

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Formação de Emulsões O/A Estabilizadas por**  
**Biopolímeros para Aplicação em Encapsulamento de  $\beta$ -**  
**caroteno**

**Luciano José Barreto Pereira**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**FORMAÇÃO DE EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS POR  
BIOPOLÍMEROS PARA APLICAÇÃO EM ENCAPSULAMENTO DE  
BETA CAROTENO**

**LUCIANO JOSÉ BARRETO PEREIRA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**D.Sc. Edwin Elard Garcia Rojas**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Julho de 2015

668.92

P436f

T

Pereira, Luciano José Barreto, 1979-

Formação de emulsões O/A estabilizadas por biopolímeros para aplicação em encapsulamento de beta caroteno / Luciano José Barreto Pereira. - 2015.

118 f.: il.

Orientador: Edwin Elard Garcia Rojas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Inclui bibliografias.

1. Polimerização em emulsão - Teses. 2. Biopolímeros - Teses. 3. Excipientes farmacêuticos - Teses. 4. Beta caroteno - Teses. I. Garcia Rojas, Edwin Elard, 1972- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**LUCIANO JOSÉ BARRETO PEREIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10/07/2015

---

Edwin Elard Garcia Rojas (D.Sc) UFF  
(Orientador)

---

Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa (D.Sc) UFRRJ

---

Bernardo de Sá Costa (D.Sc) UFF

## **DEDICATÓRIA**

*Ao meu anjo Benício e a minha esposa e amiga leal, Eveline.*

*Aos meus amados, queridos e dedicados pais, Edir José e Zelia Barreto Pereira.*

*Aos meus irmãos Thaís Cristina, Marcelo Barreto e Maurício Finelli.*

*Aos meus sogros Davidson Braz Paiva (in memoriam) e Maria de Fátima Cópio.*

*Ao meu grande amigo José Eduardo de Azevedo e a todos os meus familiares.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter dado a mim o dom da vida, a felicidade, saúde e capacidade para trabalhar e estudar.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), especialmente à Direção do Campus Nilo Peçanha/Pinheiral, por ter incentivado e permitido meu aperfeiçoamento e capacitação profissional.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e à Universidade Federal Fluminense (UFF), pela oportunidade de adquirir, diariamente, novos conhecimentos.

Ao meu orientador, Edwin Elard Garcia Rojas, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, e pelo incentivo em executá-lo com a qualidade a ele merecida. Pela parceria na publicação do artigo de revisão e pelos ensinamentos e auxílios na estruturação e organização da dissertação.

Ao professor Mario Geraldo de Carvalho, do Departamento de Química-ICE, da UFRRJ, por possibilitar a análise de FTIR das amostras.

Ao amigo e “Mestre” Juarez Vicente, pela presteza em sempre ajudar, pelos incontáveis e valiosos ensinamentos, auxílios e opiniões que influenciaram diretamente, a qualidade final do trabalho. Pelo convívio e amizade, os quais me ajudaram a ser uma pessoa melhor e também me deram incentivo para executar essa pesquisa.

À amiga Angélica Costa, pela presteza em sempre ajudar, pelos singulares ensinamentos e auxílios no tratamento estatístico, desenvolvimento de resultados e discussões, e elaboração e edição dos gráficos.

Ao amigo Clitor Fernandes, pelos valiosos ensinamentos e discussões bastante proveitosas, e pela realização e edição das imagens das amostras, em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica.

Ao meu querido irmão, Marcelo Barreto, pela edição de algumas figuras.

À colega Elisa, pela realização e edição de imagens das amostras em microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia e Tecnologia Agroindustrial (LETA) da UFF/Volta Redonda, Clyselen, Matheus e Monique, pelo agradável convívio e ajudas providenciais.

## RESUMO

PEREIRA, Luciano José Barreto. **Formação de emulsões O/A estabilizadas por biopolímeros para aplicação em encapsulamento de  $\beta$ -caroteno**. 2015. 118p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Nas últimas décadas, as emulsões têm sido amplamente utilizadas por diferentes indústrias, no encapsulamento, no transporte e na liberação controlada de vários componentes bioativos, como nutracêuticos, vitaminas, minerais, fármacos, entre outros. A utilização de biopolímeros na produção de emulsões se tornou promissora, principalmente para as indústrias de alimentos, uma vez que esses compostos são inócuos ou de baixa toxicidade. As emulsões do tipo óleo em água (O/A) permitem a veiculação de componentes lipofílicos em matrizes com alta concentração de água, como são os alimentos, facilitando estratégias como a fortificação e a suplementação desses componentes, como é o caso do  $\beta$ -caroteno. Os objetivos da pesquisa foram: formar emulsões do tipo O/A, com os estabilizantes ovalbumina (OV), goma arábica (GA) e goma xantana (GX), caracterizar esses sistemas e avaliar suas estabilidades à 25°C, em relação à separação de fases; encapsular e avaliar a eficiência do encapsulamento e da retenção do  $\beta$ -caroteno sintético (à temperatura de 25°C e 55°C) nas emulsões mais estáveis; caracterizar os sistemas encapsulantes formados e avaliar suas estabilidades, à 25°C e 55°C, em relação à separação de fases. As emulsões foram elaboradas por técnica de emulsificação, composta de dois passos: pré homogeneização em ultraturrax e homogeneização em ultrassom. Os dados foram submetidos às análises de variância (ANOVA) e de regressão, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, adotando-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). O maior tempo de estabilidade à separação de fases (7 dias) ocorreu nos sistemas que continham OV e GA, nas concentrações de 0,5% e 1% e 7,5% e 10%, respectivamente, na ausência de GX. Esses sistemas, então, foram selecionados para aplicação no microencapsulamento de  $\beta$ -caroteno. Mesmo apresentando maior tamanho de partícula e menor valor de potencial zeta, o sistema com 1% de OV e 10% de GA foi o único que apresentou índice de estabilidade da emulsão (IEE) igual a 100% por 7 dias, tanto à 25°C quanto à 55°C. Ainda, nas duas temperaturas estudadas, apresentou a maior eficiência de retenção (ER) de  $\beta$ -caroteno, ao final das análises. Com esses resultados pode-se inferir que a concentração de OV correlacionou-se positivamente com estabilidade à separação de fases, nas temperaturas estudadas, e com maior proteção à degradação do carotenoide. Os sistemas estudados são indicados para aplicação em alimentos, uma vez que apresentaram propriedades reológicas iguais a da maioria das emulsões alimentícias.

**Palavras-chave:** Sistemas coloidais, Componentes bioativos, Eficiência de encapsulamento.

## ABSTRACT

PEREIRA, Luciano José Barreto. **The formation of emulsions O/W stabilized by biopolymers for application of  $\beta$ -caroteno encapsulation.** 2015. 118p Dissertation (Master in Science and Food Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

In recent decades, the emulsions have been widely used by different industries, in packaging, delivery and controlled release of various bioactive components, such as nutraceuticals, vitamins, minerals, pharmaceuticals, among others. The use of biopolymers for the production of emulsions become promising, especially for the food industry, since these compounds are safe or lower toxicity. Moreover, the type of oil in water emulsions (O/W) allows the placement of lipophilic components in arrays with high concentration of water, as are the food, facilitating strategic the fortification and supplementation of these components, as is the case of  $\beta$ -carotene. The research aims were: to elaborate oil in water emulsions O/W formed with the stabilizers ovalbumin (OV) arabic gum (AG) and xanthan gum (XG); to characterize and evaluate the stability of these systems at 25°C, according to phase separation; to encapsulate and to evaluate encapsulation efficiency and retention efficiency (at temperature of 25°C and 55°C) of synthetic  $\beta$ -carotene in the most stable emulsions; to characterize and to evaluate the stability of formed encapsulating systems at 25°C e 55°C, according to phase separation. The emulsions were prepared by emulsifying technique comprises two steps: pre-homogenization in ultraturrax and homogenization in ultrasound. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and regression analysis, and the means were compared by Duncan test, with level of significance of 5% ( $p < 0.05$ ). The longest time stability against phase separation (7 days) was observed in systems containing OV and AG at concentrations of 0.5% and 1% and 7.5% and 10%, respectively, in the absence of GX. These systems were then selected for use in the microencapsulation of  $\beta$ -carotene. Even with larger particle size and lower value of zeta potential, the system OV1%GA10% was the only one to presented emulsion stability index (ESI) equal to 100% for 7 days, at both temperatures (25°C and 55°C). Even, at two temperatures, presented the highest retention efficiency (RE) of  $\beta$ -carotene at the end of the analysis (72 hours). With these results, it can be predict that the concentration of OV was positively correlated with stability to phase separation at temperatures studied and greater protection of the carotenoid degradation. The systems studied are indicated for use in foods as it have the same rheological properties of most food emulsions.

**Key-words:** Colloidal systems, Bioactive components, Encapsulation efficiency.

## LISTA DE TABELAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabela 1  | Comparações entre algumas propriedades encontradas em macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões O/A.  | 5  |
| Tabela 2  | Estabilizantes com potencial de utilização em nanoemulsões comestíveis.   | 6  |
| Tabela 3  | Aplicações de nanoemulsões na indústria de alimentos.   | 8  |
| Tabela 4  | Características de homogeneizadores utilizados para elaboração de emulsões.   | 10 |
| Tabela 5  | Valores de tamanho médio das partículas e de PDI dos sistemas 19, 20 e 36, nos dias 0, 1 e 7.   | 38 |
| Tabela 6  | Valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, nos dias 0, 1 e 7.  | 40 |
| Tabela 7  | Parâmetros de ajuste aos diferentes modelos reológicos, dos sistemas 19, 20 e 36.   | 42 |
| Tabela 8  | Valores de tamanho médio das partículas e de PDI dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 25°C.  | 63 |
| Tabela 9  | Comparação do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 25°C.                         | 64 |
| Tabela 10 | Potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3 nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 25°C.   | 64 |
| Tabela 11 | Comparação do valor de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 25°C.                              | 65 |
| Tabela 12 | Valores de tamanho médio das partículas e de PDI dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 55°C.  | 65 |
| Tabela 13 | Comparação do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 55°C.                         | 66 |
| Tabela 14 | Potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3 com $\beta$ -caroteno encapsulado, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 55°C.  | 66 |
| Tabela 15 | Comparação do valor de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 55°C.                              | 67 |
| Tabela 16 | Equação de ajuste (decaimento exponencial) da eficiência de retenção do $\beta$ -caroteno encapsulado nos sistemas 1, 2 e 3, à temperatura constante de 25°C. | 69 |
| Tabela 17 | Características gerais de formação de emulsões múltiplas empregadas no microencapsulamento de componentes bioativos.  | 85 |
| Tabela 18 | Formulações de emulsões O/A com diferentes combinações e concentrações dos biopolímeros OV, GX e GA.  | 94 |
| Tabela 19 | Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 0 (Tabela 5).   | 95 |
| Tabela 20 | Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 1 (Tabela 5).   | 95 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 21 | Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 7 (Tabela 5).      | 95 |
| Tabela 22 | Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas do sistema 19 (Tabela 5).                           | 95 |
| Tabela 23 | Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas do sistema 20 (Tabela 5).                           | 95 |
| Tabela 24 | Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas do sistema 36 (Tabela 5).                           | 95 |
| Tabela 25 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 0 (Tabela 6).                    | 96 |
| Tabela 26 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 1 (Tabela 6).                    | 96 |
| Tabela 27 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 7 (Tabela 6).                    | 96 |
| Tabela 28 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 19 (Tabela 6).   | 96 |
| Tabela 29 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 20 (Tabela 6).   | 96 |
| Tabela 30 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 36 (Tabela 6).   | 96 |
| Tabela 31 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 25°C (Tabela 8). | 96 |
| Tabela 32 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 25°C (Tabela 8). | 97 |
| Tabela 33 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 25°C (Tabela 8). | 97 |
| Tabela 34 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 25°C (Tabela 8). | 97 |
| Tabela 35 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, à 25°C (Tabela 8). | 97 |
| Tabela 36 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas do sistema 1, à 25°C (Tabela 8).                    | 97 |
| Tabela 37 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas do sistema 2, à 25°C (Tabela 8).                    | 97 |
| Tabela 38 | Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas do sistema 3, à 25°C (Tabela 8).                    | 97 |
| Tabela 39 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 25°C (Tabela 10).              | 98 |
| Tabela 40 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 25°C (Tabela 10).              | 98 |
| Tabela 41 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 25°C (Tabela 10).              | 98 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Tabela 42 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 25°C (Tabela 10).         | 98  |
| Tabela 43 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, à 25°C (Tabela 10).         | 98  |
| Tabela 44 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 1, à 25°C (Tabela 10).                            | 98  |
| Tabela 45 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 2, à 25°C (Tabela 10).                            | 98  |
| Tabela 46 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 3, à 25°C (Tabela 10).                            | 99  |
| Tabela 47 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 55°C (Tabela 12). | 99  |
| Tabela 48 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 55°C (Tabela 12). | 99  |
| Tabela 49 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 55°C (Tabela 12). | 99  |
| Tabela 50 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 55°C (Tabela 12). | 99  |
| Tabela 51 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, à 55°C (Tabela 12). | 99  |
| Tabela 52 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, à 55°C (Tabela 12).                  | 99  |
| Tabela 53 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 2, à 55°C (Tabela 12).                  | 100 |
| Tabela 54 | Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 3, à 55°C (Tabela 12).                  | 100 |
| Tabela 55 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 55°C (Tabela 14).         | 100 |
| Tabela 56 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 55°C (Tabela 14).         | 100 |
| Tabela 57 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 55°C (Tabela 14).         | 100 |
| Tabela 58 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 55°C (Tabela 14).         | 100 |
| Tabela 59 | Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 55°C (Tabela 14).         | 100 |
| Tabela 60 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 1, à 55°C (Tabela 14).                            | 101 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Tabela 61 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 2, à 55°C (Tabela 14). | 101 |
| Tabela 62 | Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 3, à 55°C (Tabela 14). | 101 |

## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Representação esquemática de emulsões. A: O/A, B: A/O, C: A/O/A e D: O/A/O.   | 4  |
| Figura 2  | Principais tipos de instabilidades em emulsões O/A. O: óleo; A: água.   | 11 |
| Figura 3  | Representação da característica anfifílica da goma arábica.   | 15 |
| Figura 4  | Representação da estrutura primária da goma xantana.  | 17 |
| Figura 5  | A: Emulsão O/A homogeneizada com biopolímeros (polissacarídeo e proteína). B: Emulsão formada por meio da técnica de deposição de multicamada. Os fios pretos representam a porção hidrofóbica da molécula de proteína, enquanto que os fios brancos representam os polissacarídeos.  | 19 |
| Figura 6  | Representação esquemática da forma de preparo das emulsões O/A.   | 32 |
| Figura 7  | IEE dos sistemas, nos dias 0, 1, 7 e 14 de análise, armazenados à temperatura constante de 25°C.  | 35 |
| Figura 8  | A: Fotografias, da esquerda para direita, dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 7; B: Fotografias, da esquerda para direita, dos sistemas 15, 16 e 18, no dia 1; C: Fotografias, da esquerda para direita, em ordem crescente, dos sistemas 3 a 5; 10 a 14; 21 a 24; 28; 30 a 35; 39, 40 e 48, no dia 0; D: Fotografias, da esquerda para direita, em ordem crescente, dos sistemas 1, 2, 6, 7, 9, 17; 25 a 27, 29, 37, 38; 41 a 47, no dia 0. | 36 |
| Figura 9  | Valor de potencial zeta dos sistemas armazenados à 25°C, nos dias 0, 1 e 7 de análise.  | 39 |
| Figura 10 | Ponto isoelétrico dos biopolímeros OV, GX e GA. (●): OV; (○): GA; (▲): GX.  | 40 |
| Figura 11 | Curvas de escoamento dos sistemas 19 (azul), 20 (vermelho) e 36 (verde).  | 41 |
| Figura 12 | Módulo elástico ( $G'$ - símbolo fechado) e módulo viscoso ( $G''$ - símbolo aberto), em função da velocidade angular, dos sistemas 19 (azul), 20 (vermelho) e 36 (verde).  | 43 |
| Figura 13 | Teste de creep recovery dos sistemas 19 (azul), 20 (vermelho) e 36 (verde).   | 44 |
| Figura 14 | Diagramas termogravimétricos do OS (a), sistema 19 (b), sistema 20 (c), sistema 36 (d), OV (e) e GA (f).  | 45 |
| Figura 15 | DTG do OS (a), sistema 19 (b), sistema 20 (c), sistema 36 (d), OV (e) e GA (f).   | 45 |
| Figura 16 | Imagens de microscopia eletrônica de varredura (aumento de 1000 vezes) dos sistemas 19, 20 e 36.  | 46 |
| Figura 17 | Representação esquemática da forma de preparo das emulsões O/A contendo $\beta$ -caroteno encapsulado na fase óleo.   | 58 |
| Figura 18 | IEE dos sistemas 1, 2 e 3 com $\beta$ -caroteno encapsulado, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à temperatura constante de 55°C. Sistema 1 (●); sistema 2 (○); sistema 3 (▲).   | 61 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 19 | Fotografias, da esquerda para direita, dos sistemas 1, 2 e 3, respectivamente, com $\beta$ -caroteno encapsulado, no dia 7, à temperatura de 25°C; (B): Fotografia do sistema 3, com $\beta$ -caroteno encapsulado, no dia 7, à temperatura de 55°C.   | 62 |
| Figura 20 | Espectro de FTIR do OS (a), sistema 1 (b), sistema 2 (c), sistema 3 (d), OV (e) e GA (f).  | 68 |
| Figura 21 | Imagem plana de AFM, do sistema 1.   | 69 |
| Figura 22 | Comportamento em decaimento exponencial da eficiência de retenção do $\beta$ -caroteno encapsulado nos sistemas 1 (●), sistema 2 (■) e sistema 3 (▲), à temperatura constante de 25°C, nas horas, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 e 72, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,92, 0,88 e 0,90, respectivamente.      | 70 |
| Figura 23 | Comportamento em decaimento exponencial da eficiência de retenção do $\beta$ -caroteno encapsulado nos sistemas 1 (●), sistema 2 (■) e sistema 3 (▲), à temperatura constante de 55°C, nas horas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,94, 0,73 e 0,87, respectivamente. | 71 |
| Figura 24 | Representação esquemática das estruturas das emulsões simples e múltiplas mais comuns. 1: emulsão simples O/A; 2: emulsão simples A/O; 3: emulsão múltipla A/O/A; 4: emulsão múltipla O/A/O. A: fase aquosa; O: fase óleo; A <sub>1</sub> : fase aquosa interna; A <sub>2</sub> : fase aquosa externa.                             | 80 |
| Figura 25 | Representação esquemática do método usualmente utilizado para elaboração de emulsão múltipla do tipo A/O/A para aplicação em encapsulamento (fase aquosa interna) de componente bioativo hidrossolúvel.  | 82 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL .....   | 1  |
| 1 OBJETIVOS .....  | 2  |
| 1.1 Objetivo Geral .....   | 2  |
| 1.2. Objetivos Específicos .....   | 2  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....  | 3  |
| 2.1 Emulsões .....   | 3  |
| 2.2 Classificação das Emulsões.....  | 3  |
| 2.2.1 Quanto a grupos e tipos .....  | 3  |
| 2.2.2 Quanto ao tamanho das gotas (macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões).....     | 4  |
| 2.2.3 Emulsão de Pickering.....  | 8  |
| 2.3 Formação de Emulsão .....  | 8  |
| 2.4 Mecanismo de Desestabilização das Emulsões.....                                      | 10 |
| 2.4.1 Floculação .....   | 11 |
| 2.4.2 Separação gravitacional (cremeação e sedimentação) .....                           | 11 |
| 2.4.3 Maturação de Ostwald.....  | 11 |
| 2.4.4 Coalescência.....  | 12 |
| 2.5 Estabilizantes.....  | 12 |
| 2.5.1 Emulsificantes .....   | 12 |
| 2.5.2 Espessantes .....  | 16 |
| 2.6 Interação entre Proteínas e Polissacarídeos em Emulsões .....                        | 18 |
| 2.7 Interações Coloidais .....   | 19 |
| 2.8 Microencapsulamento de Componentes Bioativos .....                                   | 20 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 21 |
| CAPITULO I.....  | 27 |
| FORMAÇÃO DE EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS POR OVALBUMINA, GOMA ARÁBICA E GOMA XANTANA ..... | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 30 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 31 |
| 2.1 Material .....  | 31 |
| 2.2 Métodos .....   | 31 |
| 2.2.1 Formação das emulsões O/A .....   | 31 |
| 2.2.2 Estabilidade das emulsões (teste de cremeação) .....  | 32 |
| 2.2.3 Análise de tamanho médio de partícula e de potencial zeta .....                               | 32 |
| 2.2.4 Propriedades reológicas .....   | 33 |
| 2.2.5 Análise termogravimétrica (TGA) .....   | 33 |
| 2.2.6 Observação morfológica das emulsões .....   | 33 |
| 2.2.7 Análise estatística .....   | 34 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 35 |
| 3.1 Formação das Emulsão O/A .....  | 35 |
| 3.2 Estabilidade da Emulsão .....   | 35 |
| 3.3 Tamanho Médio das Partículas (Diâmetro Hidrodinâmico) .....                                     | 37 |
| 3.4 Potencial Zeta ( $\zeta$ -Potencial) .....  | 38 |
| 3.5 Propriedades Reológicas .....   | 41 |
| 3.6 Propriedades Térmicas .....   | 44 |
| 3.7 Observação morfológica das emulsões .....   | 46 |
| 4 CONCLUSÕES .....  | 48 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 49 |
| CAPÍTULO II .....   | 52 |
| ENCAPSULAMENTO DE $\beta$ -CAROTENO EM EMULSÃO O/A ESTABILIZADA COM GOMA ARÁBICA E OVALBUMINA ..... | 52 |
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 55 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 57 |
| 2.1 Material .....  | 57 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2 Métodos.....   | 57 |
| 2.2.1 Encapsulamento de $\beta$ -caroteno em emulsões simples O/A.....                           | 57 |
| 2.2.2 Estabilidade da Emulsão .....  | 58 |
| 2.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....                    | 59 |
| 2.2.4 Observação microscópica das emulsões.....  | 59 |
| 2.2.5 Eficiência de encapsulamento (EE) e eficiência de retenção (ER) de $\beta$ -caroteno ..... | 59 |
| 2.2.6 Análise estatística.....   | 60 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 61 |
| 3.1. Estabilidade da emulsão .....   | 61 |
| 3.1.1 Índice de estabilidade da emulsão (teste de cremeação) .....                               | 61 |
| 3.1.2 Tamanho médio das partículas das emulsões armazenadas à 25°C .....                         | 62 |
| 3.1.3 Potencial zeta ( $\zeta$ -potencial) das emulsões armazenadas à 25°C .....                 | 64 |
| 3.1.4 Tamanho médio das partículas das emulsões armazenadas à 55°C .....                         | 65 |
| 3.1.5 Potencial zeta ( $\zeta$ -potencial) das emulsões armazenadas à 55°C .....                 | 66 |
| 3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....                      | 67 |
| 3.3 Observação microscópica das emulsões .....   | 68 |
| 3.4 Eficiência de encapsulamento (EE) e eficiência de retenção de $\beta$ -caroteno (ER) .....   | 69 |
| 4 CONCLUSÕES.....  | 73 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 74 |
| CAPÍTULO III .....   | 76 |
| EMULSÕES MÚLTIPLAS: FORMAÇÃO E APLICAÇÃO EM<br>MICROENCAPSULAMENTO DE COMPONENTES BIOATIVOS..... | 76 |
| 1 Introdução.....  | 79 |
| 2 Emulsões Múltiplas .....   | 81 |
| 3 Elaboração de Emulsão Múltipla .....   | 81 |
| 4 Mecanismo de Desestabilização das Emulsões Múltiplas .....                                     | 82 |
| 4.1 Maturação de Ostwald.....  | 82 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2 Coalescência.....   | 83 |
| 5 Emulsão Múltipla como Sistema Encapsulador e Transportador de Componentes Bioativos.....  | 83 |
| 5.1 Componentes bioativos .....   | 83 |
| 6 Novos Produtos com Componentes Bioativos Encapsulados .....   | 84 |
| 7 Digestão de Componentes Bioativos Microencapsulados em Sistemas Transportadores   | 85 |
| 8 CONCLUSÃO .....   | 87 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 88 |
| CONCLUSÃO GERAL .....   | 91 |
| SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....   | 92 |
| ANEXOS.....   | 93 |
| ANEXO A - Formulações de emulsões O/A com diferentes combinações e concentrações dos biopolímeros OV, GX e GA (Tabela 18).....                            | 94 |
| ANEXO B - Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas e de potencial zeta dos sistemas 1, 2, 3, 19, 20 e 36 (Tabelas 19 a 62). ..... | 95 |

## INTRODUÇÃO GERAL

Emulsões são misturas artificiais de líquidos imiscíveis, com polaridades diferentes entre si, e que por isso, são altamente susceptíveis às instabilidades como floculação, coalescência e separação de fases. Sua estabilidade depende de fatores como a estrutura molecular, a concentração e carga livre de seus componentes; a concentração salina e de íons, a temperatura e o pH do meio, bem como sua forma de preparo. Além disso, é desejável a formação de gotas dispersas de diâmetro muito pequeno, para permitir o aumento da área de contato interfacial, e, conseqüentemente facilitar a adsorção adequada do emulsificante, o qual contribuirá para a diminuição da tensão interfacial e melhor equilíbrio do sistema.

Nas últimas décadas, as emulsões têm sido largamente utilizadas por diferentes indústrias, entre as quais pode-se destacar as indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêutica. Suas principais aplicações são o encapsulamento, o transporte e a liberação controlada de vários componentes bioativos, como nutracêuticos, vitaminas, minerais, fármacos, entre outros. Por isso, vários tipos de emulsões têm sido empregados na elaboração de novos produtos, como as microemulsões, as nanoemulsões, as emulsões múltiplas e as emulsões convencionais.

Para muitas indústrias, as emulsões podem se tornar um produto de grande utilidade, com alto valor agregado, permitindo o carregamento de compostos lipofílicos em meio aquoso ou o contrário. Sua aplicação em alimentos e em outras áreas da saúde humana, aumentou a preocupação dos pesquisadores em relação aos estabilizantes utilizados em suas composições, os quais devem ser inócuos ou de baixa toxicidade, além de eficientes em relação à qualidade da monocamada produzida, que é, a princípio, imprescindível para diminuição da tensão interfacial e da estabilidade prolongada desses sistemas. Por esse motivo, biopolímeros comestíveis têm sido cada vez mais pesquisados e utilizados em emulsões. Um exemplo, é a combinação do uso de proteínas com polissacarídeos, a qual tem se mostrado eficaz em relação à estabilidade da emulsão e ao encapsulamento de componentes bioativos, por meio de dois mecanismos; 1) as proteínas, devido a sua característica anfifílica, com é o caso da ovalbumina (OV), são capazes de adsorverem na interface óleo/água (O/A) e; 2) os polissacarídeos, como a goma xantana (GX) e a goma arábica (GA) agem, respectivamente, como agentes espessantes e encapsulantes em emulsões do tipo óleo em água (O/A).

A presente dissertação está organizada em três capítulos. Inicialmente é apresentada uma revisão bibliográfica atualizada acerca de emulsões, seus tipos e características, formas de preparo e aplicações. No capítulo I são apresentados os resultados do experimento de formação, estabilidade e caracterização dos sistemas contendo diferentes concentrações e combinações dos biopolímeros OV, GA e GX. No capítulo II são apresentados os resultados da avaliação da eficiência de encapsulamento e retenção do carotenoide, assim como da estabilidade e da caracterização dos sistemas encapsulantes. No capítulo III é apresentado um artigo de revisão bibliográfica com o título: Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos, publicado no ano de 2015, na Revista Ciência Rural (ISSN 0103-8478).

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 Objetivo Geral

Formar emulsões simples O/A, utilizando como estabilizantes, os biopolímeros ovalbumina, goma arábica e goma xantana, para aplicação no encapsulamento de  $\beta$ -caroteno.

## 1.2. Objetivos Específicos

- Estudar a formação das emulsões estabilizadas com óleo de soja, ovalbumina, goma arábica e/ou goma xantana);
- Avaliar a estabilidade das emulsões estabilizadas com óleo de soja, ovalbumina, goma arábica e/ou goma xantana, em relação à separação de fases;
- Caracterizar as emulsões estáveis em relação a suas propriedades reológicas, térmicas e morfológicas;
- Encapsular  $\beta$ -caroteno nas emulsões estabilizadas com óleo de soja, ovalbumina e goma arábica;
- Avaliar a estabilidade dos sistemas com beta caroteno, a diferentes temperaturas;
- Caracterizar os sistemas encapsuladores e avaliar suas eficiências de encapsulamento e de retenção do  $\beta$ -caroteno.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Emulsões

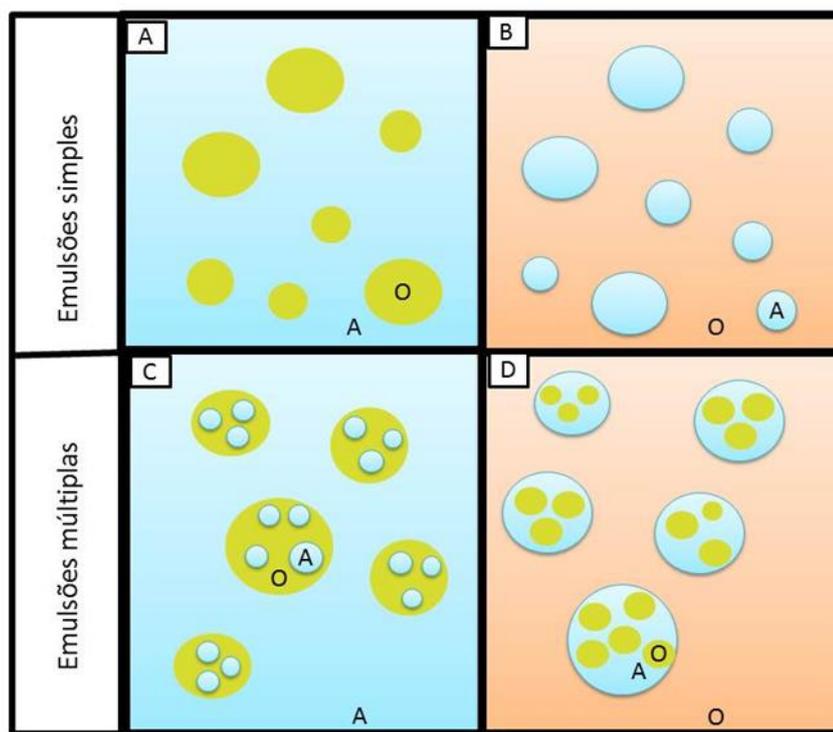
Emulsões são sistemas muito utilizados pela indústria de alimentos, e consistem de mistura, dispersão ou suspensão de dois ou mais líquidos imiscíveis, como óleo e água. Embora apresentem fase aparentemente única, esses sistemas são compostos, em geral, de uma fase dispersa, em forma de gotas esféricas e pequenas e uma fase contínua (HILL, 1996; WALSTRA; VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011; LAM; NICKERSON, 2013). São naturalmente instáveis (metaestáveis) devido a diferença entre a densidade específica entre os componentes da fase dispersa (óleo) e os da fase contínua (água), no caso de emulsão O/A. Entretanto, quanto menor o tamanho das gotas dispersas e maior a densidade e a viscosidade da fase aquosa, maior e melhor será a estabilidade desse tipo de emulsão (SAMAVATI et al., 2011; MCCLEMENTS, 2011).

### 2.2 Classificação das Emulsões

#### 2.2.1 Quanto a grupos e tipos

Há dois grupos de emulsão, chamados de emulsões simples e múltiplas. Seus tipos são definidos conforme a distribuição relativa das diferentes fases que compõem o sistema. Em alimentos, sistemas simples formados por gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa, são chamados emulsões O/A, tendo, como exemplo, o leite, o iogurte, os cremes, os molhos para saladas, a maionese, o sorvete e as sopas. Menos frequentemente, sistemas simples formados por gotas de água dispersas em uma fase óleo, são chamados emulsões A/O, tendo, como exemplo, a margarina e a manteiga.

As emulsões múltiplas possuem estrutura mais complexa, em comparação às emulsões simples. Os tipos mais comuns são O/A/O, A/O/A e O/A/A. Por exemplo, emulsões A/O/A são compostas de gotas de água dispersas em gotas de óleo, sendo que estas últimas são dispersas, ainda, em uma fase aquosa, chamada de fase externa (BOUYER et al., 2012). Esse grupo de sistema é frequentemente formado em nano e microemulsões, o qual tem tido aplicações importantes, como no encapsulamento e veiculação de fármacos, nutracêuticos, corantes e outros compostos bioativos lipofílicos, por exemplo, o  $\beta$ -caroteno. (HILL, 1996; PERRECHIL, 2008; WALSTRA; VAN VLIET, 2010; BOUYER et al., 2012; LAM; NICKERSON, 2013). A Figura 1 representa esquematicamente os grupos e alguns tipos de emulsão.



**Figura 1** Representação esquemática de emulsões. **A:** O/A, **B:** A/O, **C:** A/O/A e **D:** O/A/O.  
Fonte: BOUYER et al., 2012.

## 2.2.2 Quanto ao tamanho das gotas (macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões)

### 2.2.2.1 Macroemulsões ou emulsões convencionais

São sistemas com gotas de diâmetro entre 0,1  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ . Tamanhos de gotas dentro dessa faixa, permitem intensa dispersão de luz, fazendo com que o sistema adquira cor branca. Isso se deve às dimensões similares entre as gotas dispersas e o comprimento de onda da luz ( $r \approx \lambda$ ) (MCCLEMENTS, 2011; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012). São sistemas termodinamicamente instáveis, devido sua alta energia livre, ou seja, apresentam alta tensão interfacial entre as fases contínua e a dispersa.

### 2.2.2.2 Microemulsões

Microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis (MCCLEMENTS, 2011; RAO; MCCLEMENTS, 2012; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012). Devido ao tamanho pequeno das gotas, e estas ainda serem menores que o comprimento de onda da luz ( $r \ll \lambda$ ), dispersam pouca luz, e em geral, o sistema apresenta-se transparente e com baixa viscosidade (FRIBERG; VENABLE, 1983). A energia livre de uma microemulsão é menor do que a energia dos componentes de cada uma das fases que compõem o sistema, e por isso, tendem a se formar espontaneamente. São estabilizadas por surfactantes, e frequentemente também contêm em sua composição, um co-surfactante. (MCCLEMENTS, 2011; SAMAVATI et al., 2011). Sua estabilidade se deve à baixa tensão interfacial do sistema e ao diâmetro reduzido das gotas, que pode variar de 100 Å a 100 nm (CAPEK, 2004; SOLANS et al., 2005). Uma microemulsão pode se transformar em nanoemulsão, em macroemulsão, em sistema líquido cristalino ou até mesmo em sistema de fase separada, caso o meio a favoreça. Porém, se o sistema retornar à condição original, ele pode tornar-se novamente uma

microemulsão, a uma taxa dependente de sua energia cinética. Microemulsões são frequentemente distinguidas de nanoemulsões com base na forma das gotas, as quais podem apresentar-se esféricas, elipsóides ou em forma de serpentinhas, dependendo da geometria molecular apresentada pelo emulsificante utilizado. Em nanoemulsões, por exemplo, as gotas tendem a constituir-se de tamanho pequeno e de forma esférica. A tensão interfacial alta, em relação às da microemulsões, favorece a minimização da área interfacial óleo-água. (MCCLEMENTS, 2011; SAMAVATI et al., 2011).

### 2.2.2.3 Nanoemulsões

Ao contrário das microemulsões, nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis (MCCLEMENTS, 2011; RAO; MCCLEMENTS, 2012;). Como já mencionado, esse tipo de sistema permite a formação de emulsões múltiplas (A/O/A ou O/A/O, por exemplo), o que torna sua aplicação vantajosa para a indústria de alimentos e farmacêutica (LAM; NICKERSON, 2013). Apesar de apresentam gotas dispersas muito pequenas, esses sistemas tendem, ao longo do tempo, a se desestabilizar, apresentando formas de instabilidade, como, por exemplo, separação gravitacional (cremeação ou sedimentação, dependendo do tipo de emulsão), agregação, coalescência e maturação de Ostwald. A taxa pela qual esses processos ocorrem em nanoemulsões é menor daquela ocorrida em emulsões convencionais, devido o tamanho menor das gotas e do efeito de suas curvaturas. Por isso, quando comparadas às emulsões convencionais, nanoemulsões são mais resistentes às formas de instabilidade acima descritas, embora alta cinética de maturação seja uma de suas principais características, o que as tornam menos estáveis à maturação de Ostwald ou à difusão molecular (LEE; MCCLEMENTS, 2010; MCCLEMENTS, 2011; QIAN et al., 2011; LAM; NICKERSON, 2013). O tamanho pequeno das gotas comparado ao comprimento de onda da luz ( $r \ll \lambda$ ) faz das nanoemulsões sistemas potencialmente transparentes, o que, sem dúvidas, permite aplicações importantes em alimentos, como a incorporação e o transporte de componentes bioativos-lipofílicos em produtos transparentes à base de água (alimentos e bebidas). Porém, nanoemulsões tendem a ser levemente turvas ou opacas, se o diâmetro das gotas aproximarem-se de 80 nm, ainda que o pequeno tamanho das gotas proporcione ao sistema, melhor estabilidade contra a separação gravitacional e agregação, quando comparadas às macroemulsões (SOLANS et al., 2005; MASON et al., 2006; LEE; MCCLEMENTS, 2010; MCCLEMENTS, 2011; QIAN et al., 2011; GALINDO-ALVAREZ et al., 2011). No entanto, gotas com diâmetro acima de 80 nm, tornam o sistema branco, devido a significativa dispersão múltipla (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008; MCCLEMENTS, 2011). Da Tabela 1 constam comparações entre algumas propriedades encontradas em macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões O/A.

