudo, M. *Biopolymers*. **1985**, 24, 11, 2131-2143.
7. Ralet, M.C., Crépeau, M.J., Buchholt, H. C. and Thibault, J.F. *Biochemical Engineering Journal*. **2003**, 16, 2, 191-201.
8. May, C. D. *Carbohydrate Polymers*. **1990**, DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.031.
9. Bosio, V. E., Machain, V., López, A. G., De Berti, I. O., Marchetti, S. G., Mechetti, M. and Castro, GR. *Applied Biochemistry Biotechnol.* **2012**, DOI: 10.1007/s1201001296418.
10. Brandão, E. M. and Andrade, C. T. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. **1999**, 9, 3, 38-44.
11. Kasapis, S., Al-Alawi, A., Guizani, N., Khan, A.J. and Mitchell, J.R. *Carbohydrate Research*. **2000**, 329, 399-407.

12. Erçelebi, E. A. and Ibanoglu, E. *Journal of Food Science*. **2009**, DOI: 10.1111/j.17503841.
13. Masmoudi, M., Besbes, S., Ben Thabet, I., Blecker, C. and Attia, H. *Food Science Technology International*. **2010**, DOI: 10.1177/1082013209353093.
14. Gharst, G., Clare, D. A., Davis, J. P. and Sanders, T. H. *Journal of Food Science*. **2007**, DOI: 10.1111/j.17503841.
15. Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C., Lefebvre, J. *Food Hydrocolloids*. **2002**, 16, 257-267.
16. Steffe, J. F. *Rheological methods in food engineering*; Freeman Press: Michigan, **1996**; pp. 1-9.1
17. Shimojo, A. A. M., Pires, A. M. B., de la Torre, L. G. and Santana, M. H. A. *Journal of Applied Polymer Science*. **2012**, DOI: 10.1002/APP.38389.
18. Axelos, M. A. V., Thibault, J. F. In *The Chemistry and Technology of Pectin*; Academic Press: New York, **1991**; p. 109.
19. Sato, A. C. K., Oliveira, P. R., Cunha, R. L. *Food Biophysics*. **2008**, 3, 1, 100-109.

4.3 Potential of vegetable peptones for production of colloidal particles by ionic crosslinking

Artigo submetido ao periódico científico *International Journal of Peptides*

Potential of vegetable peptones for production of colloidal particles by ionic crosslinking

MARTINEZ, R. M.^a, SANTANA M. H. A.^{a*}

^aLaboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

*Corresponding author – Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

+ 55 19 35213921 lena@feq.unicamp.br

Abstract

The aim of this study was to analyze the potential of using vegetable peptones to produce nanoparticles via ionic crosslinking in a batch process under mechanical stirring. Wheat and soy peptones were studied, with calcium chloride and quaternized guar gum used as crosslinkers. The nanoparticles were characterized by their average hydrodynamic radius and zeta potential. The results indicate that the crosslinking efficiency of guar gum was better than that of calcium chloride because a considerably smaller crosslinker/peptone ratio was required for both peptones. The mean diameter of the nanoparticles crosslinked with guar gum was approximately 100nm. However, the guar gum/peptone ratio must be optimized to minimize the partially and non-crosslinked fractions of the peptones, to reduce the polydispersity and to obtain more electrostatically stable nanoparticles. This production process is advantageous because it is a bottom-up approach, scalable and easily controlled. These results provide opportunities to use vegetable peptones as natural peptides for the production of nanoparticles with potential applications in biomedicine and cosmetics.

Keywords: peptones, crosslinking, colloidal particles

1. Introduction

Peptones are pure polypeptides or polypeptides blended with proteins. They are obtained through the enzymatic hydrolysis of animal, microbial or vegetable protein sources in an acidic medium. Pepsin randomly cleaves the peptide bonds into small fragments, producing segments of various sizes and amino acid compositions, which remain together with whole proteins in commercial peptones that have not undergone hydrolysis.

Vegetable peptones are widely used in microbiology as nutritional sources of nitrogen compounds. The most common sources for the extraction of peptones are potato, wheat, pea, pear and soy. Studies have confirmed an increase in the growth of bacteria and in the production of components of interest when using vegetable peptones as a nutritional source compared to other culture media [1, 2]. Recently, Benedini and Santana [3] demonstrated that the use of peptones from soybeans increased the production and purity of hyaluronic acid, produced by fermentation, after precipitation.

Hydrolyzed proteins used in the food and cosmetics industries are usually derived from plants such as soy, wheat and potato. Their use in cosmetics is usually patented by large companies, primarily for skin and hair applications.

Gamez-Garcia [4] demonstrated that applying hydrolyzed wheat protein to hair promoted an increase in the mechanical tensile strength of hair fibers while still wet or during the drying process. That effect was attributed to the ability of wheat proteins to prevent water loss and to act as a moisturizing agent. Later, Chahal and colleagues [5] developed a dynamic vapor sorption methodology, which was also an efficient proof of the ability of hydrolyzed wheat protein to maintain the humidity of hairs. Swift and co-workers [6] observed an extensive penetration of peptides into hair fibers, especially in the region of the cortex and inner hair cuticle distributed between the fiber matrix and throughout the extent of cellular limits.

Other applications of hydrolyzed proteins as carriers of bioactive compounds in nano- and microparticles include the encapsulation of calcium carbonate in soybean hydrolyzed proteins to reduce its crystallization in drinks [7], the controlled release of drugs using hydrolyzed collagen structured in 40 to 50 μm microparticles obtained by spray drying [8] and the encapsulation of fish oil in hydrolyzed casein, aiming for its solubilization in water and delaying its oxidation [9]. Jong and collaborators [10] obtained nanometric aggregates (approx. 150 nm) through the alkaline hydrolysis of soy protein. The nanoparticles blended with styrene butadiene conferred greater elasticity to latex.

Natural peptides possess highly specific biological activities, which are dependent on their primary sequence and conformational structure. They play important roles as agonists, antagonists, and modulators, among others. Various publications have illustrated the therapeutic and diagnostic potential of natural peptides [11].

Structuring free peptides into micro- and nanoparticles is important for their functionality because it provides a greater surface area for interactions with cells and tissues, in addition to the gradual release of encapsulated compounds. Studies on the production of peptide nanoparticles are still scarce in the literature. Furthermore, to the best of our knowledge, this is the first report on the production and characterization of nanoparticles obtained from commercial vegetable peptones through ionic crosslinking. In this work, wheat and soy peptones were investigated for the production of nanoparticles. According to the composition (Table 1), aspartate and glutamate are the main amino acids with negative charges for crosslinking with calcium chloride or quaternized guar gum. The potential for using vegetable peptones in the production of nanoparticles in a single step process was analyzed in terms of the crosslinker/peptone ratio, mean size and zeta potential.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The commercial vegetable peptones from soybean and wheat were donated as a gift by Organotechnie-France. Table 1 shows a comparatively complete list of the total and free amino acids in these peptones. The crosslinking agents guar gum (QGG) (Jaguar C13S®) and calcium chloride were purchased from Rhodia-Brazil and ECIBRA-Brazil, respectively. Ultrapure water was used throughout the experimental studies.