**Tabela 1** Comparações entre algumas propriedades encontradas em macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões O/A.

| Tipo de Emulsão | Estabilidade | Razão entre superfície e massa ( $m^2 g^{-1}$ ) | Aparência   |
|-----------------|--------------|---|-------------|
| Macroemulsão    | Metaestável  | 0,07 a 70                                       | Turvo/Opaco |
| Nanoemulsão     | Metaestável  | 70 a 330  | Claro/Turvo |
| Microemulsão    | Estável      | 130 a 1300                                      | Claro       |

Fonte: Adaptado de MCCLEMENTS, 2011.

Em geral, a qualidade e, conseqüentemente, a estabilidade de uma emulsão é dependente de alguns fatores, como a tensão interfacial ( $\gamma$ ), a característica do filme adsorvido na interface, a carga elétrica das gotas, o tamanho e a razão entre superfície e volume das

gotas, a razão entre o peso e o volume das fases dispersa e contínua, bem como a viscosidade do sistema (HILL, 1996).

A estabilidade cinética de uma nanoemulsão, por exemplo, pode ser melhorada pela seleção adequada dos componentes das fases óleo e aquosa, da distribuição do tamanho das gotas, ou ainda, pela incorporação de substâncias conhecidas como estabilizantes, tais como, emulsificantes, espessantes ou retardantes de maturação. Estabilizantes com potencial de utilização em nanoemulsões comestíveis, são mostrados na Tabela 2 (MCCLEMENTS, 2011).

**Tabela 2** Estabilizantes com potencial de utilização em nanoemulsões comestíveis.

| Estabilizante            | Função   | Exemplos   |
|--------------------------|--|--|
| Emulsificante            | Substâncias ativas de superfícies que adsorvem na interface óleo-água e formam filme em torno da gota, as quais previnem a agregação.              | Surfactante de baixo peso molecular, como Tweens, Spans, fosfolípídeos (lecitina do ovo, de soja e do leite), proteínas anfifílicas (proteína isolada do soro do leite, caseinato); polissacarídeos anfifílicos (goma arábica, goma modificada). |
| Espessantes              | Substâncias que aumentam a viscosidade da fase aquosa. São utilizadas para fornecer texturas desejáveis ou para impedir a separação gravitacional. | Açúcares (sacarose); polióis (glicerol, sorbitol), polissacarídeos (xantana, pectina, carragenana, alginato) e proteínas (gelatina, proteína isolada do soro do leite).  |
| Ajustadores de Densidade | Substâncias que são adicionadas às gotas de óleo para combinar sua densidade com a da fase aquosa.   | Material lipofílico denso (Gomas esterificadas).   |
| Retardantes de maturação | Substâncias altamente hidrofóbicas que previnem ou retardam a maturação de Ostwald, quando incorporadas nas gotas.                                 | Materiais lipofílicos com baixa solubilidade em água (triacilgliceróis de cadeia longa, gomas esterificadas).  |

Fonte: Adaptado de MCCLEMENTS, 2011.

O tamanho das gotas de uma nanoemulsão é importante devido esse parâmetro influenciar as características ópticas, reológicas, de estabilidade e de liberação de seu conteúdo, quando for o caso (WALSTRA; VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011). A distribuição do tamanho das gotas é fator importante para a estabilidade física da emulsão, uma vez que gotas menores costumam favorecer a formação de emulsões mais estáveis. Em nanoemulsões, a maturação de Ostwald ou difusão molecular é a forma de instabilidade mais dominante. A maturação de Ostwald consiste em difusão espontânea da fase dispersa, transformando gotas menores em outras maiores. Quando um emulsificante é também eficiente estabilizante, este contribui para a diminuição do diâmetro das gotas, para valores abaixo de 100 nm. Entretanto, sua capacidade para retardar a maturação de Ostwald, torna-se limitada. A prevenção dessa instabilidade, geralmente é alcançada pela adição de um terceiro componente (soluto) na fase dispersa, o qual deve ser totalmente insolúvel na fase aquosa, a fim de promover uma pressão osmótica suficiente para compensar o raio de curvatura das gotas. Uma estratégia para retardar o aumento do tamanho das gotas de óleo, por meio da maturação de Ostwald, é revesti-las com filme de espessura viscoelástica (GALINDO-ALVAREZ et al., 2011). Além da instabilidade termodinâmica, emulsões também se desestabilizam na presença de biopolímeros competidores ou devido à mudança na conformação da proteína-emulsificante, durante o processo de maturação. Adicionando-se uma proteína na interface óleo-água, dependendo de sua estrutura e conformação, grupos amino polares e apolares podem ser dissolvidos em cada uma das fases, apesar de, em alguns casos, isto ser desfavorável. Proteínas também se reorientam e se realinham a fim de

minimizar as interações termodinamicamente desfavoráveis, resultando na diminuição da tensão interfacial (BOS; VAN VLIET, 2001). Por conterem muitos grupos ionizáveis, as proteínas, quando adsorvidas, alteram as características elétricas de uma interface-óleo. Esses grupos ionizáveis podem conter ácidos ( $\text{COOH}$ ,  $\text{COO}^-$ , ou  $\text{H}^+$ ) ou bases ( $\text{NH}_2$  ou  $\text{NH}_3^+$ ), os quais são carregados positiva ou negativamente, dependendo do pH e da força iônica do solvente (LAM; NICKERSON, 2013). Em pH isoelétrico, a carga é neutra, o que facilita a agregação da proteína (FOEGEDING; DAVIS, 2011). A magnitude da carga dos grupos ionizáveis da proteína afeta a estabilidade e as propriedades físico-químicas das gotas de óleo revestidas por filmes de proteína. Quando a interface é altamente carregada, a estabilidade da emulsão é melhorada devido a repulsão eletrostática que passa a existir entre as gotas (GUZEY; MCCLEMENTS, 2007). Superfícies carregadas podem atrair várias moléculas, tais como íons, antioxidantes e aromas, os quais podem neutralizar a carga superficial. Quando a carga interfacial é neutralizada por moléculas ionizáveis, a estabilidade da emulsão é, então, reduzida, tendendo à floculação (FOEGEDING; DAVIS, 2011). Interfaces carregadas podem ligar-se a íons divalentes, e dessa forma desestabilizar a emulsão através de ligações cruzadas entre proteínas e diferentes gotas de óleo, levando à agregação. A composição da interface influencia a qualidade e o tempo de adsorção de proteínas. Quando proteínas adsorvem nas gotas, elas frequentemente sofrem mudanças conformacionais em suas estruturas, e assim, reduzem a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis. Essas mudanças são dependentes da estrutura das proteínas e das condições do solvente. Exemplos disso são as aberturas de estruturas espirais da  $\beta$ -caseína e da gelatina, alteração da estrutura globular da  $\beta$ -lactoglobulina, ou até mesmo, menores mudanças devido a restrições físicas, como é o caso da ovalbumina. Tem sido reportado que a  $\beta$ -lactoglobulina é capaz de formar filme viscoelástico na interface óleo-água, o qual é estável mesmo após tratamento de homogeneização sob alta pressão. Proteínas quando em altas concentrações, adsorvem a altas taxas, e por isso, podem apresentar pouca ou nenhuma mudança em suas conformações, até que sua saturação na interface produza uma camada espessa. Em condições extremas de pH, proteínas tendem a alterar suas conformações ou a dissociarem-se, e dessa forma, expõem mais seus centros hidrofóbicos, permitindo melhor aderência na interface.

A principal aplicação de nanoemulsões pelas indústrias de alimentos e de bebidas é o transporte, em produtos transparentes ou ligeiramente turvos, de componentes funcionais lipofílicos, tais como, aromas, corantes, antioxidantes, conservadores, vitaminas lipossolúveis, fármacos e ingredientes nutracêuticos apolares (LEE; MCCLEMENTS, 2010; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012; MCCLEMENTS, 2011). Também, as emulsões podem amenizar odores e sabores desagradáveis (BOUYER, 2012). Da Tabela 3, constam algumas aplicações de nanoemulsões para a indústria de alimentos (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006). Com o mesmo conteúdo da fase óleo das emulsões convencionais, as nanoemulsões podem exibir diferentes propriedades reológicas, devido ao tamanho muito pequeno das gotas que compõem esse sistema (MCCLEMENTS, 2011). A utilização de nutracêuticos lipofílicos (como os carotenoides) em alimentos, é atualmente limitada, devido sua baixa solubilidade em água, seu alto ponto de fusão, sua instabilidade química e, conseqüentemente, sua baixa biodisponibilidade. Por ser sistemas compostos por gotas muito pequenas, e por isso apresentarem alta razão entre superfície e volume, as nanoemulsões aumentam a biodisponibilidade desses componentes, quando encapsulados, despertando, dessa forma, grande interesse das indústrias de alimentos e de bebidas. Os componentes lipofílicos são incorporados na fase óleo, antes da formação da emulsão O/A, por meio da homogeneização (LEE; MCCLEMENTS, 2010; QIAN et al., 2011).

**Tabela 3** Aplicações de nanoemulsões na indústria de alimentos.

| Produto                            | Característica  |
|------------------------------------|---|
| Bebida funcional                   | Águas aromatizadas, leite com vitaminas, minerais e outros ingredientes funcionais, utilizando-se da tecnologia de nanoemulsão para incorporação e liberação controlada de bioativos. |
| Bebidas e alimentos personalizados | Nanoemulsões que liberam diferentes aromas por meio da ativação com calor, frequência ultrassônica, pH ou outros ativadores.  |
| Sanitizantes                       | Nanoemulsão de óleo vegetal; emulsificantes cobertos por quantidade traço de álcool; suspensos em água, para obtenção de atividade antimicrobiana.                                    |

Fonte: Adaptado de SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006.

### 2.2.3 Emulsão de Pickering

Emulsões de Pickering são emulsões de qualquer grupo e tipo, estabilizadas por partículas sólidas, ao invés de emulsificantes ou surfactantes. A estabilização por partículas sólidas, promove propriedades específicas para essas emulsões, como a alta resistência à coalescência. As partículas utilizadas nas emulsões de Pickering são necessariamente menores que as gotas dispersas no sistema. Partículas sólidas, orgânicas ou inorgânicas, de tamanho nanométrico (~100 nm) permitem a estabilização de gotas com poucos micrômetros de diâmetro, embora gotas maiores também possam ser estabilizadas por essas partículas. A estabilização é garantida pela adsorção irreversível dessas partículas na interface, e a criação de uma barreira física espessa (BINKS, 2002; AVEYARD; BINKS; CLINT, 2003). Por isso, as emulsões de Pickering demonstram estabilidade por longo período de tempo (YUSOFF; MURRAY, 2001; SUBRAMANIAM; ABKARIAN; STONE, 2005; FRELICHOWSKA et al., 2009). Grânulos de amido se mostraram adequados para estabilização dessas emulsões, após melhora de sua capacidade de umectação ou de molhabilidade (RAYNER et al., 2012). Emulsões estabilizadas por grânulos de amido de quinoa, permaneceram estáveis em relação à separação de fases e ao aumento do tamanho das gotas, por um período superior a dois anos (TIMGREN et al., 2013). As propriedades físico-químicas do amido permitem a formação de uma barreira protetora em torno da gota, quando aplicado tratamento térmico específico, suficiente apenas para gelatinizar parcialmente as partículas adsorvidas na interface óleo-água (TIMGREN et al., 2011).

### 2.3 Formação de Emulsão

A formação de emulsão tem por objetivo misturar e homogeneizar componentes líquidos imiscíveis. Para tanto, faz-se necessária a utilização de emulsificante, o qual contenha componentes hidrofóbicos e hidrofílicos em sua molécula (característica anfifílica). Isto permite integrá-lo à interface óleo-água ou água-óleo (formação de monocamada), diminuindo a tensão interfacial, e conseqüentemente, contribuindo para estabilização do sistema. Devido a esse processo, o resultado é um sistema de fase aparentemente única, porém, composto de duas fases; a fase dispersa, composta por gotas do componente de menor proporção; e a fase contínua, composta pelo componente de maior proporção. O método comumente utilizado para formação de emulsões é a agitação mecânica, por fornecer energia suficiente para a criação de gotas pequenas (LAM; NICKERSON, 2013).

Emulsões compostas por gotas pequenas podem ser produzidas por meio de uma variedade de métodos, os quais são classificados como de alta energia e de baixa energia. Nos métodos de alta energia, utiliza-se dispositivos capazes de gerar intensa força disruptiva, que misturam e rompem as fases imiscíveis, óleo e água, por exemplo, levando a formação de

gotas dispersas, extremamente pequenas. São exemplos desses métodos, a homogeneização sob alta pressão, a microfluidização e a sonicação. Já nos processos de baixa energia, há dependência da formação espontânea dessas gotas, em um sistema misturador de fases óleo-água-emulsificante, sob condições controladas (ambientais e da solução, como, por exemplo, temperatura ou composição química). Como mencionado anteriormente, para produção de emulsão com gotas pequenas, normalmente é aplicada energia mecânica, para então, gerar um fluxo turbulento. A utilização de homogeneizadores de alta pressão é, atualmente, o método mais comum, utilizado pela indústria de alimentos, para produção das chamadas emulsões finas. Esses equipamentos forçam uma mistura grosseira de fase óleo e aquosa através de uma válvula, a qual, sob alta pressão, injeta esta mistura em uma abertura estreita. A combinação de fluxo turbulento (presente no compartimento da válvula) com fluxo laminar, sob baixa pressão, rompe as gotas, resultando em tamanhos menores das gotas formadas (HILL, 1996; LEE; MCCLEMENTS, 2010; MCCLEMENTS, 2011; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012).

O processo de homogeneização pode ser dividido em três etapas: pré-homogeneização, homogeneização e pós-homogeneização.

A pré-homogeneização basicamente envolve dispersão, mistura e dissolução de vários ingredientes na fase em que são mais solúveis. Ingredientes lipossolúveis, como vitaminas, flavorizantes, corantes, antioxidantes e surfactantes, são misturados na fase óleo, enquanto que ingredientes hidrossolúveis, como vitaminas, flavorizantes, proteínas, polissacarídeos, açúcares, sais, corantes, antioxidantes e surfactantes são misturados na fase aquosa. A intensidade e a duração do processo de mistura dependem do tempo requerido para dissolver e distribuir uniformemente os vários ingredientes. A dissolução adequada é importante para ação ótima de vários ingredientes funcionais, principalmente de biopolímeros.

A homogeneização envolve a conversão de duas fases imiscíveis (geralmente óleo e água) em uma emulsão, utilizando-se de dispositivo mecânico conhecido como homogeneizador. O processo de homogeneização pode ser dividido em dois tipos, dependendo da natureza do material utilizado inicialmente. A formação de emulsão diretamente de dois líquidos separados pode ser chamada de homogeneização primária, como, por exemplo, a mistura de óleo e vinagre para elaboração de molho para salada, enquanto que a redução do tamanho das gotas de uma emulsão já existente, pode ser chamada de homogeneização secundária, como, por exemplo, redução dos glóbulos de gordura do leite cru. Para a formação de uma emulsão, pode-se, no entanto, realizar homogeneização primária, secundária ou ambas. Uma vez formada a emulsão pelo processo de homogeneização, ela pode ser submetida a vários outros processos.

A mais comum operação unitária pós-homogeneização envolve tratamentos térmicos, tais como: pasteurização, esterilização, cozimento, resfriamento e congelamento. O tratamento térmico tem como objetivos principais: melhorar a segurança e a qualidade do produto (inativação de enzimas e redução da microbiota), a longo prazo. Por outro lado, o tratamento térmico pelo calor, dependendo de sua intensidade e tempo de aplicação, pode ocasionar mudanças físico-químicas do sistema, como, por exemplo, desnaturação térmica das proteínas, alteração da estrutura química de biopolímeros, inversão de fase de surfactantes e cristalização ou fusão de gorduras. Outra operação unitária comum pós-homogeneização é a desidratação (*freeze-drying, spray drying ou roller drying*), pela qual se converte uma emulsão líquida em pó (MCCLEMENTS, 2009).

Misturadores de alta velocidade equipados com defletores adequados, também podem produzir gotas pequenas, porém, de diâmetro entre 5  $\mu\text{m}$  e 10 $\mu\text{m}$ . Homogeneizadores ultrassônicos são mais utilizados em estudos laboratoriais, e eles induzem a cavitação, ou seja, formação de bolhas ou cavidades em um líquido submetido a mudanças bruscas de pressão, produzindo, dessa forma, emulsões com gotas menores que 1  $\mu\text{m}$ . A aplicação desse método é vantajosa apenas para pequenas amostras (HILL, 1996; MCCLEMENTS, 2011; LEE; MCCLEMENTS, 2010; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012). O tamanho mínimo das gotas que pode ser produzido, depende de vários fatores, como o método escolhido (de alta ou de baixa energia), do tipo de homogeneizador, das condições de operação do equipamento (como a intensidade da energia aplicada, tempo e temperatura), composição da amostra (tipo de óleo, tipo de emulsificante e suas concentrações relativas), propriedades físico-químicas da amostra, e componentes das fases (HILL, 1996). Na Tabela 4 é apresentada comparação entre diferentes tipos de homogeneizadores utilizados para elaboração de emulsões.

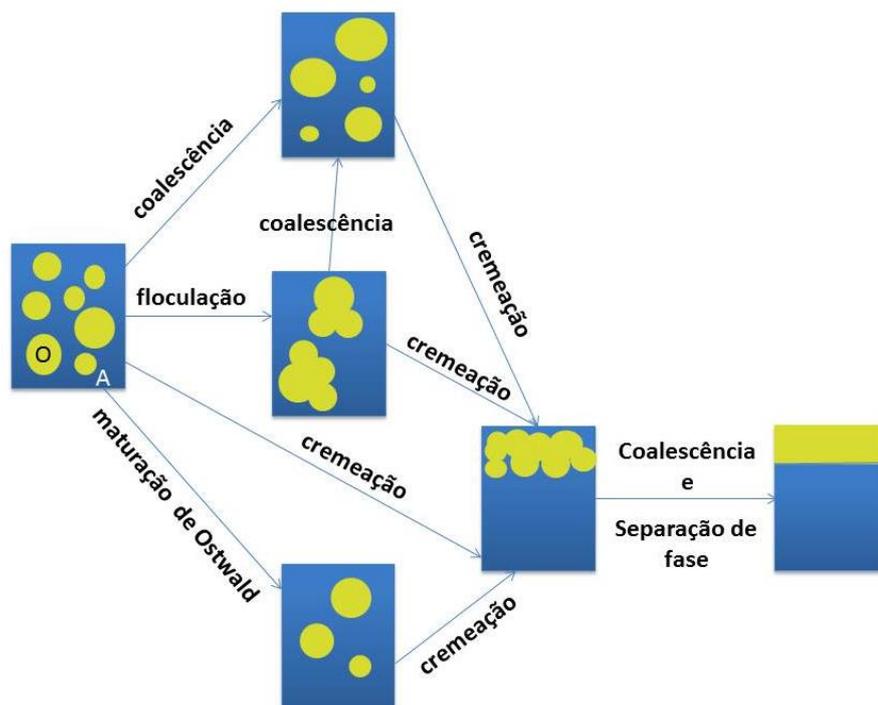
**Tabela 4** Características de homogeneizadores utilizados para elaboração de emulsões.

| Tipo de Homogeneizador               | Rendimento           | Densidade energética | Eficiência energética relativa | Diâmetro mínimo da gota | Viscosidade da amostra |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Misturador de alta velocidade        | Batelada ou contínuo | Baixa-alta           | Baixa                          | ~ 2 $\mu\text{m}$       | Baixa-média            |
| <i>Colloid mill</i>                  | Contínuo             | Baixa-alta           | Média                          | ~ 1 $\mu\text{m}$       | Média-alta             |
| Homogeneizador de alta pressão       | Contínuo             | Média-alta           | Alta                           | ~ 0.1 $\mu\text{m}$     | Baixa-média            |
| Microfluidizador                     | Contínuo             | Média-alta           | Alta                           | < 0.1 $\mu\text{m}$     | Baixa-média            |
| Sonda ultrassônica                   | Batelada ou contínuo | Média-alta           | Baixa                          | ~ 0.1 $\mu\text{m}$     | Baixa-média            |
| Homogeneizador ultrassom- <i>jet</i> | Contínuo             | Média-alta           | Alta                           | ~ 1 $\mu\text{m}$       | Baixa-média            |
| Processador por membrana             | Batelada ou contínuo | Baixa-média          | Muito alta                     | ~ 0.3 $\mu\text{m}$     | Baixa-média            |

Fonte: MCCLEMENTS, 2009.