Table 1- Aminoacid composition of the soy and wheat peptones

Peptone	Soy (g.100g ⁻¹)		Wheat (g.100g ⁻¹)	
	<i>Total</i>	<i>Free</i>	<i>Total</i>	<i>Free</i>
Alanine	2.6	0.7	2.1	0.4
Arginine	3.8	1.5	3.1	0.7
Aspartic acid	5.8	0.3	2.9	0.1
Cystine	1.1	0.1	2.0	0.1
Glutamic acid	11.0	2.1	29.0	0.3
Glycine	2.4	0.5	3.1	0.7
Histidine	1.3	0.3	2.1	0.4
Isoleucine	2.6	0.4	2.2	0.2
Leucine	3.8	1.3	4.7	1.5
Lysine	3.8	0.9	1.7	0.3
Methionine	0.5	0.2	1.4	0.3
Phenylalanine	2.3	0.7	3.4	0.5
Proline	2.6	0.1	9.2	0.0
Serine	2.7	0.8	4.3	0.7
Threonine	2.2	0.4	2.2	0.3
Tryptophan	0.4	0.2	0.4	0.1
Tyrosine	1.7	0.4	1.8	0.5
Valine	2.5	0.6	2.9	0.2

2.2 Characterization of peptone dispersions in different pH values

Peptone dispersions were titrated with 0.5 M NaOH or 0.5 M HCl, covering a pH range from 2.0 to 12.0. Interactions with the ions in the dispersions were characterized based on the mean hydrodynamic diameter, polydispersity index and zeta potential using a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, UK) instrument at a fixed angle of 173° and a temperature of 25°C. The measurements were performed in water.

2.3 Preparation of peptone particles

Peptone particles were prepared by ionic crosslinking. The peptones were used at their maximum solubility in water previously determined at 25°C: 40.0 g/L for soy peptone, and 100.0 g/L for wheat peptone. Calcium chloride and quaternized guar gum (QGG) were the crosslinkers, and they were assayed at peptone/CaCl₂·2H₂O mass ratios (x 100) of 1.0, 2.0 and 3.0 and peptone/QGG ratios of 0.5, 1.0 and 1.5. The peptone particles were prepared by adding the crosslinkers

dropwise into the peptone solutions under mechanical stirring (300 rpm), which was provided by a Rushton turbine.

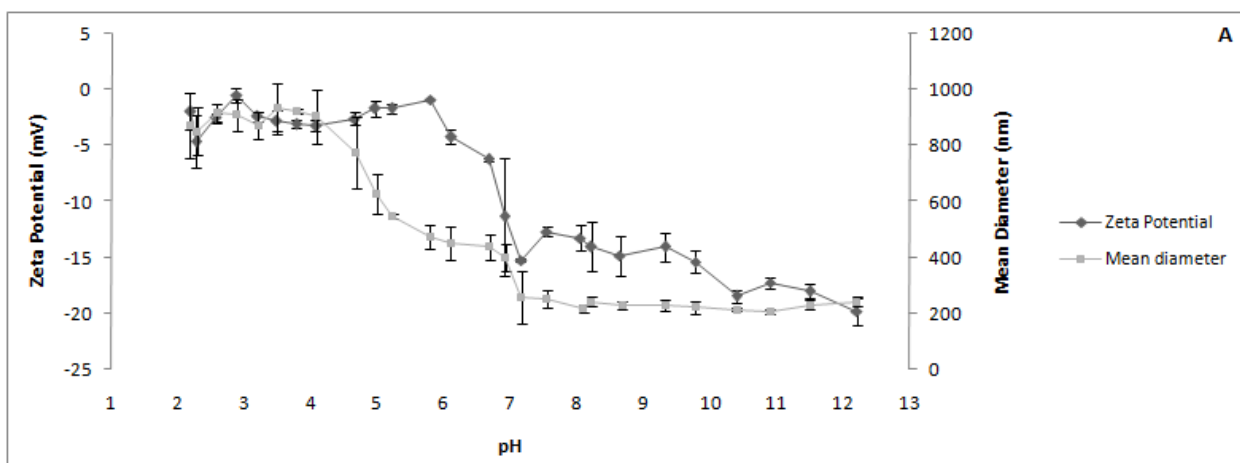
2.4 Characterization of peptone particles

The peptone particles were characterized by measuring their hydrodynamic mean diameter, polydispersity index and zeta potential with a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, UK) at a fixed angle of 173° and temperature of 25°C . The morphology of the particles was characterized by scanning electron microscopy (SEM) using a high resolution microscope (Leo 440i, England). A droplet of the suspension was placed on double-sided tape adhered to an aluminum stub and dried in air for one week. The stubs were then coated with gold to a thickness of $\sim 92 \text{ \AA}$ under an argon atmosphere. The coated samples were randomly scanned.

3. Results and discussion

3.1 Zeta potential and size of the peptone macromolecules with respect to pH

Because the vegetable peptones are heterogeneous systems, the measurements of zeta potential allow evaluate the availability of charges, while the mean diameter measurements give us information on the conformation of the macromolecules in the dispersion. Figure 1 shows the results obtained for the soy and wheat peptones.



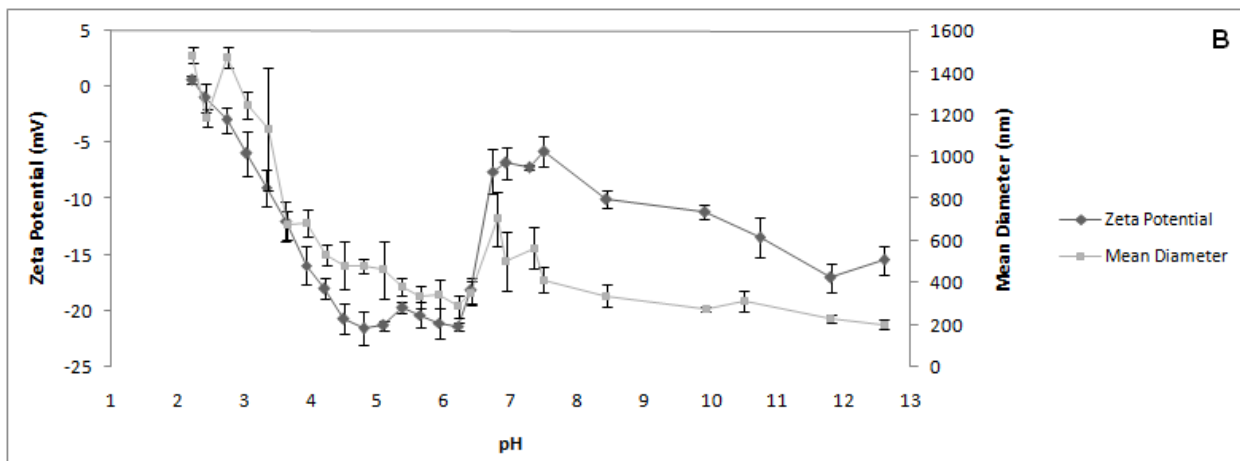


Figure 1. Influence of pH on the mean diameter and zeta potential before crosslinking of the vegetables peptones: (A) 40.0 g/L soy peptone, (B) 100.0 g/L wheat peptone.

Table 1 shows the concentrations for the total and free aspartic acid (5.1 and 0.3 g/100 mL, respectively) and for the total and free glutamic acid (11 and 2.1 g/100/mL, respectively) in the soy peptone. The concentrations of these amino acids in the wheat peptone are 2.9 (total) and 0.1 (free) for aspartic acid and 29.0 (total) and 0.3 (free) g/100 mL for glutamic acid. Therefore, there is a greater density of negative charges in the wheat peptone than in the soy peptone.

The profiles in Figure 1 reflect the differences in the concentrations of the glutamic and aspartic acids in the peptones as well the diffusive effects of H^+ ions in their conformational structures. In both cases, with decreasing pH, the electrolyte concentration increases, leading to a reduced zeta potential. When the pH increases, the zeta potential changes from 0 to -15 (approx.) and the mean diameter decreases to approximately 200 nm, indicating packing of the chains. However, the main changes occur in the pH range of 6.0 to 7.0 for the soy peptone and continuously in the pH range of 2.0 to 6.0 for the wheat peptone. On the basis of these results and due to the electrostatic stability of the particles, pH 6.0 was selected for crosslinking of the wheat peptone, while pH 7.0 was selected for that of the soy peptone.

3.2. Mean diameter and distribution for the crosslinked particles

Figure 2 shows the size distributions for the 3.0% calcium chloride/peptone ratio in the dispersions. In both cases, the dispersions of particles were characterized by the intensity distribution (I), which is proportional to the diameter of the sixth power, and by the number distribution (N), which is proportional to the actual diameter.

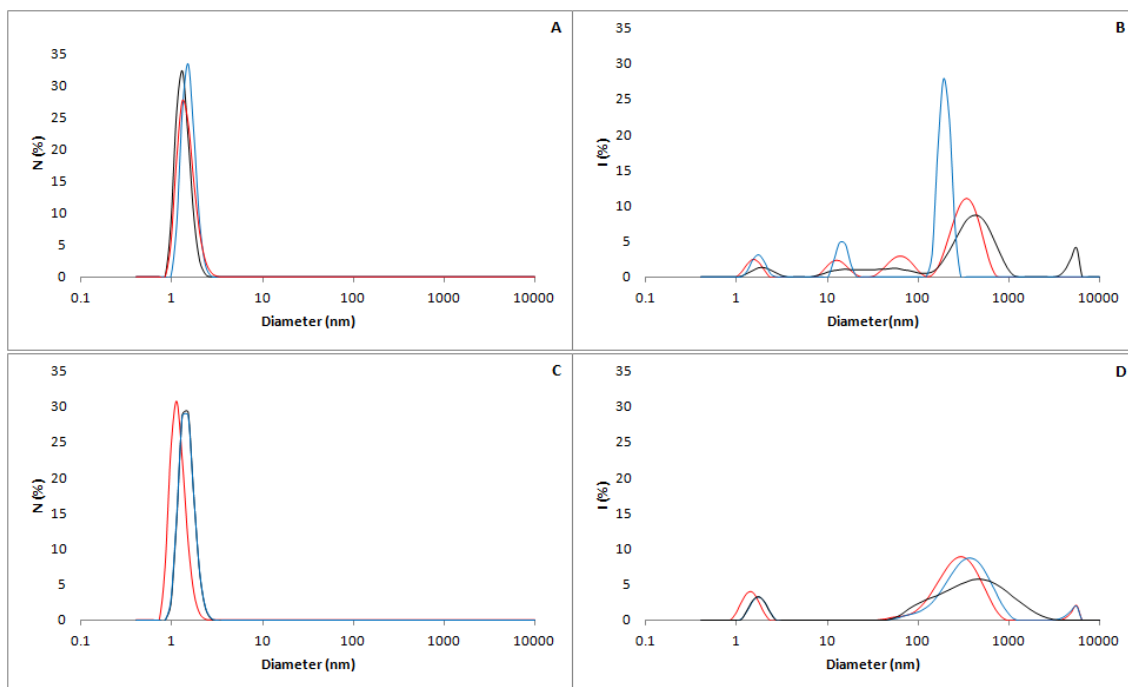


Figure 2. Particle size distributions of vegetable peptone particles in number (N) and intensity (I). Mass ratio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: peptone = 3.0%. Soy peptone (A and B), Wheat peptone (C and D). The curves in the figures represent triplicate measurements.

The (I) distributions show a large range of sizes, whereas the (N) distributions indicate a predominant mean diameter of approximately 2.5 nm for both peptones. From these results, we may infer that the small size of the calcium ion (radius of 0.1 nm) was unable to perform an efficient crosslinking of the peptone chains at the assayed ratio (3%). The small sized particles are due to the binding of the calcium ions to the free glutamic and aspartic acids. The peptones were only partially or non-crosslinked, generating the heterogeneous sizes in the (I) distribution. Higher $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / peptone mass ratios could increase the efficiency, but the effects of the higher calcium concentration must be considered for the specific application.

The effects of adding QGG to the soy peptone dispersions are shown in Figure 3 (A,B and C,D). It could be observed that at a 1.0% QGG/peptone ratio, both distributions (I) and (N) are similar, indicating no effective crosslinking, with the sizes of the dispersed peptones being approximately 1000 nm. However, at a 1.5% QGG:peptone (w/w) ratio, the sizes of approximately 100 nm in the (N) distribution denote the formation of nanoparticles from the ionic crosslinking, despite the presence of a minor population of partially or non-crosslinked peptones of approximately 1000 nm.