## 2.4 Mecanismo de Desestabilização das Emulsões

Durante o processo de emulsificação, a área interfacial é consideravelmente aumentada, se comparada com a mesma, antes do processo de dispersão. Segundo a lei da termodinâmica, todos os sistemas tendem a reestabelecer seus estados iniciais de energia mínima. Então, para que seja minimizada a área de contato interfacial e a energia livre do sistema, as emulsões, se não estabilizadas, separam de fases. As instabilidades que ocorrem nos sistemas O/A são: floculação, coalescência, maturação de Ostwald, separação gravitacional (cremeação ou sedimentação) e separação de fases. A floculação e a coalescência são os principais mecanismos de desestabilização. A Figura 2 representa esquematicamente, os principais tipos de instabilidade em emulsões O/A (WALSTRA; VAN VLIET, 2010; BOUYER et al., 2012).



**Figura 2** Principais tipos de instabilidades em emulsões O/A. O: óleo; A: água. Fonte: BOUYER et al., 2012.

### 2.4.1 Floculação

Com a prevalência de forças atrativas entre as gotas dispersas no sistema, há formação de agregados de gotas, chamados de flocos, a partir do conteúdo dessa fase, sem que ocorra destruição das gotas. É resultante da adsorção instantânea de uma molécula simples de biopolímero em superfícies de gotas diferentes, agindo como um ligador polimérico. Portanto, é comum em emulsões estabilizadas por biopolímeros. É reversível e antecede o processo de coalescência (GUZEY; MCCLEMENTS, 2006).

### 2.4.2 Separação gravitacional (cremeação e sedimentação)

A separação gravitacional é um processo reversível, que resulta em dois tipos de instabilidade: a cremeação ou formação de nata, em emulsões O/A, e a sedimentação, em emulsões A/O. A cremeação caracteriza-se pela migração das gotas dispersas para o topo do sistema. Ao contrário, na sedimentação, as gotas migram para o fundo. Portanto, a ocorrência desses eventos depende da densidade relativa das duas fases que compõem o sistema. É uma das formas mais comuns de instabilidade em macroemulsões (HILL, 1996; MCCLEMENTS, 2011; BOUYER et al., 2012).

### 2.4.3 Maturação de Ostwald

Maturação de Ostwald é um processo no qual ocorre difusão das gotas da fase dispersa para a fase contínua, sem que haja contato entre as gotas. Neste caso, as gotas aumentam de tamanho. É um processo irreversível e depende da solubilidade dos constituintes da fase dispersa em relação aos da fase contínua. Portanto, é incomum sua ocorrência em emulsões O/A preparadas com óleos apolares (baixa solubilidade em água), constituídos por triacilgliceróis de cadeia longa, como, óleo de milho, de soja, de girassol e de peixe. Ao contrário, a maturação de Ostwald pode ocorrer rapidamente, se utilizado no preparo das

emulsões, óleos polares, como triacilgliceróis de cadeia curta, óleos aromáticos e óleos essenciais (DAMODARAN, 2005; WALSTRA; VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011).

#### **2.4.4 Coalescência**

A coalescência é um processo irreversível, e ao contrário da maturação de Ostwald, é caracterizada pelo aumento das gotas dispersas, quando suas paredes são destruídas. A coalescência parcial ocorre quando parte do óleo das gotas cristaliza-se, formando-se uma rede de cristais que não coalesce completamente. Portanto, a ruptura do filme entre gotas muito próximas pode ser desencadeada por um cristal que se projeta da superfície de uma gota, o qual penetra no filme de outra. Durante fluxo ou agitação, esse processo pode ocorrer a uma velocidade seis ordens de grandeza maior que a da chamada verdadeira coalescência (WALSTRA; VAN VLIET, 2010).

### **2.5 Estabilizantes**

Os estabilizantes, dependendo de seus modos de ação, são divididos em duas categorias: emulsificantes e espessantes.

#### **2.5.1 Emulsificantes**

Emulsificantes, também chamados de surfactantes ou tensoativos são substâncias ativas de interface, capazes de adsorverem em uma interface óleo-água, formando um filme viscoelástico em torno da gota. Esse filme protege as gotas dispersas, e pode retardar por um período de tempo prolongado, processos de desestabilização, como a floculação e/ou a coalescência (MCCLEMENTS, 2009; WALSTRA; VAN VLIET, 2010; BOUYER et al., 2012; LAM; NICKERSON, 2013). Podem encontrar-se na forma de moléculas sintéticas de baixo peso molecular, como, por exemplo, monoacilgliceróis, ésteres de sacarose, ésteres de poliglicerol, ou moléculas naturais, como a lecitina de soja e do ovo; ou serem constituídos de macromoléculas, como as proteínas. Os emulsificantes mais comumente usados na indústria de alimentos são os surfactantes de baixo peso molecular, fosfolipídeos, biopolímeros anfífilicos (proteínas e polissacarídeos), e partículas ativas de superfície, como grânulos de amido ou sementes (como a da mostarda) (MCCLEMENTS, 2009).

Os emulsificantes são classificados em quatro categorias: íons não-surfactantes, sólidos coloidais não-surfactantes, surfactantes monoméricos clássicos e polímeros (BOUYER et al., 2012).

- Os íons não-surfactantes adsorvem na interface das gotas, sem no entanto, afetarem a tensão interfacial ou facilitando o processo de emulsificação do sistema. Porém, sob condições apropriadas, promovem uma leve barreira eletrostática entre as gotas, contribuindo, dessa forma, para a estabilidade da emulsão.

- Os sólidos coloidais não-surfactantes, possuem baixo peso molecular, como partículas/grânulos de baixo peso molecular, como de sílica, argila, amido e sementes. São utilizados em emulsões de Pickering, os quais adsorvem na superfície das gotas, formando uma barreira física entre elas, e conseqüentemente, retardando e ou prevenindo a coalescência (Figura 2), em grau maior que as barreiras promovidas por surfactantes monoméricos ou por polímeros (BOUYER et al., 2012).

- Os surfactantes monoméricos clássicos possuem importante característica, que é o Balanço Hidrofílico-Lipofílico (BHL). Os valores de BHL deles variam de 1 a 40, e valor 7 indica que a substância tem a mesma solubilidade, tanto em água, quanto em óleo. Valores menores que 7 indicam maior solubilidade em óleo, e valores maiores que 7 indicam maior solubilidade em água (WALSTRA; VAN VLIET, 2010). Eles diminuem a tensão interfacial e aumentam a estabilidade da emulsão, mas podem ser potencialmente tóxicos em alimentos. É sabido que durante o processo de emulsificação, a cinética de adsorção de uma molécula anfifílica é influenciada pelo seu peso molecular. Por isso, surfactantes monoméricos de baixo peso molecular, adsorvem na interface muito rapidamente, contribuindo dessa forma para produção de gotas pequenas. Esses surfactantes, como o polissorbato 20 (Tween 20) e o dodecil sulfato de sódio (SDS), são mais efetivos para produção de gotas pequenas em nanoemulsões, do que o caseinato e a  $\beta$ -lactoglobulina, sob condições similares de homogeneização (QIAN; MCCLEMENTS, 2011).

- Os polímeros apresentam baixa atividade sobre a tensão interfacial, porém, apresentam grau alimentício e promovem interações estéricas e eletrostáticas entre as gotas do sistema, prevenindo a floculação e a coalescência (Figura 2). Ainda, modificam a viscosidade/elasticidade da fase contínua, o que os tornam eficientes estabilizantes. Biopolímeros (proteínas e polissacarídeos) pertencem a essa classe. Géis de biopolímeros e de polissacarídeos espessantes que não adsorvem nas superfícies das gotas (chamados de não adsorventes), interagem entre si, aumentando a viscosidade da fase contínua. Com isso, aumentam a estabilidade física do sistema, por reduzirem os movimentos das gotas que o compõem. A estabilidade da emulsão por biopolímero, depende de vários parâmetros, tais como, natureza e concentração desses compostos, pH, força iônica, entre outros parâmetros inerentes ao sistema formado. A maioria dos biopolímeros são solúveis em água, e, portanto, são mais utilizados na formação de emulsões O/A (BOUYER et al., 2012). Seguem abaixo, as principais características de biopolímeros utilizados em emulsões alimentícias.

- **Proteínas**

As proteínas comumente utilizadas pela indústria de alimentos, devido a suas características emulsificantes, são: as proteínas isoladas do soro do leite, proteínas da soja, a ovalbumina e albumina sérica bovina.

- **Ovalbumina (OV)**

A clara do ovo de galinha é constituída majoritariamente de proteínas, as quais contribuem com 59% do peso total do ovo. As proteínas que compõem a clara do ovo são: ovalbumina, conalbumina, ovomucóide, lisozima, ovomucina, avidina, ovoglobulina, entre outras. A principal proteína presente na clara é a ovalbumina, a qual constitui 65% do total das proteínas nela presentes (BOBBIO, P. A; BOBBIO, F. O., 2001). É uma fosfoglicoprotéina de peso molecular entre 42 e 45 kilodaltons (kDa). Possui cadeia polipeptídica composta por 385 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico (pI) aproximado de 4,6. Apresenta alto teor de estrutura secundária (35%  $\alpha$ -hélix e 45% folhas *beta*) e conformação globular, devido a posição em dobra de seus resíduos de aminoácidos. Seu núcleo é rico em resíduos hidrofóbicos (44,7%), os quais são raros na superfície da proteína, característica essa, peculiar das proteínas globulares. Como as demais proteínas da clara do ovo, são muito utilizadas no processamento de alimentos, devido a suas propriedades emulsificante e estabilizante de espumas. Sua estrutura globular permite elaboração de

sistemas transportadores à base de biopolímeros (NIU et al., 2014; MCCLEMENTS, 2014; (YOU et al., 2015).

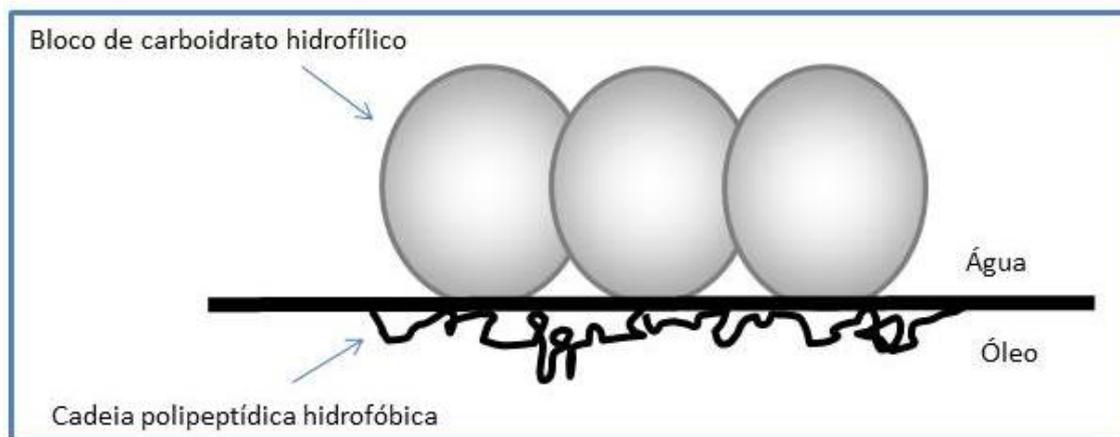
O particular interesse na utilização de proteínas como emulsificante, deve-se a sua natureza anfifílica, ou seja, possuem em suas estruturas moleculares, aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, além da característica de formarem filmes de qualidade (monocamada). Diferentemente de emulsificantes de baixo peso molecular, que difundem-se rapidamente para interface, as proteínas são mais volumosas e, por isso, difundem-se a uma taxa mais lenta. Uma vez na interface, algum nível de desnaturação parcial é necessário para expor seus aminoácidos hidrofóbicos na superfície. Ainda, as proteínas ligam-se entre si, posicionando seus aminoácidos hidrofóbicos na fase óleo e os aminoácidos hidrofílicos, na fase aquosa. Por isso, a capacidade emulsificante das proteínas, ou seja, a quantidade de gramas de óleo por grama de proteína, antes que ocorra a inversão de fase, tende a ser menor, quando comparada com quantidades necessárias de moléculas surfactantes de baixo peso molecular, para o mesmo resultado. Uma vez na interface, fortes filmes viscoelásticos são formados, os quais, além de resistirem ao estresse mecânico, promovem, estabilidade eletrostática (dependente da condição do solvente) e estérica (dependente da estrutura da proteína) (LAM; NICKERSON, M. T., 2013; WALSTRA; VAN VLIET, 2010).

- **Polissacarídeos**

Um polissacarídeo adequado para emulsões concentradas, necessita possuir alta capacidade emulsificante, alta solubilidade em água fria, baixa viscosidade em solução, além de não apresentar efeito gelificante e espessante por um período de tempo razoável (DICKINSON; GALAZKA; ANDERSON, 1991).

A goma arábica (GA) ou goma acácia é um heteropolissacarídeo naturalmente presente em árvores *Acacia senegal* e *Acacia seyal*. Em sua estrutura, contém subunidades de proteínas e de polissacarídeos, que formam três frações distintas em sua molécula: arabinogalactana (80% a 90%), glicoproteína (2% a 4%) e proteína-arabinogalactana (10% a 20%). Em geral, cerca de 2% da goma arábica constitui-se de proteína, a qual é fonte significativa de resíduos de hidroxiprolina, prolina e serina (VERBEKEN; DIERCKX; DEWETTINCK, 2003; AL-ASSAF; PHILLIPS; WILLIAMS, 2005). Sua massa molar pode variar de  $3,0 \cdot 10^5$  a  $5,8 \cdot 10^5$  g/mol, dependendo das características da matriz, como espécie e idade da árvore. Seu peso molecular varia entre 250 e 2000 kilodaltons (kDa) (IDRIS; WILLIAMS; PHILLIPS, 1998; AL-ASSAF; PHILLIPS; WILLIAMS, 2005). A goma arábica, da matriz *Acacia senegal*, é constituída, predominantemente de resíduos de carboidratos, distribuídos na seguinte proporção: 42% de D-galactose, 27% L-arabionose, 15% de L-ramnose, 14,5% ácido D-glucurônico, e 1,5% de 4-O-metil-D-glucurônico; e da matriz *Acacia seyal* de 38% de galactose, 46% de L-arabionose, 4% de L-ramnose, 6,5% de ácido D-glucurônico, e 5,5% 4-O-metil-D-glucurônico (ISLAM et al., 1997). É uma das gomas industriais mais importantes e antigas utilizada pelas indústrias de alimentos e farmacêutica. Atualmente, nessas indústrias, a aplicação mais importante da goma arábica tem sido como emulsificante. É considerada a goma de escolha para utilização em emulsões diluídas O/A, principalmente na indústria de refrigerantes e de panificação (GARTI, 1999). Formam sistemas que utilizam óleos cítricos, óleos essenciais e flavorizantes artificiais, como agentes veiculadores de sabores, onde os óleos são solubilizados em meio aquoso (MCNAMEE; O'RIORDAN; O'SULLIVAN, 1998; GARTI, 1999; CHANAMAI; MCCLEMENTS, 2002; VERBEKEN; DIERCKX; DEWETTINCK, 2003; DICKINSON, 2003; WILLIAMS; PHILLIPS, 2009; BEMILLER; HUBER, 2010). Sua atividade de interface, e, portanto,

emulsificante, resulta, principalmente, da presença e da ação de uma fração de proteína em sua estrutura, chamada proteína-arabinoglicana (BUFFO; REINECCIUS; OEHLERT, 2001; YADAV et al., 2007). Randall; Phillips; Williams (1988), comprovaram a atividade emulsificante da goma arábica por meio das proteínas de sua estrutura, quando, após tratá-la com uma protease, sua atividade emulsificante foi perdida. Em emulsão, a fração protéica da goma interage com a fase óleo, enquanto que a fração polissacarídica se estende para o interior da fase aquosa (PICTON; BATAILLE; MULLER, 2000; CHANAMAI; MCCLEMENTS, 2002;). A Figura 3 representa essa característica.



**Figura 3** Representação da característica anfifílica da goma arábica. Fonte: WILLIAMS; PHILLIPS, 2009.

A associação de blocos de polissacarídeos com a cadeia peptídica de sua estrutura, confere a essa macromolécula, um caráter anfifílico, favorecendo sua adsorção em interfaces ar-água e óleo-água (IDRIS; WILLIAMS; PHILLIPS, 1998; DICKINSON, 2003). Por isso, é chamada de polissacarídeo adsorvente ou ativo de interface. A adsorção da goma, em torno das gotas, forma uma camada espessa protetora (BEMILLER; HUBER, 2010). Em emulsões O/A, ela, então adsorve na interface óleo-água, diminui a tensão interfacial durante a homogeneização e facilita a produção de gotas pequenas (BUFFO; REINECCIUS; OEHLERT, 2001). Na mesma interface, ainda impede, por interação estérica, a aproximação e o contato entre as gotas do sistema. Carregada negativamente, e em meio com pH acima de 2 (BOUYER, 2012), permite, por interação eletrostática, a estabilização espacial desses sistemas. Para formação de gotas pequenas e estáveis, é necessária uma razão de peso entre goma arábica e óleo (fase óleo), de aproximadamente, 1:1. Apesar de sua atividade de superfície ser considerada muito baixa, quando comparada com proteínas tipicamente emulsificantes Mcnamee; O’riordan; O’sullivan (1998); Bouyer (2011) demonstraram que após o tempo necessário para adsorção, a goma arábica diminuiu a tensão interfacial, na mesma extensão que a  $\beta$ -lactoglobulina.