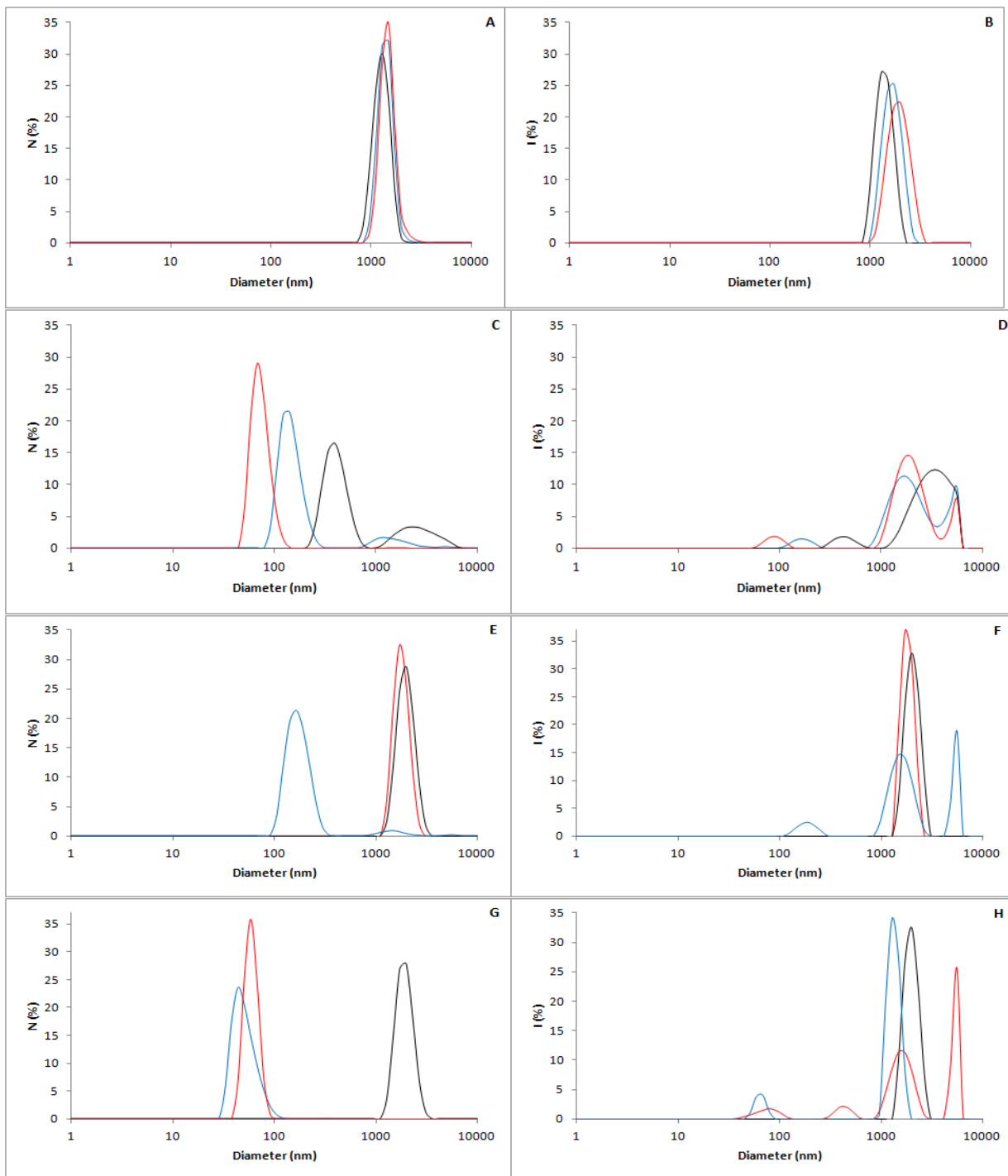


Figure 3. Particle size distributions of vegetable peptone particles in number (N) and intensity (I). Mass ratio QGG: soy peptone = 1.0% (A and B) and 1.5% (C and D). Mass ratio QGG: wheat peptone = 1.0% (E and F) and 1.5% (G and H). The curves in the figures represent triplicate measurements.

For the wheat peptone, the crosslinking was efficient for both QGG/peptone ratios, despite the presence of the larger population. Nanoparticles of approximately 100 nm were formed, with a tendency to form smaller sizes as the amount of QGG increased.

Figure 4 shows the zeta potential values for both peptones as $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and QGG were added. For the soy peptone, the zeta potential changes from -10 mV to -2 mV at a 0.5% QGG:peptone mass ratio. Increasing the crosslinker did not change the zeta potential, indicating internalization of the QGG into the structure of the particles. There are no significant changes in the zeta potential profiles in the presence of calcium, indicating its low efficiency for crosslinking the soy peptone as well as the internalization of the calcium ions.

The profile for the wheat peptone reveals that the zeta potential changes from 10 mV to +1 mV for the 0.5% QGG:peptone and 2.0% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /peptone mass ratios respectively. In this case, the positive zeta potential indicates binding of the crosslinkers at the surfaces of the particles. These results are consistent with the behavior of the size distributions in Fig 3.

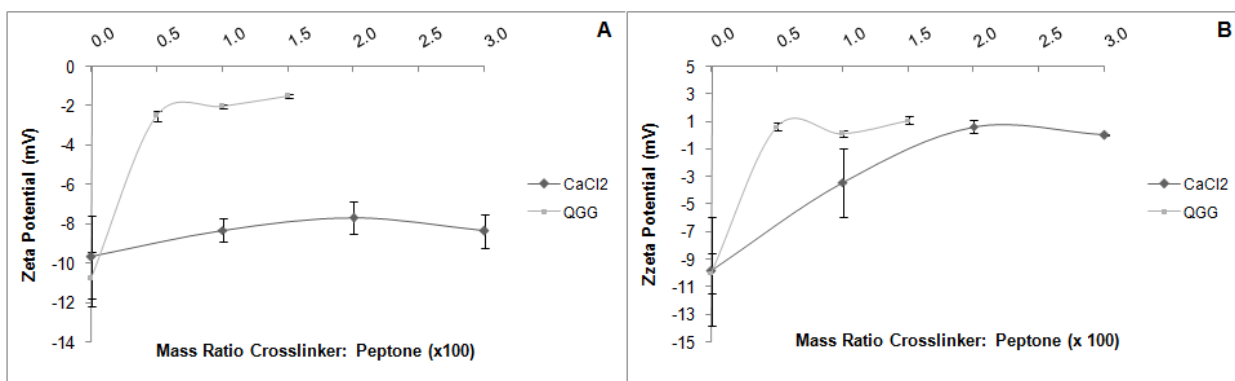


Figure 4. Zeta potentials of soy peptone particles (A) and wheat peptone particles (B) in the presence of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and QGG.

Figure 5 presents SEM micrographs for the soy peptone particles crosslinked with QGG. The images reveal a spherical morphology. The aggregations are primarily due to the drying of the particles during sample preparation.