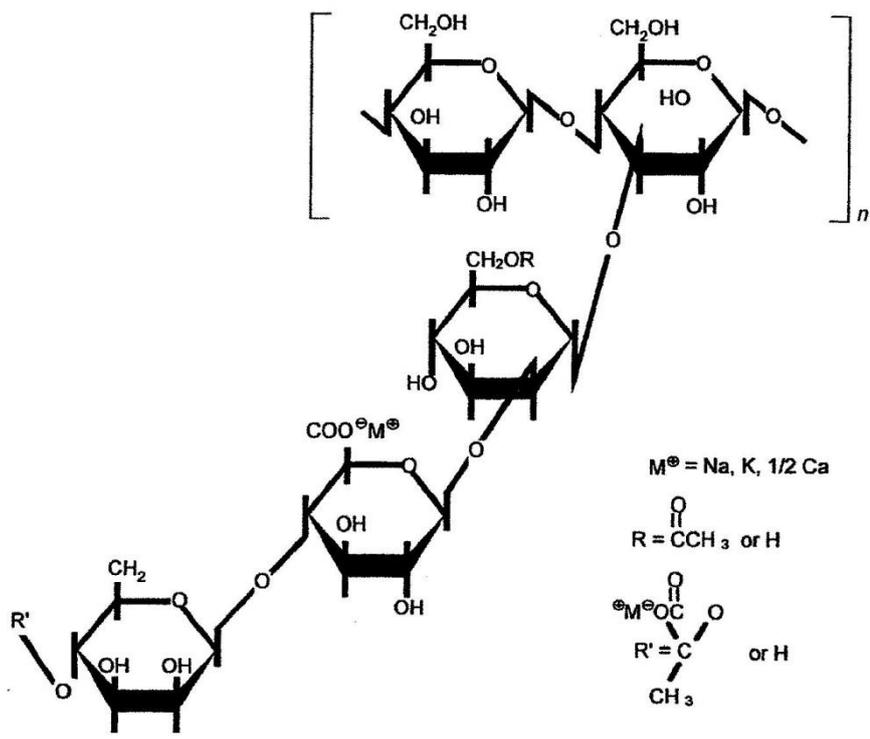
Segundo McClements (2011), há considerável variação na espessura de camadas formadas por emulsificantes de grau alimentício, conforme demonstrado a seguir, em ordem decrescente de espessura formada: moléculas pequenas de emulsificantes (ou surfactantes), tais como, Tweens e Spans; proteínas globulares, tais como, proteínas do ovo, proteínas do soro do leite e proteínas da soja; proteínas flexíveis, tais como, caseinato e gelatina; polissacarídeos, tais como, goma arábica e goma modificada. A concentração e a distribuição do tamanho das gotas de óleo em uma nanoemulsão pode ser controlada a partir da natureza do emulsificante utilizado para estabilizar o sistema. As características elétricas das gotas de

óleos, também podem ser controladas a partir da seleção de emulsificantes carregados positivamente, negativamente ou neutros (LEE; MCCLEMENTS, 2010).

### 2.5.2 Espessantes

Chamados também de hidrocolóides e biopolímeros, são utilizados em emulsões O/A como estabilizantes e emulsificantes. A maioria dos polissacarídeos podem agir como estabilizantes, porém, poucos podem agir como emulsificantes (HARNSILAWAT; PONGSAWATMANIT; MCCLEMENTS, 2006). São geralmente mais utilizados na indústria de alimentos, como espessantes e umectantes, devido ao seu alto peso molecular e suas características hidrofílicas. Comumente, possuem atividade de superfície limitada, e por isso, contribuem para a estabilidade da emulsão aumentando a viscosidade da fase aquosa. Essas ações reduzem o movimento das gotas e evita aproximação entre elas. Devido a seus atributos sensoriais, também são chamados de modificadores de textura, quando adicionados às emulsões alimentícias com o objetivo de promoverem textura desejável (PARASKEVOPOULOU; BOSKOU; KIOSSEOGLOU, 2004; MCCLEMENTS, 2009; SAMAVATI et al., 2011).

A goma xantana (GX), um dos principais espessantes utilizados em alimentos, é um heteropolissacarídeo aniônico extracelular, produzido e secretado pela bactéria *Xantomonas campestris*. Possui estrutura molecular complexa e alto peso molecular, variando este, entre  $1,5$  e  $2,0 \cdot 10^6$  g/mol. Valores maiores, como de  $5,0 \cdot 10^6$  g/mol têm sido reportados na literatura, porém, podem estar superestimados, devido ao fenômeno da agregação. Sua estrutura primária é uma cadeia linear (1,4) ligada a  $\beta$ -D-glicose, idêntica à da celulose. A cada duas unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosil da cadeia principal, possui ligada, na posição O-3, uma unidade trissacarídica, a  $\beta$ -D-manopiranosil-(1,4)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1,2)-6-O-acetil- $\beta$ -D-manopiranosil. Normalmente, metade das unidades terminais de  $\beta$ -D-manopiranosil possui ácido pirúvico ligado a um acetal 4,6-cíclico. As cadeias de trissacarídeos laterais interagem com a cadeia principal, tornando a molécula bastante rígida (DANISCO, 2009; BEMILLER; HUBER, 2010; BOUYER, 2012). A Figura 4 representa a estrutura primária da goma xantana.



**Figura 4** Representação da estrutura primária da goma xantana. Fonte: DANISCO, 2009.

A GX faz parte do grupo dos polissacarídeos não adsorventes ou não ativos de superfície. Adicionada à fase aquosa de emulsões alimentícias O/A, melhora a estabilidade e a textura desses sistemas (HIGIRO; HERALD; ALAVI, 2006). Em água, a cadeia de polímero rígido pode apresentar-se como cadeia única ou como dupla ou tripla hélice, que interage com outras cadeias para formar um complexo em rede, fracamente ligado (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; MELTON, 1976). Essa estrutura, em particular, confere à goma uma propriedade espessante diferenciada e um comportamento reológico tixotrópico. Devido a suas propriedades reológicas únicas, a goma xantana é reconhecida ser um excelente estabilizante (HENNOCK; RAHALKAR; RICHMOND, 1984; SUN; GUNASEKARAN; RICHARDS, 2007). Sob concentrações apropriadas, a goma xantana é usada para prevenir a floculação e a cremação em emulsões. É muito utilizada em alimentos devido as seguintes características: solúvel em água quente e fria; na faixa de temperatura entre 0°C e 100°C não há mudanças perceptíveis na viscosidade da solução, característica única entre as gomas alimentícias; é solúvel e estável em soluções ácidas; sua viscosidade tem excelente estabilidade em uma ampla faixa de pH e de temperatura; é resistente à degradação enzimática; possui excelente compatibilidade com sal; exibe interação sinérgica com galactomananas, tais como, goma guar e goma locuste; e é estabilizante de suspensões e emulsões. Essas propriedades se devem a rigidez estrutural da goma e da forma estendida de sua molécula, a qual resulta de sua cadeia linear do tipo celulósico, que é estirada e mantida rígida pelas cadeias laterais aniônicas trissacarídicas (DANISCO, 2009; BEMILLER; HUBER, 2010).

Soluções de GX sofrem transição conformacional durante o aquecimento, a qual parece estar associada com mudança do estado rígido (em temperaturas baixas), para um estado mais flexível e desodernado (em temperaturas elevadas). A temperatura para que ocorra a transição conformacional é, inicialmente, depende da força iônica da solução e do conteúdo de ácido pirúvico e de ácido acético da goma. Como mencionado, abaixo da

temperatura de transição, a conformação em hélice da GX, em solução, pode ser considerada uma estrutura rígida, a qual é capaz de formar associações intermoleculares que resulta na formação de uma rede complexa de moléculas, fracamente ligadas entre si (DANISCO, 2009). Portanto, esse polissacarídeo tende a formar estruturas em solução, e por apresentar fraca propriedade de gel, contribui para a estabilidade de dispersões coloidais (NIKIFORIDIS; KIOSSEOGLU, 2010).

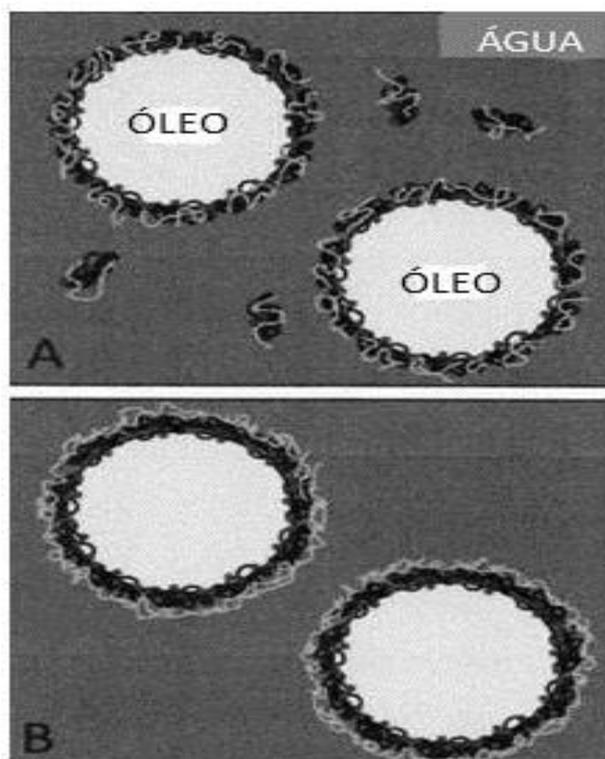
## 2.6 Interação entre Proteínas e Polissacarídeos em Emulsões

A adição de polissacarídeos aniônicos em emulsões que possuem proteína como emulsificante, pode influenciar a estabilidade da emulsão. Dependendo do polissacarídeo usado em uma emulsão, ao se ligar à proteína da interface, ele modifica a reologia do sistema (HAYATI et al., 2009). Um exemplo disso é a adição de goma arábica em uma emulsão estabilizada com proteínas do ovo, a qual modifica a reologia da emulsão, de um fluido newtoniano para plástico de Bingham, enquanto que o uso de outros polissacarídeos, como a goma locuste, goma guar, carboximetilcelulose e goma xantana, resulta em comportamento pseudoplástico do fluido (LAM; NICKERSON, 2013).

O nível de interações entre proteínas e polissacarídeos depende de muitos fatores, como características do biopolímero (tamanho, conformação, proporção da mistura, tipo de biopolímero, tipo e distribuição de sítios reativos), condições do solvente (pH, concentração salina e temperatura); concentração total do biopolímero e método de formação da emulsão. A utilização de métodos mistos para produção da emulsão, pode influenciar significativamente a composição, a estrutura e o comportamento dinâmico dos biopolímeros na interface (LAM; NICKERSON, 2013). A homogeneização de uma solução aquosa, composta por proteínas e polissacarídeos, e uma fase óleo, sob condições específicas do solvente, proporciona a formação de filme homogêneo de biopolímero na interface, como pode ser visualizado na Figura 5A (WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004). Diferentemente, utilizando-se de um processo de múltiplas etapas, onde inicialmente é formada uma emulsão constituída de uma fase aquosa e uma fase óleo, e após, adicionadas de solução de polissacarídeo (sob condições específicas do solvente), forma-se uma pré-emulsão. Esse processo proporciona a obtenção de uma interface de multicamadas, compostas por biopolímero. O método de formação desse tipo de emulsão é baseado no princípio da deposição de camada em camada (Figura 5B). Não obstante, sistemas com biopolímeros também conduzem à instabilidade de emulsões. Devido a natureza eletrostática desse complexo, coacervados de polissacarídeos e proteínas são sensíveis às mudanças de pH e de força iônica (JOURDAIN et al., 2008; TRAN; ROUSSEAU, 2013). Um exemplo disso é a ocorrência de floculação, quando molécula do polissacarídeo se complexa com o filme de proteína, por meio de interação eletrostática (quando a proteína e o polissacarídeo possuem cargas semelhantes), na presença de biopolímero em quantidade acima de sua concentração crítica. A presença do biopolímero não adsorvido ou em excesso na fase contínua, aumenta a força atrativa entre as gotas por efeito osmótico, e provoca a exclusão de cadeias desses compostos da região que circunda estreitamente duas gotas (MCCLEMENTS, 2000). Esse mecanismo de depleção não é exclusividade em biopolímeros. Ele pode também ser induzido por surfactantes de baixo peso molecular não adsorvidos nas micelas, e por nanopartículas orgânicas e inorgânicas (BOUYER et al., 2012). Esse processo pode envolver inúmeras gotas de óleo, conduzindo à agregação, como descrito anteriormente (BLIJDENSTEIN et al., 2004). A agregação tem sido reportada em emulsões estabilizadas com os seguintes biopolímeros, presentes no sistema, em quantidades acima de suas concentrações críticas: proteína de fava e dextrana (DICKINSON; SEMENOVA, 1992), ovoalbumina e carragenana (GALAZKA; DICKINSON; LEDWARD,

2000), proteínas isoladas de soja e pectina metoxilada (ROUDSARI et al., 2006) e caseinato de sódio e *kappa*-carragenana (VEGA; DALGLEISH; GOFF, 2005). Entretanto, a estabilidade é aumentada quando, no sistema, a quantidade de biopolímero apresenta-se abaixo de sua concentração crítica (CHANAMAI; MCCLEMENTS, 2001; JENKINS; SNOWDEN, 1996).

Harnsilawat; Pongsawatmanit; McClements (2006), observaram que biopolímero, composto de proteínas e polissacarídeos, aumenta a estabilidade da emulsão, desde que o polissacarídeo seja capaz de cobrir a superfície do filme de proteína.



**Figura 5 A:** Emulsão O/A homogeneizada com biopolímeros (polissacarídeos e proteínas). **B:** Emulsão formada por meio da técnica de deposição de multicamada. Os fios pretos representam a porção hidrofóbica da molécula de proteína, enquanto que os fios brancos representam os polissacarídeos. Fonte: WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004.

## 2.7 Interações Coloidais

As várias forças atrativas e repulsivas que agem entre as gotas dispersas de um sistema, determinam sua estabilidade à agregação, e conseqüentemente, a vida de prateleira, a textura e a aparência das emulsões. As interações entre duas gotas são normalmente descritas como potencial de interação,  $w(h)$ , o qual é a energia livre requerida, a partir de uma distância infinita, para aproximar duas gotas até o limite de uma distância ( $h$ ). O potencial de interação total é composto da contribuição de diferentes tipos de interações, incluindo interações de van der Waals, estérica, eletrostática, de depleção, hidrofóbica e de hidratação. Cada interação varia conforme sua indicação (atrativa ou repulsiva), magnitude (fraca ou forte) e amplitude (curta ou longa). Portanto, gotas tendem a agregarem-se quando interações atrativas dominam no sistema, e ao contrário, permanecem separadas entre si, quando neste, interações repulsivas dominam (MCCLEMENTS, 2009).

Gotas da fase dispersa, comumente são atraídas por interações de van der Waals e hidrofóbicas, ao contrário, são repelidas por meio de interações estérica e eletrostática (HILL, 1996; MCCLEMENTS, 2011). A interação estérica é uma força repulsiva de baixa magnitude, enquanto que a repulsão eletrostática depende da carga elétrica das gotas e da composição iônica da fase aquosa. Em geral, a magnitude das interações coloidais, tanto atrativas, quanto repulsivas, tende a aumentar com o aumento do tamanho das gotas (MCCLEMENTS, 2011). Segundo Walstra; Van Vliet (2010), alguns polímeros-emulsificantes possuem cadeias moleculares flexíveis, como filamentos, os quais, quando adsorvidos na interface óleo-água, podem causar repulsão estérica.

A elevada repulsão eletrostática entre gotas de óleo conduz a uma melhor estabilidade da emulsão, enquanto que sistemas com valores de pH próximos ao ponto isoelétrico da proteína, ou na vigência de força iônica de alta intensidade, há tendência de agregação, e instabilidade da emulsão por coalescência (LAM; NICKERSON, 2013). Nanoemulsões, por exemplo, possuem boa estabilidade contra agregação, pois as forças atrativas que ocorrem entre as gotas, são proporcionais ao tamanho que estas apresentam, quando dispersas no sistema. Entretanto, a repulsão estérica, nesses sistemas, é menos dependente do tamanho das gotas (LEE; MCCLEMENTS, 2010).

## 2.8 Microencapsulamento de Componentes Bioativos

Microencapsulamento é uma técnica utilizada para incluir ingredientes ou componentes bioativos, líquidos, sólidos, ou gasosos, em microcápsulas, com finalidades diversas, como proteção, liberação controlada em alvos específicos, controle de reações entre dois ou mais componentes encapsulados, além de aumentar a estabilidade, a solubilidade e a biodisponibilidade dessas substâncias no organismo. (MCNAMEE; RIORDAN; SULLIVAN, 1998; ACOSTA, 2009). Os métodos mais frequentemente empregados em alimentos para o microencapsulamento de bioativos sensíveis à luz, temperatura, oxigênio e reações químicas, são a desidratação por atomização ou *spray drying* e as emulsões O/A (MCCLEMENTS, 2014).

Emulsões e nanoemulsões O/A têm sido frequentemente utilizadas para encapsular e carrear componentes bioativos lipofílicos, como o ácido graxo ômega-3, o licopeno, a astaxantina, a luteína, o  $\beta$ -caroteno, e algumas vitaminas lipossolúveis. No entanto, muitos deles são cristalinos à temperatura ambiente, como é o caso do  $\beta$ -caroteno, o que pode dificultar a formação ou a estabilidade a longo prazo dos sistemas carreadores desses componentes. Por esse motivo, o bioativo deve ser dissolvido em óleos ou aquecido à temperatura acima de seu ponto de fusão, antes de submeter o sistema encapsulador ao processo de homogeneização. Além disso, a estabilidade dos microencapsulados pode ser aumentada por meio da produção de gotas dispersas de tamanho pequeno, com distribuição uniforme, e com a pulverização dos sistemas, por meio da utilização do método *spray drying* (LAINE et al., 2011; QIAN et al., 2012b; MCCLEMENTS, 2014).

Dentre os diversos biopolímeros disponíveis, a GA tem sido amplamente utilizada em emulsões O/A destinadas ao microencapsulamento e carregamento de componentes bioativos, devido a sua alta solubilidade em água, baixa viscosidade em soluções concentradas, além de sua ação emulsificante (MCNAMEE; RIORDAN; SULLIVAN, 1998).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 3–15, fev. 2009.

AL-ASSAF, S; PHILLIPS, G. O; WILLIAMS, P. A. Studies on acacia exudate gums. Part I. the molecular weight of Acacia senegal gum exudate. **Food Hydrocolloids**, 19, p. 647–660, jul, 2005.

AVEYARD, R; BINKS, B. P., CLINT, J. H. Emulsions stabilized solely by solid colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, 100–102, p. 503–546, jul, 2003.

BEMILLER, J. B; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAM, S; PARKIN, K. L; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 75-130.

BINKS, B. P. Particles as surfactants—similarities and differences. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 7, p. 21–41, mar, 2002.

BOBBIO, P. A; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**, 3ª edição. São Paulo, Varela, 2001.

BLIJDENSTEIN, T. B. J; VAN WINDEN, A. J. M; VAN VLIET, T; VAN DER LINDEN, E; VAN AKEN, G. A. Serum separation and structure of depletion- and bridging-flocculated emulsions: A comparison. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 245,1-3, p. 41–48, sep. 2004.

BOS, M. A; VAN VLIET, T. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 91, 3, p. 437–471, jul. 2001.

BOUYER, E; MEKHLOUFI, G; LE POTIER, I; KERDANIEL, T, DU FOU DE; GROSSIORD, JEAN-LOUIS; ROSILIO, V; AGNELY, F. Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by  $\beta$ - lactoglobulin and gum arabic. **Journal of Colloid and Interface Science**, 54, p. 467–477, fev, 2011.

BOUYER, E; MEKHLOUFI, G; ROSILIO, V; GROSSIORD, JEAN-LOUIS; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, 436, p. 359-378, jun, 2012.

BUFFO, R. A; REINECCIUS, G. A; OEHLERT, G. W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. **Food Hydrocolloids**, 15, p. 53–66, jan, 2001.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsion. **Advances in Colloid and Interface Science**, 107, p. 125-155, jul, 2004.

CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D. J. Depletion flocculation of beverage emulsions by gum Arabic and modified starch. **Journal of Food Science**, 66, 3, p. 457–463, apr. 2001.

CHANAMAI, R; MCCLEMENTS, D. J. Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: influence of pH, CaCl<sub>2</sub> and temperature. **Journal of Food Science**. 67, p. 120–125, jan, 2002.

DAMODARAN, S. Protein stabilization of emulsions and foams. **Journal of Food Science**, Medison, 70, p. 54–66, mar, 2005.

DANISCO, G. A. Xanthan gum. In: PHILLIPS, G. O; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. Second edition, CRC press, 2009. p. 186-202.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, 17, p. 25–39, nov, 2003.

DICKINSON, E.; SEMENOVA, M. G. Emulsifying behavior of protein in the presence of polysaccharide under conditions of thermodynamic incompatibility. **Journal of the Chemical Society**, Faraday Transactions, 88, 6, p. 849–854, jan. 1992.

DICKINSON, E; GALAZKA, V. B; ANDERSON, D. M. W. Emulsifying behaviour of gum arabic. Part 1: Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet size distribution. **Carbohydrate Polymers**, 14, p. 373–383, 1991.

FOEGEDING, E. A; DAVIS, J. P. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, 25, p. 1853–1864, mai. 2011.

FRELICHOWSKA, J; BOLZINGER, MARIE-ALEXANDRINE; PELLETIER, J; VALOUR, JEAN-PIERRE; CHAVALIER, Y. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, 371, p. 56–63, dec, 2009.

FRIBERG, S. E; VENABLE, R. L. Microemulsions. In: BECHER, P. **Encyclopedia of Emulsion Technology**, vol. 1. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 287–336.

GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of ovalbumin in mixtures with sulphated polysaccharides: Effects of pH, ionic strength, heat and high-pressure treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 8, p. 1219–1229, jun. 2000.

GALINDO-ALVAREZ, J; LE, KIM-ANH; SADTLER, V; MARCHAL, P; PERRIN, P; TRIBET, C; MARIE, E; DURAND, A. Enhanced stability of nanoemulsions using mixtures of non-ionic surfactant and amphiphilic polyelectrolyte. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, p.237-245, aug. 2011.

GARTI, N. Hydrocolloids as emulsifying agents for oil-in-water emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, 20, p. 327-355, 1999.

GUZEY, D; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, 128-130, p. 227-248, dec, 2006.

GUZEY, D; MCCLEMENTS, D. J. Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by b-lactoglobulin–pectin complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Amherst**, 55, 2, p. 475–485, dec. 2007.

HARNSILAWAT, T; PONGSAWATMANIT, R; MCCLEMENTS, D. J. Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein–polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil–water interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 15, p. 5540–5547, jul. 2006.

HAYATI, I. N; MAN, Y. B. C; TAN, C. P; AINI, I. N. Droplet characterization and stability of soybean oil/palm kernel olein O/W emulsions with the presence of selected polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, 23, 2, p. 233–243, mar. 2009.

HENNOCK, M; RAHALKAR, R. R; RICHMOND, P. Effect of xanthan gum upon the rheology and stability of oil-water emulsions. **Journal of Food Science**, 49, p. 1271–1274, apr, 1984.

HIGIRO, J; HERALD, T. J; ALAVI, S. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution. **Food Research International**, 39, p. 165–175, mar, 2006.

HILL, S. E. Emulsion. In: HALL, G.M. **Methods of Testing Protein Functionality**. First edition. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.153-185.

IDRIS, O. H. M; WILLIAMS, P. A; PHILLIPS, G. O. Characterization of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. **Food Hydrocolloids**, 12, p. 379–388, mar, 1998.

ISLAM, A. M; PHILLIPS, G. O; SLJIVO, A; SNOWDEN, M. J; WILLIAMS, P. A. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, 11, p. 493–505, oct, 1997.

JANSSON, PER-ERIK; KENNE, L; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, 45, p. 275–282, may, 1975.

JOURDAIN, L; LESER, M. E; SCHMITT, C; MICHEL, M; DICKINSON, E. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution. **Food Hydrocolloids**, 22, 4, p. 647–659, jun. 2008.

LAINE, P.; TOPPINEN, E.; KIVELÄ, R.; TAAVITSAINEN, V. M.; KNUUTILA, O.; SONTAG-STROHM, T.; JOUPPILA, K.; LOPONEN, J. Emulsion preparation with modified oat bran: Optimization of the emulsification process for microencapsulation purposes. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 538–547, 2011.

LAM, R. S. H; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food Chemistry**, 141, p.975-984, apr. 2013.

LEE, S. J; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, 24, p. 560-569, feb. 2010.

- MASON, T.G; WILKING, J. N; MELESON, K; CHANG, C. B; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, 18, p. 635–666, sep, 2006.
- MCCLEMENTS, D. J. Biopolymers in Food Emulsions. In: KASAPIS, S; NORTON, I. T; UBBINK, J. B. **Modern Biopolymer Science**. First Edition. San Diego: Elsevier, 2009. p. 129-163.
- MCCLEMENTS, D. J. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, 14, p. 173–177, mar, 2000.
- MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **The Royal Society of Chemistry**, 7, p. 2297-2316, nov. 2011.
- MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active compounds**. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- MCNAMEE, B. F; O’RIORDAN, E. D; O’SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 4, 46, p. 4551–4555, oct, 1998.
- MELTON, L. D; MINDT, L; REES, D. A; SANDERSON, G. R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. **Carbohydrate Research**, 46, p. 245–257, 1976.
- NIKIFORIDIS, C. V; KIOSSEOGLOU, V. Physicochemical stability of maize germ oil body emulsions as influenced by oil body surface-xanthan gum interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, p. 527–532, nov, 2010.
- NIU, F.; SU, Y.; LIU, Y.; WANG, G.; ZHANG, Y.; YANG, Y. Ovalbumin-gum arabic interactions: effect of pH, temperature, salt, biopolymers ratio and total concentration. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 113, p. 477–82, 1 jan. 2014.
- OSTERTAG, F; WEISS, J; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, 388, p. 95-102, jul. 2012.
- PARASKEVOPOULOU, A; BOSKOU, D; KIOSSEOGLOU, V. Stabilization of olive oil–lemon juice emulsion with polysaccharides. **Food Chemistry**, 90, p. 627–634, apr, 2004.
- PERRECHIL, F. DE ASSIS. **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**. 2008. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- PICTON, L; BATAILLE, I; MULLER, G. Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation. **Carbohydrate. Polymers**, 42, p. 23–31, mai, 2000.

QIAN, C; DECKER, E. A; XIAO, H; MCCLEMENTS, D. J. Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. **Food Chemistry**, 132, p. 1221-1229, nov. 2012.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1440–7, 1 dez. 2012b.

QIAN, C; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, 25, p. 1000–1008, jul , 2011.

RANDALL, R. C; PHILLIPS, G. O; WILLIAMS, P. A. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, 2, p. 131–140, jun, 1988.

RAO, J; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, 29, p. 326-334, apr. 2012.

RAYNER, M; SJÖÖ, M; TIMGREN, A; DEJMEK, P. Quinoa starch granules as stabilizing particles for production of Pickering emulsions. **Faraday Discussions**, 158, p.139-155, 2012.

ROUDSARI, M.; NAKAMURA, A.; SMITH, A.; CORREDIG, M. Stabilizing behavior of soy soluble polysaccharide or high methoxyl pectin in soy protein isolate emulsions at low pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 4, p. 1434–1441, feb. 2006.

SAMAVATI, V; EMAM-DJOMEH, Z; MOHAMMADIFAR, M. A; OMID, M; MEHDINIA, A. L. I. Stability and rheology of dispersions containing polysaccharide, oleic acid and whey protein isolate. **Journal of Texture Studies**, 43, p. 63-76, jun. 2011.

SANGUANSRI, P; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, 17, p. 547-556. 2006.

SOLANS, C; IZQUIERDO, P; NOLLA, J; AZEMAR, N; GARCIA-CELMA, M. J. Nanoemulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 10, p. 102-110, aug, 2005.

SUBRAMANIAM, A. B; ABKARIAN, M; STONE, H. A. Controlled assembly of jammed colloidal shells on fluid droplets. **Nature Materials**, 4, p. 553–556, jul, 2005.

SUN, C; GUNASEKARAN, S; RICHARDS, M. P. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, 21, p. 555–564, jun, 2007.

TIMGREN, A; RAYNER, M; DEJMEK, P; MARKU, D; SJÖÖ, M. Emulsion stabilizing capacity of intact starch granules modified by heat treatment or octenyl succinic anhydride, **Food Science & Nutrition**, 2, p. 157–171, nov, 2013.

TIMGREN, A; RAYNER, M; SJÖÖ, M; DEJMEK, P. Starch particles for food based Pickering emulsions, **Procedia Food Science**, 1, p. 95–103, may, 2011.

TRAN, T; ROUSSEAU, D. Stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, 30, 1, p.382–392, jan. 2013.

VEGA, C.; DALGLEISH, D. G; GOFF, H. D. Effect of kappa-carrageenan addition to dairy emulsions containing sodium caseinate and locust bean gum. **Food Hydrocolloids**, 19, 1, p. 187–195, mar. 2005.

VERBEKEN, D; DIERCKX, S; DEWETTINCK, K. Exudate gums: Occurrence, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63, p. 10–21, apr, 2003.

WALSTRA, P; VAN VLIET, T. Sistemas Dispersos: Considerações Básicas. In: DAMODARAM, S; PARKIN, K. L; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 611-660.

WEINBRECK, F; MINOR, M; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, 21, 6. p. 667–679. 2004.

WILLIAMS, P. A; PHILLIPS, G. O. Gum arabic. In: PHILLIPS, G. O; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. Second edition. CRC press, 2009. p. 252-273.

WOOSTER, T. J; GOLDING, M; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. **Langmuir**, 24, p. 12758–12765, jul, 2008.

YADAV, M. P; IGARTUBURU, J. M; YAN, Y; NOTHNAGEL, E. A. Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum Arabic. **Food Hydrocolloids**, 21, p. 297-308, mar, 2007.

YUSOFF, A; MURRAY, B. S. Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, 25, p. 42–55, may, 2011.

YOU, D.; HUCK, J.; YOUNG, J.; JHON, G.; SUK, H. Nitric Oxide Effect of nitric oxide on conformational changes of ovalbumin accompanying self-assembly into non-disease-associated fibrils. **Nitric Oxide**, v. 47, p. 1–9, 2015.

## **CAPITULO I**

### **FORMAÇÃO DE EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS POR OVALBUMINA, GOMA ARÁBICA E GOMA XANTANA**

## RESUMO

Nas últimas décadas, as emulsões têm sido amplamente utilizadas por diferentes indústrias, no encapsulamento, no transporte e na liberação controlada de vários componentes bioativos, como nutracêuticos, vitaminas, minerais, fármacos, entre outros. A utilização de biopolímeros na produção de emulsões tornou-se promissora, principalmente para as indústrias de alimentos, uma vez que esses compostos são inócuos ou de baixa toxicidade. Os objetivos da pesquisa apresentada nesse capítulo foram formar emulsões do tipo óleo em água (O/A), com os estabilizantes ovalbumina (OV), goma arábica (GA) e goma xantana (GX), caracterizar esses sistemas e avaliar suas estabilidades à 25°C, em relação à separação de fases. As emulsões foram elaboradas por técnica de emulsificação, composta de dois passos: pré-homogeneização em ultraturrax e homogeneização em ultrassom. Os dados foram submetidos às análises de variância (ANOVA) e regressão, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan e teste t de Student, adotando-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). O maior tempo de estabilidade à separação de fases (7 dias) ocorreu nos sistemas que continham OV e GA, nas concentrações de 0,5% e 1% e 7,5% e 10%, respectivamente, na ausência de GX. A concentração de OV correlacionou-se positivamente com o tamanho de partícula e inversamente com o valor de potencial zeta. Ao final do período de sete dias, mesmo com a maior concentração de OV, e consequentemente com o maior tamanho de partícula (1633 nm), e menor valor de potencial zeta (-26,4 mV), o sistema com 1% de OV e 10% de GA apresentou, como os demais, índice de estabilidade da emulsão (IEE) de 100%. Os sistemas estudados podem ser classificados como macroemulsões ou emulsões convencionais, devido ao tamanho de partícula obtido (entre 0,1  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ ) e a aparência opaca apresentada. Em relação às propriedades reológicas, os sistemas são semelhantes à maioria das emulsões utilizadas nos processos alimentícios, tendo, então, potencial aplicação no setor.

**Palavras-chave:** Emulsão convencional, Índice de estabilidade da emulsão, Reologia.

## ABSTRACT

In recent decades, the emulsions have been widely used by different industries, in packaging, delivery and controlled release of various bioactive components, such as nutraceuticals, vitamins, minerals, pharmaceuticals, among others. The use of biopolymers for the production of emulsions become promising, especially for the food industry, since these compounds are safe and lower toxicity. Moreover, the type of oil in water emulsions (O/W) allows the placement of lipophilic components in arrays with a high concentration of water, as are the food, facilitating strategic the fortification and supplementation of these components, as is the case of  $\beta$ -carotene. The research aims were to elaborate oil in water emulsions (O/W) formed with the stabilizers ovalbumin (OV) arabic gum (AG) and xanthan gum (XG), characterize and evaluate the stability of these systems at 25°C, according to phase separation. The emulsions were prepared by emulsifying technique comprises two steps: pre-homogenization in ultraturrax and homogenization in ultrasound. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and regression analysis, and the means were compared by Duncan test and Student's t test, with level of significance of 5% ( $p < 0.05$ ). The longest time stability against phase separation (7 days) was observed in systems containing OV and AG at concentrations of 0.5% and 1% and 7.5% and 10%, respectively, without the presence of GX. The concentration of OV was positively correlated with the particle size and inversely with the zeta potential value. The end of the seven day period, even with the highest concentration of OV, and therefore with the largest particle size (1633 nm), and smaller value of the zeta potential (-26,4 mV), the system OV1%GA10% presented, like the others, emulsion stability index (ESI) equal 100%. The systems studied can be classified as macroemulsions or conventional emulsions due to the particle size (between 0.1  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$ ) and opaque appearance obtained. As regards rheological properties, the systems are similar to the majority of the emulsions used in food processing, and then potential application in the industry.

**Key-words:** Conventional emulsion, Emulsion stability index, Rheology.

# 1 INTRODUÇÃO

Emulsões são sistemas compostos de líquidos imiscíveis, que após o processo de homogeneização, apresentam fase aparentemente única, e aspecto que pode variar do transparente ao opaco, dependendo, em parte, do tamanho das gotas dispersas.

São classificadas, geralmente, segundo o grupo e o tipo a que pertencem. Há dois grupos de emulsões, chamados de emulsões simples e múltiplas. As emulsões simples possuem uma fase dispersa, enquanto que as múltiplas, possuem duas. Para classificação quanto ao tipo, deve-se considerar a proporção de seus componentes principais. No caso das emulsões simples, as mais comuns são do tipo O/A e A/O, onde na primeira, o componente de menor proporção, também chamado de fase dispersa, é o óleo, e na segunda, o componente de menor proporção, é a água. O componente de maior proporção de um sistema, é chamado de fase contínua. Os tipos de emulsão múltipla mais comuns em alimentos são A/O/A e O/A/O. As emulsões múltiplas do tipo A/O/A são muito utilizadas para encapsulamento de componentes bioativos lipofílicos. Ao contrário, as emulsões múltiplas O/A/O são empregadas no encapsulamento de bioativos hidrofílicos.

No geral, as emulsões são termodinamicamente instáveis, sendo necessária para a suas formações e estabilizações, o uso de emulsificantes e espessantes eficientes. Além disso, é desejável a formação de gotas dispersas o quanto menor possível, e para isso, dispositivos como o ultrassom, o ultraturrax e os Homogeneizadores de alta pressão, são muito utilizados.

Muitos estudos têm testado uma variedade de biopolímeros na formação e estabilização de emulsões O/A, como a  $\beta$ -lactoglobulina, proteínas do soro do leite, pectina, ovalbumina, carragenana, goma xantana e goma arábica. A principal vantagem do uso de biopolímeros é sua inocuidade ou baixa toxicidade, em relação, principalmente, aos surfactantes sintéticos. Diversas indústrias produzem sistemas encapsuladores e carreadores de bioativos, à base de emulsões estabilizadas por biopolímeros, para aplicação em diversas finalidades, como, corantes, suplementação de nutrientes, sanitizantes, flavorizantes, fármacos e cosméticos (GUZEY; MCCLEMENTS, 2007; MIRHOSSEINI et al., 2007; BOUYER et al., 2012; WANG et al., 2015).

A utilização e a combinação adequada de um agente emulsificante com outro espessante, como a goma arábica (GA) e goma xantana (GX), pode melhorar a estabilidade das emulsões O/A, por meio da formação de uma monocamada suficientemente espessa e aderente, capaz de diminuir a tensão interfacial do sistema, e ainda, diminuir ou retardar o movimento das gotas da fase dispersa (GHARIBZAHEDI; RAZAVI; MOUSAVI, 2013). A ovalbumina, assim como as demais proteínas presentes no ovo, são muito utilizadas no processamento de alimentos, devido a suas propriedades emulsificante e estabilizante de espumas. Sua estrutura globular permite elaboração de sistemas carreadores, como as emulsões O/A (NIU et al., 2014; MCCLEMENTS, 2014; YOU et al., 2015).