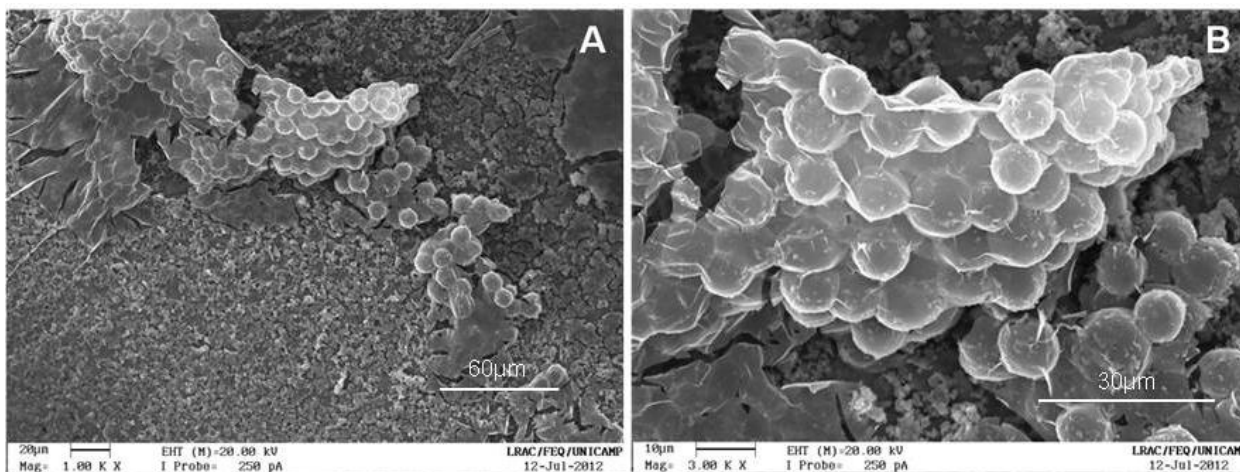


Figure 5. SEM micrographs showing the morphology of the soy peptone particles crosslinked with QGG. Mass ratio QGG: soy peptone =1.5%.

4. Conclusions

The results show the potential of using soy and wheat peptones to produce nanoparticles via ionic crosslinking under mechanical stirring in only one step. The QGG polymer was more efficient than calcium for crosslinking of the peptones. Nonetheless, improvements in the process must be achieved to produce particles with only one population in size and to produce more electrostatically stable particles.

Acknowledgments

The authors would like to thank Chemyunion Quimica Ltda. for the financial support.

5. References

1. B. Zisu and N. Shah. "Effects of PH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of Exopolysacharides by *Streptococcus thermophilus* 1275", *Journal of Dairy Science*, pp. 3405-3415, 2003.
2. N. Izawa, T. Hanamizu and T. Sone. "Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk", *Journal of Bioscience and Bioengineerin*, vol. 109, no. 4, pp. 356-360, 2010.

3. L. Benedini. “Influência de Peptonas Vegetais no Cultivo de Streptococcus zoepidemicus para a Produção de Ácido Hialurônico”, Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012, pp. 86.
4. M. Gamez-Garcia. “Effects of some oils, emulsions, and other aqueous systems on the mechanical properties of hair at small deformation”, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol.44, pp. 69-87, 1993.
5. S. P. Chahal, N. I. Challoner and R. T. Jones.” Moisture regulation of hair by cosmetic proteins as demonstrated by dynamic vapour sorption: A novel efficacy testing technique”, *Proc.14th Latin-American and Iberian Cong. Cosme. C..h em Santiago Chile*, pp.45-56, 1999.
6. J. A. Swift, S. P. Chahal, N. I. Challoner and J. E. Parfrey. “Investigation on the penetration of hydrolyzed wheat proteins into human hair by confocal laser-scanning fluorescence microscopy”, *J. Cosmet Sci.*, vol. 51, pp. 193-203, 2000.
7. L. Canabady-Rochelle, C. Sanchez, M. Mellema and S. Banon. “Calcium carbonate–hydrolyzed soy protein complexation in the presence of citric acid”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 345, pp. 88–95, 2010.
8. D. M. Suflet, I. Popescu, I. M. Pelin, M. T. Nistor, G. E. Hitruc, F. Doroftei and G. Fundueanu. “Preparation and characterization of microcapsules based on phosphorylated curdlan and hydrolysed collagen”. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, vol. 6, no. 2, pp. 653 – 661, 2011.
9. S. Drusch, Y. Serfert, A. Berger, M. Q. Shaikh, K. Ratzke, V. Zaporozhchenko and K. Schwarz. “New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein”, *Food Hydrocolloids*, vol. 27, pp. 332-338, 2012.
10. L. Jong and S. C. Peterson. “Effects of soy protein nanoparticle aggregate size on the viscoelastic properties of styrene–butadiene composites”. *Composites, Part A*, vol. 39, pp. 1768–1777, 2008.
11. M. A. F. Hayashi, Ducancel F. and Konno K. “Natural peptides with potential applications in drug development, diagnosis, and/or biotechnology”. *International Journal of Peptides*, vol. 2012, Article ID 757838, 2 pages, 2012.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a obtenção de partículas coloidais de pectina cítrica por método escalonável é viável. A escala das partículas depende do grau de esterificação, potencial zeta e concentração da pectina, além da concentração do agente reticulante. Para a obtenção de partículas em escala nanométrica é necessário utilizar baixas concentrações de pectina, tanto de alto quanto de baixo grau de esterificação. O balanço entre a repulsão das cadeias negativas das pectinas e a atração entre os grupos carboxílicos da pectina e as cargas positivas dos agentes reticulantes governa o grau de reticulação e a obtenção de partículas coloidais.

A presença de micro ou nanopartículas de pectina influencia o comportamento reológico dos polieletrólitos pectina cítrica e poliquaternium-7 por diferentes mecanismos. Em ambos os casos, as partículas aumentaram a viscoelasticidade do sistema e reduziram a frequência de cruzamento. As partículas também reduziram a viscosidade de cisalhamento e a viscosidade complexa, alterando o comportamento newtoniano dos sistemas. A solução de pectina cítrica segue a regra de Cox-Merz, mas desvios fortes foram observados para os sistemas contendo poliquaternium-7, dependendo da proporção de pectina: poliquaternium-7: micropartículas. Portanto, a inclusão de partículas em sistemas de polieletrólitos abre oportunidades para várias aplicações.

Os resultados mostram a viabilidade na preparação de micro e nanopartículas de peptonas vegetais de soja e trigo, pelo método de reticulação iônica. O polímero goma guar quaternizada foi mais eficiente para a coacervação que o cloreto de cálcio. A concentração do agente reticulante é crítica para a obtenção das nanopartículas no diâmetro desejado. Aperfeiçoamentos no processo devem ser considerados para a produção de partículas unimodais, bem como para a produção de partículas estáveis.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros sobre as pectinas cítricas sugere-se verificar a reologia das misturas de partículas, pectina cítrica livre e poliquaternium-7 em outras proporções, para entender o comportamento dos grupos. Ainda sobre a reologia das dispersões sugere-se a verificação do comportamento em rampa de temperatura.

No caso das peptonas vegetais, sugere-se a avaliação da influência de outras variáveis no processo de obtenção das partículas de peptona, como concentração da peptona, temperatura e pH.

Para ambos os casos, sugere-se a aplicação das partículas obtidas em processos de encapsulação de compostos bioativos lipofílicos como corantes e essências e ensaios sobre a resistência mecânica dos fios de cabelo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC – Acesso em: www.abihpec.org.br (Fevereiro/2012)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Acesso em: www.anvisa.gov.br (Fevereiro/2012).