Os objetivos do trabalho apresentado nesse capítulo são estudar a formação e a estabilidade das emulsões do tipo O/A, elaboradas com ovalbumina, goma arábica e/ou goma xantana, e caracterizar esses sistemas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

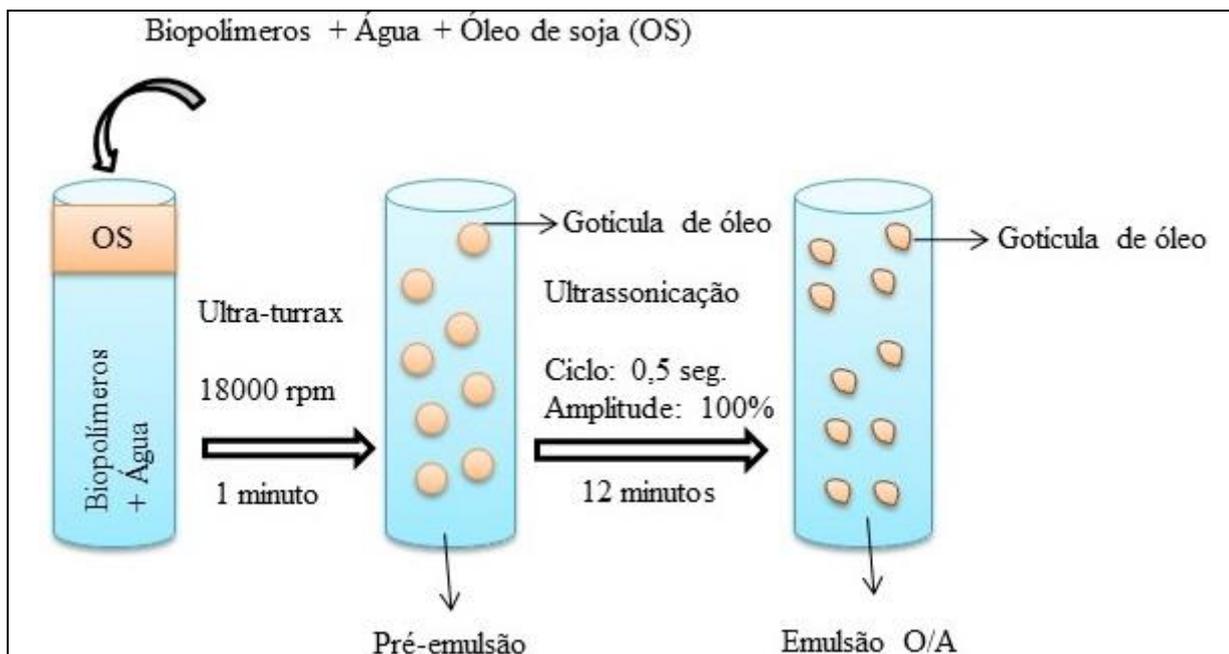
### 2.1 Material

Goma arábica (51198), goma xantana (G1253) e ovalbumina da clara do ovo de galinha (AS378, pureza  $\geq 90\%$ ) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ácido cítrico anidro foi adquirido da Vetec (Brasil) e óleo de soja refinado de um mercado de Volta Redonda, RJ. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Master System MS 2000, Gehaka, Brasil, condutividade igual a  $0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) em balança analítica (Shimadzu, AY220, Brasil) com incerteza de  $\pm 0,0001$  g. Para evitar o crescimento microbiano, foi utilizada azida de sódio (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 0,02% (m/m). Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados sem qualquer purificação.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Formação das emulsões O/A

Foram testadas quarenta e oito formulações para formação de emulsões O/A, com diferentes concentrações (m/m) de OV (0%, 0,5% e 1%), GX (0%, 0,1%, 0,25% e 0,5%) e GA (2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), conforme métodos propostos por Mirhosseini et al (2008) e Gharibzahedi; Razavi; Mousavi (2013), apresentado na Tabela 18 do Anexo A. Soluções-padrão de goma arábica a 30% (m/m), goma xantana a 3% (m/m) e ovalbumina a 5% (m/m) foram inicialmente preparadas e mantidas sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12 horas, para garantir a total hidratação dos biopolímeros. Para formação das emulsões, foram pesados em um béquer, a solução de biopolímero desejada, o óleo, o ácido cítrico e a água ultrapura, totalizando 30 g cada sistema. A concentração de ácido cítrico e de óleo de soja refinado adicionados foi de 0,4% (m/m) e 10% (m/m), respectivamente. Em seguida, os componentes foram submetidos a duas etapas de emulsificação, baseado no método proposto por Gharibzahedi; Razavi; Mousavi (2013): i) pré-homogeneização em ultra-turrax (T-25, IKA, Alemanha), a 18000 rpm, por 1 minuto e, ii) homogeneização utilizando uma sonda de ultrassom de 30 kHz (Hielscher, UP100H, Alemanha), com ciclos de 0,5 segundos e amplitude de 100%, por 12 minutos. As emulsões foram armazenadas sob temperatura controlada de 25°C em incubadora refrigerada (Tecnal, TE-424, Brasil) antes de serem submetidas as análises. Na Figura 6 está representada esquematicamente, a forma de preparo das emulsões O/A.



**Figura 6** Representação esquemática da forma de preparo das emulsões O/A.

### 2.2.2 Estabilidade das emulsões (teste de cremeação)

A estabilidade das emulsões foi determinada pelo índice de estabilidade da emulsão (IEE), conforme proposto por (MIRHOSSEINI et al., 2008). As amostras foram elaboradas em duplicata, e então, transferidas para tubos de vidro, com 1 cm de diâmetro e capacidade de 50 mL, os quais foram armazenados à temperatura constante de 25°C, durante todo o período de tempo de análise (dia 0, dia 1, dia 7 e dia 14). As alturas da emulsão e das fases creme e sedimentada foram medidas com auxílio de uma régua de aço inoxidável, graduada em centímetros. Para o cálculo do IEE considerou-se a altura inicial da emulsão ( $A_E$ ), altura da fase creme ( $A_C$ ) e altura da fase sedimentada ( $A_S$ ), conforme Eq. 01. As emulsões foram consideradas estáveis quando o IEE foi igual a 100%.

$$IEE\% = \left( \frac{A_E - (A_C + A_S)}{A_E} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.01})$$

### 2.2.3 Análise de tamanho médio de partícula e de potencial zeta

O potencial zeta ( $\zeta$ ) e o tamanho das partículas foram determinados por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering* - DLS). O equipamento utilizado para as análises foi o Zetasizer – ZS90 nanoseries - software Zetasizer 7.03, 2013 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), com ângulo detector fixado a 90°C. As emulsões foram diluídas, aproximadamente, duzentas vezes (1/200) em água ultrapura, para minimizar os efeitos da dispersão múltipla. As medidas foram realizadas nos dias 0 (logo após o preparo da emulsão), 1, 7 e 14. O tamanho das partículas das emulsões foi descrito por média acumulada do diâmetro (nm), a distribuição do tamanho foi descrita pelo índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta foi determinado pelo modelo de Smoluchowski (mV).

## 2.2.4 Propriedades reológicas

Para determinação das propriedades reológicas, foi utilizado um reômetro rotacional (Haake™ Mars III, Thermo Scientific Inc., Alemanha), equipado com banho termostaticado, com temperatura constante de 25°C (Haake™, Thermo Scientific, AC 150U, EUA) e geometria cone e placa (C60/1° TiL), com raio de 60 mm, ângulo de 1° e distância (*gap*) de 0,025 mm. As curvas de escoamento foram determinadas utilizando um intervalo de taxa de deformação de 0 a 500 s<sup>-1</sup>. Os modelos testados para descrever o comportamento reológico das emulsões foram: Newton (Eq. 02), Ostwald de Waele (Eq. 03), Bingham (Eq. 04) e Herschel-Bulkley (Eq. 05).

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (\text{Eq.02})$$

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq.03})$$

$$\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma} \quad (\text{Eq.04})$$

$$\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq.05})$$

A avaliação da dependência da viscosidade com o tempo foi determinada por meio do programa de passos múltiplos com intervalo de taxa de deformação de (0 a 300) s<sup>-1</sup> e de (300 a 0) s<sup>-1</sup> (PERRICHIL, 2008). Para caracterizar a estrutura viscoelástica das emulsões foi utilizada a mesma geometria empregada para os ensaios estacionários. A região viscoelástica linear foi determinada com o teste de varredura de tensão (0,01 a 100 Pa), à frequência fixa de 1 Hz. Em seguida, foi realizada a varredura de frequência entre 0,01 a 100 Hz, sob tensão constante de 0,05 Pa. A dependência do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') com a frequência, foi obtida em todos os casos. O teste transiente de fluência e recuperação de tensões, conhecido como *creep recovery* foi conduzido sob as mesmas condições dos ensaios anteriores. As medidas foram realizadas por meio de aplicação de uma tensão instantânea de 0,5 Pa na amostra por 300 segundos (tempo de deformação), e posteriormente foi monitorada a recuperação da amostra, sem tensão aplicada, pelo tempo de 300 segundos (tempo de recuperação). Os dados gerados foram analisados pelo programa Rheowin Data Manager, versão 4.30 (Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha).

## 2.2.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das emulsões e dos biopolímeros foram determinados por meio de um analisador termogravimétrico (TA Instruments, SDT-Q600, USA). Previamente às análises, as amostras foram liofilizadas em um liofilizador (Terroni, Enterprise I, Brasil). Baseado no método utilizado por Cozic et al (2009), alíquotas de 10 mg foram adicionadas em um cadinho de platina (referência), e então, submetidas à temperatura entre 25°C e 600°C, a uma taxa de 10°C/min, sob fluxo de nitrogênio (N<sub>2</sub>), a uma taxa de 100 mL.min<sup>-1</sup>.

## 2.2.6 Observação morfológica das emulsões

Para observação da morfologia das emulsões, foram realizadas micrografias em um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, EVO MA 10, USA). O equipamento foi operado em modo de elétrons secundários, com tensão de aceleração de 6 kV. Aliquota de 2 mL foram retiradas das emulsões frescas, as quais foram congeladas a -40°C por 72 horas, e posteriormente, liofilizadas em um liofilizador (Terroni, Enterprise I, Brasil). Após a liofilização as alíquotas foram mantidas em um dessecador até o momento da análise. Antes

de iniciar a análise, uma pequena amostra do liofilizado foi colocada sobre uma placa específica do equipamento, e então, metalizada.

### **2.2.7 Análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com fatorial completo 3 x 4 x 4, com três níveis do fator tipo de biopolímero, sendo três concentrações para o biopolímero ovalbumina e quatro concentrações para a goma arábica e goma xantana. Os valores de IEE foram calculados por meio da média aritmética de duas medidas. O tratamento estatístico dos dados de tamanho médio das partículas e do potencial zeta, foi realizado por meio da análise de variância (ANOVA), para os sistemas que apresentaram IEE igual a 100%, pelo maior período de tempo, utilizando o pacote SAS 9.2, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). As médias de duas repetições foram comparadas pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

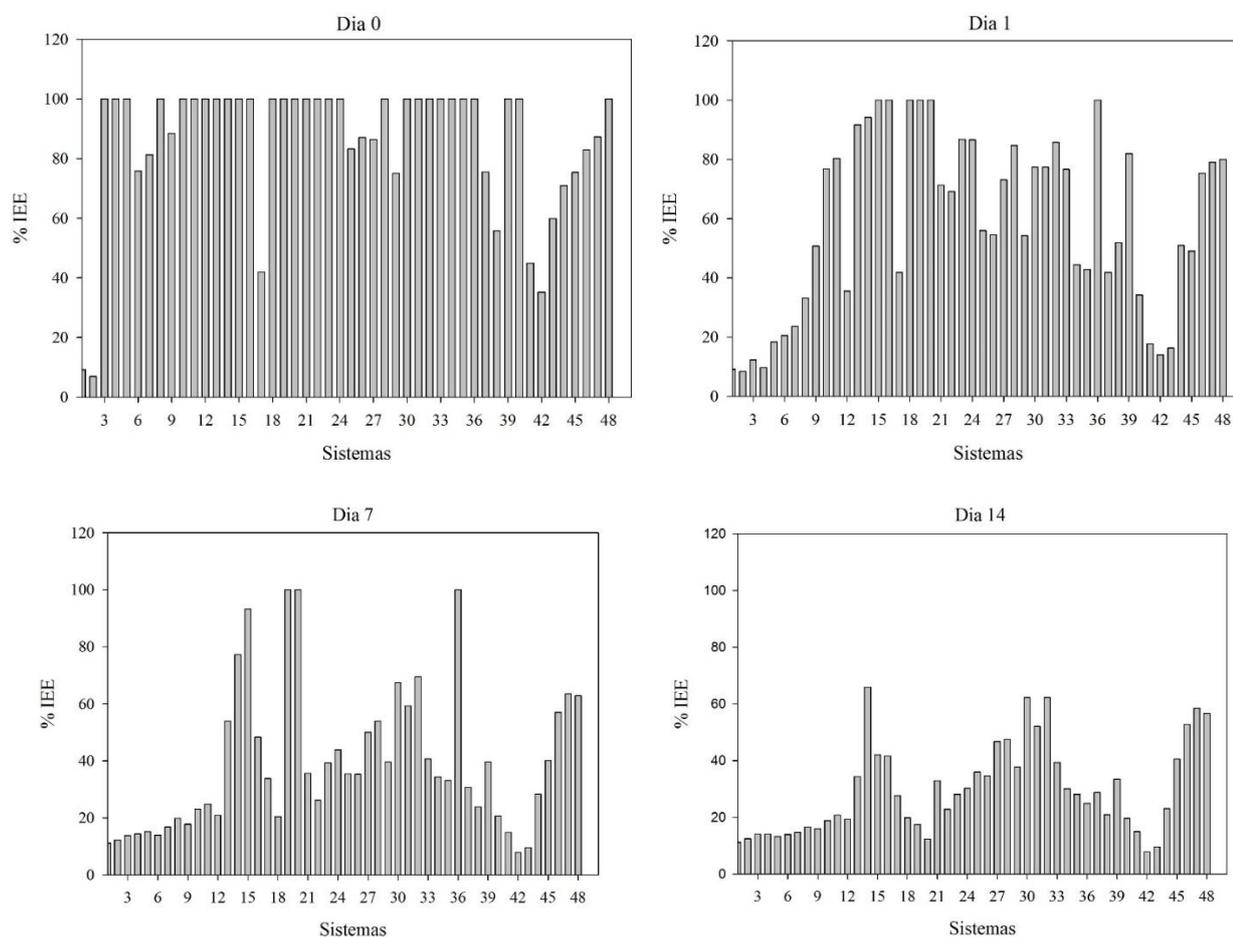
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Formação das Emulsão O/A

Das 48 formulações testadas, 29 apresentaram IEE igual a 100%, no dia 0 de análise, e, portanto, foram consideradas emulsões.

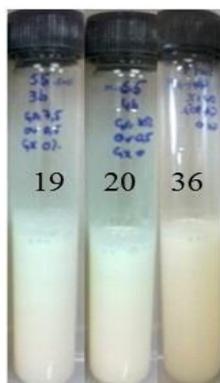
#### 3.2 Estabilidade da Emulsão

A estabilidade das emulsões foi determinada pelo índice de estabilidade da emulsão (IEE), nos dias 0, 1, 7 e 14, e os resultados estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7** IEE dos sistemas, nos dias 0, 1, 7 e 14 de análise, armazenados à temperatura constante de 25°C.

Os sistemas 19 (OV 0,5%GA7,5%), 20 (OV 0,5%GA10%) e 36 (OV 1%GA10%), o equivalente a 6,25% do total das formulações testadas, apresentaram, à temperatura de 25°C, IEE igual a 100% por 7 dias (Figura 8A). Os sistemas 15 (GX 0,5GA7,5%), 16 (GX 0,5GA10%) e 18 (OV 0,5%GA5%), ou 6,25%, apresentaram o mesmo índice por 2 dias (Figura 8B), e os sistemas de 3 a 5; 10 a 14; 21 a 24; 28; 30 a 35; 39, 40 e 48 ou 45,83%, por 1 dia (Figura 8C). Os sistemas 1, 2, 6, 7, 9, 17; 25 a 27; 29, 37, 38 e; 41 a 47, ou 39,58%, apresentaram separação de fases no dia 0 de análise (Figura 8D).



**A**



**B**



**C**



**D**

**Figura 8 A:** Fotografias, da esquerda para direita, dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 7; **B:** Fotografias, da esquerda para direita, dos sistemas 15, 16 e 18, no dia 1; **C:** Fotografias, da esquerda para direita, em ordem crescente, dos sistemas 3 a 5; 10 a 14; 21 a 24; 28; 30 a 35; 39, 40 e 48, no dia 0; **D:** Fotografias, da esquerda para direita, em ordem crescente, dos sistemas 1, 2, 6, 7, 9, 17; 25 a 27, 29, 37, 38; 41 a 47, no dia 0.

Em um estudo conduzido por Mine; Noutomi; Haga (1991) reportaram que emulsões O/A, foram instáveis quando a concentração de ovalbumina foi inferior a 0,5% (m/m). Dentre os sistemas avaliados, os que apresentaram estabilidade pelo maior período (sistemas 19, 20 e 36) continham concentração mínima de 0,5% (m/m) de OV, indicando relação dessa proteína com a estabilidade do sistema.

A estabilidade da emulsão foi negativamente correlacionada com a presença de GX, uma vez que todas as emulsões que a continham desestabilizaram rapidamente. Ao contrário, Iosseoglou et al. (2006) reportaram que o aumento da estabilidade de emulsões contendo OV e GX foi alcançado com concentrações de OV de 2,5% e de GX, a partir de 0,1%. É possível que a qualidade do óleo utilizado, como fase óleo nesse estudo, explique em parte esse resultado.

Mirhosseini et al (2008) ao estudarem o efeito da GA e da GX sobre a estabilidade de bebidas emulsionadas do tipo O/A, contendo como fase dispersa óleo de laranja, reportaram correlação negativa da GA e positiva da GX com a estabilidade das emulsões, e predisseram a seguinte combinação de componentes para obtenção da maior estabilidade (IEE igual 100%) das emulsões estudadas: 10,78% (m/m) de GA, 0,56% (m/m) GX e 12,02% (m/m) de óleo de laranja. Uma formulação similar, foi testada contendo 10% (m/m) de GA, 0,5% de GX (m/m) e 10% (m/m) de óleo de soja (sistema 16), a qual permaneceu estável (IEE igual a 100%) por 1 dia (dia 0 e dia 1), conforme demonstrado na Figura 8B.

Desplanques et al. (2014) estudaram o efeito estabilizante da GA sobre a conformação helicoidal da estrutura da GX em solução aquosa, com razão entre GA e GX de 10:1, respectivamente. Os autores não observaram separação de fase e nem modificação das propriedades reológicas da GX, quando a GA foi a ela adicionada, à temperatura ambiente. Nas emulsões avaliadas, as que apresentaram razão equivalente à estudada pelos referidos autores, foram os sistemas 9 (GX 0,25%GA2,5%) e 14 (GX 0,5%GA5%), os quais apresentaram separação de fase no dia 1. Outros componentes utilizados nas formulações e/ou o método de formação de emulsão utilizado, pode ter contribuído para diminuição da estabilidade das emulsões.

Conforme reportado por Mcnamee; Riordan; Sullivan (1998), as emulsões que apresentaram estabilidade pelo maior período de tempo foram as que tiveram em suas formulações razão de GA e OS de 0,75:1 e 1:1, respectivamente, embora o tamanho médio das partículas foram na ordem de micrômetros.