ASPINALL G.O., CRAIG J.W.T., WHYTE J.L. Lemon-peel pectin. I. Fractionation and partial hydrolysis of water soluble pectin, *Carbohydr. Res.*, v. 7, p. 442, 1968.

AXELOS M. A. V., THIBAUT J. F. The chemistry of low methoxyl pectin, in *The Chemistry and Technology of Pectin*, Walter, R. H., Ed., Academic Press, New York, p. 109, 1991.

BARBOSA, A.B. e SILVA, R.R. Xampus. *Química Nova na Escola*, n. 2, p. 3-6, 1995.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. An introduction to Rheology. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 199p. , 1989.

BARRET A.J., NORTHCOTE D.H. Apple fruit pectic substances, *Biochem. J.*, v. 94, p. 617, 1965.

BENEDINI L.J. Influência de Peptonas Vegetais no Cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* para a Produção de Ácido Hialurônico. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012, 86 p. Tese (Mestrado).

BERESTEIJN. Processos para hidrólise seletiva de caseína/caseinato (PI9806911-0), 1998.

BERUBE D.M. The public acceptance of nanomedicine: a personal perspective. *Nanomed. Nanobiotechnol.* v. 1, p. 2-5, 2009.

BHUSHAN B. Nanoscale characterization of human hair and hair conditioners. *Progress in Materials Science*, v. 53 (4), p. 585-710, 2008.

BIGUCCI F., LUPPIA B., MONACO L., CERCHIARAB T., ZECCHI V. Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, p. 41–46, 2009.

BOLDUC C., SHAPIRO J. Hair Care Products: Waving, Straightening, Conditioning, and Coloring, *Clinics in Dermatology*, v.19, p. 431–436, 2001.

BRACCINI I., PEREZ S. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1089-1096, 2001.

BRANDÃO E.M., ANDRADE C.T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 1999.

BROWN KC. Hair coloring. In: Johnson DH, editor. Hair and hair care. New York: Marcel Dekker, p. 191–215, 1997.

BROWNLEE I.A. The physiological roles of dietary fibre. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 238–250, 2011.

BURGESS D.J. Complex coacervation: microcapsule formation. In: Dublin P.L., Bock J., Davis R., Schulz D.N., Thies C. Eds. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Berlin: Springer Verlag. p. 281-300, 1994.

CANABADY-ROCHELLE L., SANCHEZ C., MELLEMA M., BANON S. Calcium carbonate–hydrolyzed soy protein complexation in the presence of citric acid, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 345, p. 88–95, 2010.

CANNEL D., NGHI N. Composition for treatment hair against chemical and photo damage. US PATENT (US006013250A), 2000.

CATTANEO A.G., GORNATI R., SABBIONI E., CHIRIVA-INTERNATI M., COBOS E., JENKINS M.R., BERNARDINI G. Nanotechnology and human health: risks and benefits. *J. Appl. Toxicol*, v 30, p. 730-744, 2010.

CEVC G., SCHATZLEIN A. & RICHARDSEN H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v. 1564, n.1, p. 21-30. 2002.

CHAHAL S. P., CHALLONER N.I., Jones R.T. Moisture regulation of hair by cosmetic proteins as demonstrated by dynamic vapour sorption: A novel efficacy testing technique., *Proc.14th Latin-American and Iberian Cong Cosme Ct.h em.Santiago Chile*, p.45-56, 1999.

CHAKRABORTY M., JAIN S., RANI V. Nanotechnology: Emerging Tool for Diagnostics and Therapeutics. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 165, p. 1178-1187, 2011.

CHAUDRY Z.F., ROCHA J.L., PLEPIS A.M.G., ROSSI M., GOISSIS G. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia (Abr/Jun)*, p. 40-46, 1997.

CHRONAKIS I.S., KASAPIS S., A rheological study on the application of carbohydrate-protein incompatibility of the development of low fat commercial spreads. *Carbohydrate Polymer.*, v. 28, p. 367-373., 1995.

CRODA. <http://www.croda.com>. Acesso em maio, 2012.

DASTJERDI R., MONTAZER M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 5–18, 2010.

DAVIES M. A. F., GIDLEY M. J., MORRIS E. R., POWELL D. A., REES D. A. Intermolecular association in pectin solutions, *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 2, 330, 1980.

DESAI K.G.H. Preparation and Characteristics of High-Amylose Corn Starch/Pectin Blend Microparticles: A Technical Note., *AAPS PharmSciTech*, v. 6 (2), p. E202-E208, 2005.

DE VRIES J.A., ROMBOUT F.M., VORAGEN A.G.J., PILNIK W. Enzymic degradation of apple pectins, *Carbohydr. Polym.*, v. 2, p. 25, 1982.

DIAS L.C. Stable alkaline hair bleaching compositions and method for use thereof. USPTO n° 6540791, 2003.

DIAZ J.V., ANTHON G.E., BARRETT D.M.. Nonenzymatic Degradation of Citrus Pectin and Pectate during Prolonged Heating: Effects of pH, Temperature, and Degree of Methyl Esterification., *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, No. 13, 2007.

DRAELOS Z.K. Hair cosmetics. *Dermatol Clin.*, v. 9, p.19 –27, 1991.

DRUSCH S., SERFERT Y., BERGER A., SHAIKH M.Q., RÄTZKE K., ZAPOROJTCHENKO V., SCHWARZ K. New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein, *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 332-338, 2012.

EL-GIBALY I. Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery., *International Journal of Pharmaceutics*, v. 232, p. 199–211, 2002.

ERÇELEBI E. A., IBANOGLU E. Characterization of Phase Separation Behavior, Emulsion Stability, Rheology, and Microstructure of EggWhite–Polysaccharide Mixtures. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 6, 2009.

ESPOSITO E., CORTESI R., LUCA G., NASTRUZZI C. Pectin-Based Microspheres: A Preformulatory Study., *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 944, p. 160–179, 2001.

FEUGHELMAN M. Morphology and properties of hair. In: Johnson DH, editor. *Hair and hair care*. New York: Marcel Dekker; p. 1–12, 1997.

FEUGHELMAN M. Natural Protein Fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 83, p. 489-507, 2002.

FERGUSON, J.; KEMBLOWSKI, Z.. *Applied fluid rheology*. New York: Elsevier Applied Science., p.32., 1991

FIRJAN – Federação das Indústrias do Estado do Rio de Janeiro. Acesso em: <http://www.firjan.org.br> (Abril/2012)

FISHMAN M. L., GROSS K. C., GILLOSPIE D. T., SONDEY S. M. Macromolecular components of tomato fruit pectin, *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 274, p. 179, 1989.

FRONZA T., GUTERRES S.S., POHLMANN A. R., TEIXEIRA H.F. Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2007.

FU Y., NABIOLLAHI N., WANG T., HU Z., CARLBERG B., ZHANG Y., WANG X., LIU J. A complete carbon-nanotube-based on-chip cooling solution with very high heat dissipation capacity. *Nanotechnology*, v. 4, p.3-23, 2012.

GAMEZ-GARCIA M. Effects of some oils, emulsions, and other aqueous systems on the mechanical properties of hair at small deformation, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.44, p. 69-87, 1993.

GIACALONE F.; MARTÍN N. New Concepts and Applications in the Macromolecular Chemistry of Fullerenes. *Adv. Mater.*v. 22, p. 4220–4248, 2010.

GUERRA G. D., CERRAI P., TRICOLI M., MALTINTI S., SBARBATI DEL GUERRA R.. In vitro cytotoxicity testing of chitosan-containing polyelectrolyte complexes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 73 – 76, 1998.

HARRISON S., SINCLAIR R. Hair colouring, permanent styling and hair structure. *Journal of Cosmetic Dermatology*. V.2, p. 180-185, 2004.

HARTIG S.M., FREENE R.R., DIKOV M.M., PROKOP A., DAVIDSON J.M. Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharmaceutical Research*. V.24, (12), p. 2353-2369, 2007.

HORN D., RIEGER J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use; *Angew. Chem. Int. Ed.*, v.40, p. 4330 – 4361, 2001.

HOSHOWSKI M.A. Clear leave-on hair treatment composition and method. United States Patent (US006048520A), 2000.

INSTITUTO FEDERAL ALEMÃO DE AVALIAÇÃO DE RISCO (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin). Acesso em: <http://www.bfr.bund.de> (Abril/ 2012).

IZAWA, N; HANAMIZU, T; SONE, T. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 109 (4), p. 356-360, 2010.

JANSEN J., MAIBACH H.I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. Edited by: André O. Barel, Marc Paye and Howard I.M. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 180-181, 2001

JARVIS M. C., THRELFALL D. R., FRIEND J., Potato cell wall polysaccharides: degradation with enzymes from *Phytophthora infestans*, *J. Exp. Bot.*, v. 131, p. 1309, 1981.

JARVIS M. C. Structure and properties of pectin gels in plant cell wall, *Plant Cell Environ.*, v.7, p. 153, 1984.

- JONES O.G., McCLEMENTS D.J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes., *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 167, p. 49–62, 2011.
- KASAPIS S., AL-ALAWI A., GUIZANI N., KHAN A.J., MITCHELL J.R. Viscoelastic properties of pectin-co-solute mixtures at iso-free-volume states. *Carbohydrate Research*, v. 329, p. 399–407, 2000.
- KIM K.; JEONG S.; WOO J. Y.; HAN C. Successive and large-scale synthesis of InP/ZnS quantum dots in a hybrid reactor and their application to white LEDs. *Nanotechnology*. v. 23, 065602 (7pp), 2012.
- KISS, J. β -eliminative degradation of carbohydrates containing uronic acid residues. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v.29, p. 229-303, 1974.
- KOGAN A., GARTI N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv. Colloid Interface Sci.*, p. 123-126, 2006.
- KOHN, R., Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin, *Carbohydr. Res.*, v.160, p. 343, 1987.
- KOYANAGI A. Hydrolyzed pectin derivatives accompanied with synergy by silylation or siliconizing., *J. CosmeSt.d.*, v. 58, p. 435-441, 2007.
- LAMBERT G., FATTAL E., PINTO-ALPHANDARY H., GULIK A., COUVREUR P. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotide. *Pharmaceutical Research*, v.17, n.6, p.707-714, 2000.
- LASIC D.D. *Liposomes: From Physics to Applications*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 575 p., 1993.
- LEE I.; ALBITER M. A.; ZHANG Q.; GE J.; YIN Y.; ZAERA F. New nanostructured heterogeneous catalysts with increased selectivity and stability *Phys. Chem. Chem. Phys.*v. 13, p. 2449–2456, 2011.
- LEHNINGER A.L., NELSON D.L., COX M.M. *Principles of Biochemistry*, 3^{ed}. Worth Publishers, Nova York, 2003.
- MARCELINO A.G. Desenvolvimento tecnológico da extração da sericina e preparação de nanopartículas para aplicação em cosméticos. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008, 125 p. Tese (Mestrado).
- MASUELLI M.A. Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties., *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, p. 286–291, 2011.

MAY C. D. Industrial pectins: sources, production and applications, *Carbohydr. Polym.*, v. 12, p. 79, 1990.

MENDIETA-TABOADA O., CARVALHO R.A., SOBRAL, P.J. A. Análise dinâmico-mecânica: aplicações em filmes comestíveis. *Química Nova*, v. 31, n. 2, 2008.

MOLLENDROFF L. J., VON VILLIERS O. T., JACOBS G., WESTRAAD I. Molecular characteristics of pectin constituents in relation to firmness, extractable juice, and woolliness in nectarines, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, v. 118, p. 77, 1993.

MULLER R.H., PETERSEN R.D., HOMMONOSS A., PARDEIKE J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products; *Advanced Drug reviews*, v.59, p.522-530, 2007.

MURALIKRISHNA G., TARANATHAN R. N. Characterization of pectin polysaccharides from pulse husks, *Food Chem.*, p.50- 87, 1994.

NALCO (<http://www.nalco.com>) Acesso em: 26 de fevereiro de 2013.

NOGUEIRA A.C.S., DICELIO L.E., JOEKES I. About photo-damage of human hair. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 5, p. 165-169, 2006.

OGONCZYK D. SIEK M., GARSTECKI P. Microfluidic formulation of pectin microbeads for encapsulation and controlled release of nanoparticles. *Biomicrofluidics*, v. 5, 013405, 2011.

ORGANOTECHNIE. (<http://www.organotechnie.com/vegetabl.htm>). Acesso em maio,2012.

PENG K.; LEE S. Silicon Nanowires for Photovoltaic Solar Energy Conversion. *Adv. Mater.* v. 23, p. 198–215, 2011.

PÖTSCH L., MOELLER M.R. On Pathways for small molecules into and out of human hair fibers,, *J. Forensic Sciences*, v. 41, p. 121-125, 1996.

PRESTON, R. D., Polysaccharide: conformation and cell wall function, *Rev. Plant Physiol.*, v. 30, p. 55, 1979.

QUINTANAR-GUERRERO D., ALLÉMAN E., DOELKER E., FESSI H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*, v.15 (7), p.1056 - 1062, 1998.

RAMSDEN J. J. *Applied Nanotechnology: The Conversion of Research Results to Products*. Elsevier Publishers, 2009.

RAY D., RANA A.K., BOSE N.R., SENGUPTA S.P. Effect of guar-gum treatment on mechanical properties of vinylester resin matrix composites reinforced with jute yarns. *Journal of Applied Polymer Science.*, v. 98 (2), p. 557-563, 2005.

RENARD C.M.G.C., THIBAUT J. Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation., *Carbohydrate Research* , v. 286, p. 139 150, 1996.

RHODIA SA. Acesso em: www.rhodia-novecare.com (Março 2012) - publicações técnicas do fabricante.

ROBBINS C.R., *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*, Fourth edition, Springer-Verlag, New York, 482p., 2002.

SALMASO S.; CALICETI P. Self assembling nanocomposites for protein delivery: Supramolecular interactions of soluble polymers with protein drugs. *Int J Pharmaceut* (2012), doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.029.

SATO A.C.K., *Influência do tamanho de partículas no comportamento reológico da polpa de jabuticaba*. (Tese de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas), 73 págs., 2005.

SHAFFAZICKI, S.R., GUTERRES, S.S., FREITASII, L.L. POHLMANNII, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova*, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SHEFER A., SHEFER S.D. Controlled delivery system for hair care products. USPTO nº 6491902, 2002.

SHIMOJO A.A.M. *Modificações químicas do ácido hialurônico para a produção de géis reticulados e de fosfolipídios derivatizados*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011, 162 p. Tese (Mestrado).

SINJAN D.R. Polymer relationships during preparation of chitosan–alginate and poly-L-lysine–alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release*. v. 89 (1), p. 101–112, 2003.

SMITH J.R., SWIFT J.A. Lamellar subcomponents of the cuticular cell membrane complex of mammalian keratin fibres show friction and hardness contrast by AFM. *J. Microscopy*, v. 206, p. 182-193, 2002.

SRIAMORNSAK P. Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 8 (3), p. 221-227, 1999.

STEFFE, J. F. *Rheological methods in food process engineering*. Michigan: Freeman Press, 2a ed, 1996. 418p.

STOKES J.R., MACAKOVA L., CHOJNICKA-PASZUN A., DE KRUIF C.G., DE JONGH H.H.J. Lubrication, Adsorption, and Rheology of Aqueous Polysaccharide Solutions. *Langmuir*, v. 27, p. 3474–3484, 2011.

STRANICK M.A. Determination of Negative Binding Sites on Hair Surfaces Using XPS and Ba²⁺ Labeling. *Surface and Interface Analysis*, vol. 24, 522-528, 1996.

SUFLET D.M., POPESCU I., PELIN I.M., NISTOR M.T., HITRUC G.E., DOROFTEI F., FUNDUEANU G. Preparation and characterization of microcapsules based on

phosphorylated curdlan and hydrolysed collagen. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, v. 6 (2), p. 653 – 661, 2011.

SWIFT J. A., CHAHAL S.P., CHALLONER N. I., PARFREY J. E. Investigation on the penetration of hydrolyzed heat proteins into human hair by confocal laser-scanning fluorescence microscopy., J. Cosmet Sci., v. 51, p. 193-203, 2000.

TADROS T.F., Rheology of Dispersions – Principles and Applications. Weinheim: Wiley-VCH, ISBN: 978-3-527-32003-5, 2010.

TAKAHASHI T.; TAKEI K.; GILLIES A. G.; FEARING R. S.; JAVEY A. Carbon Nanotube Active-Matrix Backplanes for Conformal Electronics and Sensors. Nano Lett. v. 11, p. 5408–5413, 2011.

THAKUR B.R., SINGH R.K., HANDA A.K., RAO M.A. Chemistry and Uses of Pectin — A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 37(I), p. 47-73, 1997.

THIBAUT J. F., RINAUDO M. Chain association of pectic molecules during calcium induced gelation, *Biopolymers*, v. 25, p.455-468, 1986.

THUNEMANN A.F., MULLER M., DAUTZENBERG H., JOANNY J., LOWEN H. Polyelectrolyte Complexes; Adv Polym Sci. v. 166, p. 113-171, 2004.

TRÜEB R. Shampoos: Ingredients, efficacy and adverse effects. JDDG; v. 5, p.356–365, 2007.

UGUR S.S., SARUS M., AKTAS A.H. The fabrication of nanocomposite thin films with TiO₂ nanoparticles by the layer-by-layer deposition method for multifunctional cotton fabrics. Nanotechnology, doi: 10.1088/0957-4484/21/32/325603, 2010.

US FORESIGHT INSTITUTE. Acesso em: <http://www.foresight.org/> (Fevereiro/2012).

VALKONIC, V. Human hair. Fundamentals and methods for measurement of elemental composition. CRC Press. v. I., p. 3-51, 2000.

VORAGEN A. G. J., PILNIK W., THIBAUT J. F., AXELOS M. A. V., RENARD C. M. G. C. Pectins. Food Polysaccharides and Their Applications. Edited by Stephen A. M., p. 287- 369, Marcel Dekker, New York., 1995.

WAGNER R.C.C., A estrutura da medulla e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo. (Tese de doutorado – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas), 84 págs. , 2006.

WALKINSHAW M. D., ARNOTT S., Conformations and interactions of pectin. II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels, *J. Mol. Biol.*, v. 53, p. 1075, 1981.

WALTER P, WELCOMME E, HALLÉGOT P, ZALUZEC NJ, DEEB C, CASTAING J, VEYSSIÈRE P, BRÉNIAUX R, LÉVÊQUE JL, TSOUCARIS G. Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula. *Nano Lett.*, v. 10, p. 2215-2219, 2006.

WILLIAMS D.F, SCHMITT W.H. Chemistry and technology of the cosmetics and toiletries industry. Second Edition. Blackie Academic & Professional Editor.1996.

WILLIAMS M.A.K., MARSHALL A.T., ANJUKANDI P., HAVERKAMP R. G. Investigation of the effects of fine structure on the nanomechanical properties of pectin., *Physical Review*, E-76, 2007.

YU C., CAO H., ZHANG X., ZHOU F., CHENG S., ZHANG X., ZHUO R. Hybrid Nanospheres and Vesicles Based on Pectin as Drug Carriers., *Langmuir*, v. 25(19), p. 11720–11726, 2009.

ZOU R.; YU L.; ZHANG Z.; CHEN Z.; HU J. High-precision, large-domain three-dimensional manipulation of nano-materials for fabrication nanodevices. *Nanoscale Research Letters.*, v.6, p. 473, 2011.

ZHANG Q.,JAORINIEC J., LEE G., MARSZALEK P. E., *Angew. Chem., Int.*, v. 44, p. 2723, 2005.

ZHANG B., XIAO Y., HSIEH A., THAVANDIRAN N., RADISIC M. Micro-and nanotechnology in cardiovascular tissue engineering., *Nanotechnology*, v. 22, 2011.

ZISU, B.; SHAH, N. Effects of PH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of Exopolysacharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science.*, p 3405-3415, 2003.

ZULLI ET AL em JANSEN J., MAIBACH H.I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. Edited by: André O. Barel, Marc Paye and Howard I.M. Ed. Marcel Dekker, Inc New York, p.180-181, 2001.

ZVIAK C. Permanent waving and hair straightening. In: Zviak C, editor. The science of hair care. New York: Marcel Dekker, p.183–212, 1986.