Em um estudo de emulsões O/A estabilizadas por proteína e polissacarídeo, Bouyer; Mekhloufi; Huang (2013) utilizaram 30% de óleo de amêndoa doce, como fase óleo. A relação de proteína ( $\beta$ -lactoglobulina) e polissacarídeo (GA) foi de 2:1, e a separação de fases dos sistemas ocorreu no dia 3 de análise. Utilizando-se óleo de soja, em menor concentração (10%), proteína emulsificante diferente (ovalbumina) e relação de proteína e polissacarídeo inversa e de maior magnitude 1:15 e de 1:10, observou-se estabilidade de sete dias.

### **3.3 Tamanho Médio das Partículas (Diâmetro Hidrodinâmico)**

Na Tabela 5 são apresentados os valores de tamanho médio das partículas e de PDI dos sistemas 19, 20 e 36, nos dias 0, 1 e 7.

**Tabela 5** Valores de tamanho médio das partículas e de PDI dos sistemas 19, 20 e 36, nos dias 0, 1 e 7\*

| Dia | Tamanho de partícula (nm) / (PDI) |                          |                          |
|-----|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|     | Sistema 19                        | Sistema 20               | Sistema 36               |
| 0   | 1072 <sup>Ab</sup> (0,4)          | 1151 <sup>Ac</sup> (0,4) | 1067 <sup>Ab</sup> (0,4) |
| 1   | 1431 <sup>ABa</sup> (0,3)         | 1319 <sup>Bb</sup> (0,3) | 1547 <sup>Aa</sup> (0,3) |
| 7   | 1428 <sup>Ba</sup> (0,3)          | 1463 <sup>Ba</sup> (0,3) | 1633 <sup>Aa</sup> (0,3) |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, e maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste de Duncan).

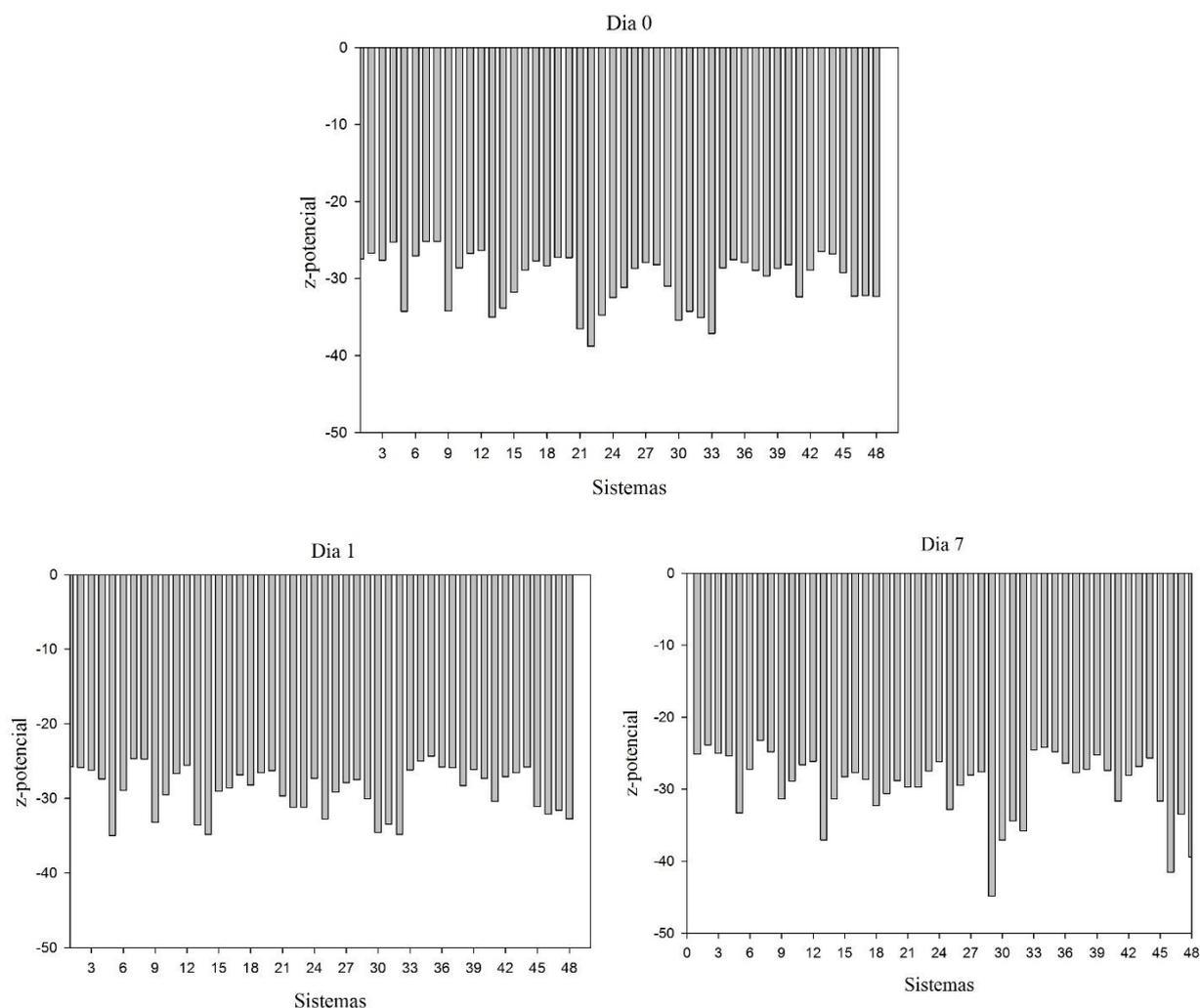
No geral, os sistemas apresentaram valor de PDI acima de 0,2, o que sugere serem sistemas polidispersos, devido a distribuição de tamanho de partícula heterogênea (SILVA et al., 2011; ZEEB; WEISS; JULIAN, 2015).

Os três sistemas apresentaram aumento do tamanho de partícula ao longo dos dias analisados, sendo que os sistemas 19 e 36 não apresentaram aumento significativo entre o dia 1 e 7, o que indica ter ocorrido maior estabilidade à coalescência das gotas dispersas (MIRHOSSEINI; TAN, 2010). No dia 0, não houve diferença significativa entre os tamanhos de partículas dos três sistemas, porém no dia 1 e 7, em comparação aos demais, o sistema 36 apresentou o maior tamanho de partícula. Esses resultados indicam que o maior tamanho de partícula se correlacionou com a maior concentração de biopolímeros presente no sistema, principalmente OV.

Os três sistemas podem ser classificados como macroemulsões ou emulsões convencionais, devido ao tamanho médio de partículas que apresentaram (entre 100 nm a 100  $\mu\text{m}$ ), ao tempo de estabilidade (metaestáveis) e pela aparência opaca (MCCLEMENTS, 2011).

### 3.4 Potencial Zeta ( $\zeta$ -Potencial)

A medida do potencial zeta pode prever tendência à floculação (valor absoluto menor que 25 mV) ou não (valor absoluto maior que 25 mV) em emulsões, uma vez que a estabilidade desses sistemas é, também, influenciada pela carga elétrica interfacial (GÜZEY; MCCLEMENTS, 2006; MIRHOSSEINI et al., 2008). Os resultados dos valores de potencial zeta das emulsões, nos dias 0, 1 e 7, são apresentados na Figura 9.



**Figura 9** Valor de potencial zeta dos sistemas armazenados à 25°C, nos dias 0, 1 e 7 de análise.

O valor médio de potencial zeta das emulsões com IEE igual a 100% nos dias 0 e 1 de análise, foi de -25 mV ou menor, o que indica contribuição da carga negativa desses sistemas, pela GX, um polissacarídeo aniônico, e também pela GA, devido aos resíduos de ácidos glucurônico presente em sua estrutura molecular, os quais conferem carga negativa à molécula, quando em pH acima de 2 (BOUYER et al., 2012; BOUYER; MEKHLOUFI; HUANG, 2013).

Mesmo apresentando valor absoluto de potencial zeta igual ou maior que 25 mV, parece não ter sido esse parâmetro, o fator limitante para a estabilidade eletrostática desses sistemas, uma vez que as emulsões que separaram de fases no dia 0 ou 1 de análise, apresentaram, no geral, valor absoluto igual ou maior que 25 mV. Por outro lado, os sistemas 19, 20 e 36, que apresentaram IEE igual a 100% por 7 dias, apresentaram valor absoluto de potencial zeta maior que o referido, corroborando a influência do potencial zeta com a estabilidade eletrostática das emulsões. Nos dias 0, 1 e 7, o valor de potencial zeta desses sistemas praticamente de manteve constante (não houve diferença significativa. Porém, o valor absoluto ainda se manteve acima de 25 mV. Os sistemas que apresentaram o maior valor absoluto de potencial zeta no dia 7, foram os sistemas 19 e 20, os mesmos que

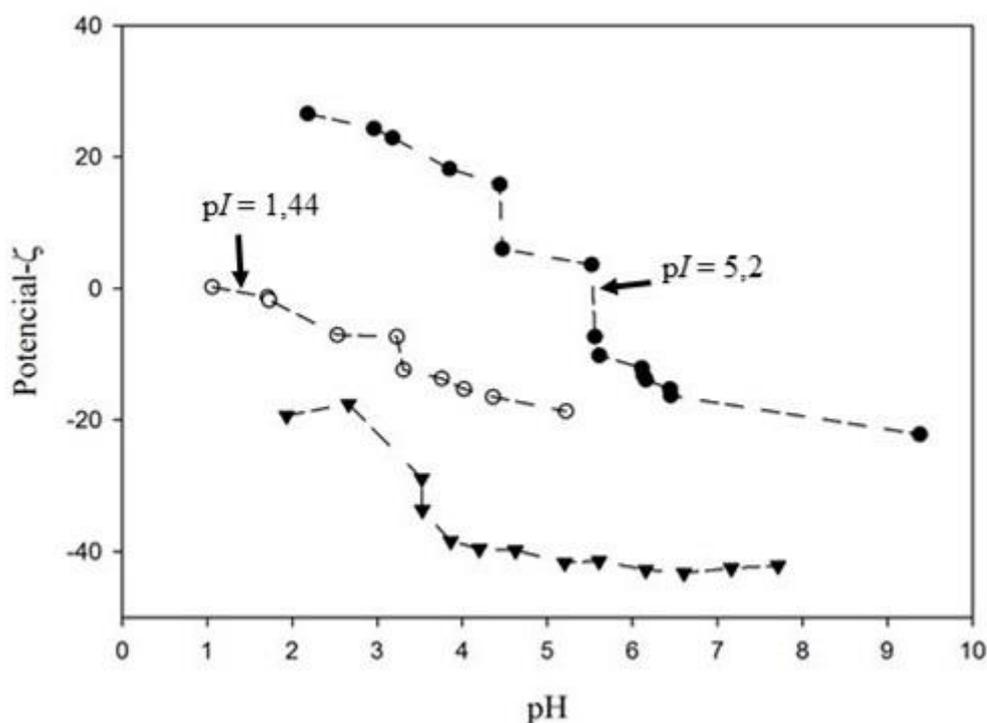
apresentaram o menor tamanho de partícula para o mesmo dia. Na Tabela 6 são apresentados os valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, nos dias 0, 1 e 7.

**Tabela 6** Valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, nos dias 0, 1 e 7\*

| ζ-potencial (mV) |                     |                      |                     |
|------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Dia              | Sistema 19          | Sistema 20           | Sistema 36          |
| 0                | -27,3 <sup>Aa</sup> | -27,3 <sup>Aa</sup>  | -27,9 <sup>Ab</sup> |
| 1                | -26,5 <sup>Ba</sup> | -26,3 <sup>ABa</sup> | -25,8 <sup>Aa</sup> |
| 7                | -30,6 <sup>Bb</sup> | -28,8 <sup>ABb</sup> | -26,4 <sup>Aa</sup> |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, e maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste de Duncan).

Nakauma et al (2008) reportaram que a diminuição dos valores absolutos do potencial zeta em sistemas com pH abaixo de 3 pode contribuir para a diminuição da estabilidade da emulsão. Abaixo desse valor de pH, as emulsões estabilizadas com biopolímeros, como a GA e as proteínas, floculam ou coalescem no ponto isoelétrico dos primeiros, e não das proteínas, o que resulta em diminuição da força de repulsão eletrostática, predominando, a partir de então, a força atrativa de van der Waals. O mecanismo de desestabilização dos sistemas estudados não parece ter sido este, uma vez que apresentaram pH de 3,86. É provável que a desestabilização das emulsões estudadas se correlacionou mais com o tamanho de partícula gerado. Na Figura 10 são apresentados os pontos isoelétricos (pI) da OV, GX e GA.



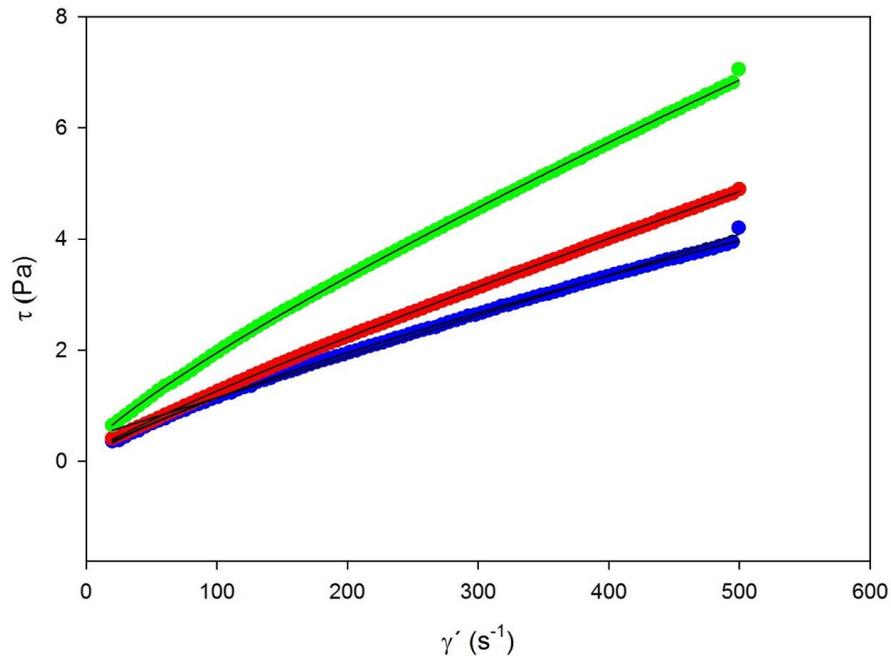
**Figura 10** Ponto isoelétrico (pI) dos biopolímeros OV, GX e GA. OV: (●); GA: (○); GX: (▼).

Jayme; Dunstan; Gee (1999) ao estudarem o efeito da GA na estabilidade de microemulsões O/A, concluíram que esse biopolímero apresentou duas formas de intervenção positiva sobre a estabilidade do sistema; uma por força de repulsão estérica (estrutural) e outra eletrostática (carga negativa). O pI da GA foi de 1,44 indicando que esse biopolímero apresentou carga negativa em todos os sistemas, uma vez que o pH médio das emulsões foi de

3,86. Portanto, nas concentrações estudadas, a GA parece ter contribuído mais que a GX, para a estabilidade eletrostática, uma vez que os sistemas que continham GA e OV, permaneceram estáveis por mais tempo, do que aqueles que continham GX e OV. Por outro lado, a OV apresentou  $pI$  de 5,2 e contribuiu com carga positiva para o sistemas (GUZEY; MCCLEMENTS, 2006).

### 3.5 Propriedades Reológicas

As propriedades reológicas foram determinadas para os sistemas 19, 20 e 36. As curvas de escoamento desses sistemas são apresentadas na Figura 11, e os valores dos parâmetros de ajuste aos diferentes modelos reológicos testados, na Tabela 7.



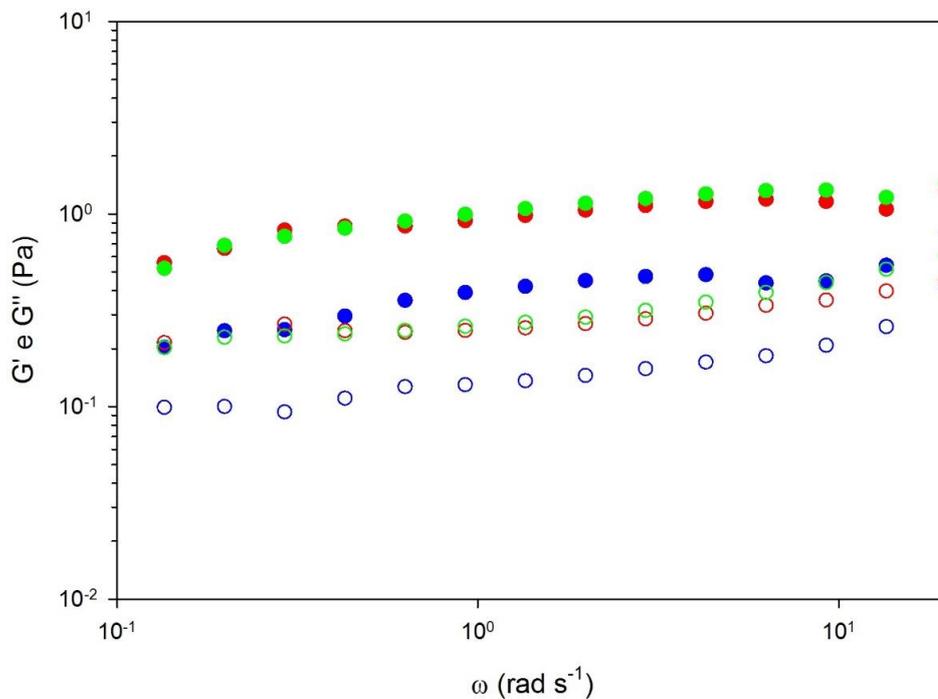
**Figura 11** Curvas de escoamento dos sistemas 19 (azul), 20 (vermelho) e 36 (verde).

**Tabela 7.** Parâmetros de ajuste aos diferentes modelos reológicos, dos sistemas 19, 20 e 36.

| Modelo           | Parâmetros               | Sistema 19 | Sistema 20 | Sistema 36 |
|------------------|--------------------------|------------|------------|------------|
| Newton           | $\eta$ (Pa.s)            | 0,00857    | 0,01021    | 0,01471    |
|                  | $R^2$                    | 0,9822     | 0,9918     | 0,9836     |
| Ostwald de Waele | $K$ (Pa.s <sup>n</sup> ) | 0,03238    | 0,02673    | 0,05365    |
|                  | $n$                      | 0,7737     | 0,8361     | 0,7797     |
|                  | $R^2$                    | 0,9994     | 0,9997     | 0,9997     |
| Bingham          | $\tau_0$ (Pa)            | 0,3725     | 0,3211     | 0,624      |
|                  | $K$ (Pa.s)               | 0,007458   | 0,009248   | 0,01285    |
|                  | $R^2$                    | 0,9972     | 0,999      | 0,9978     |
| Herschel-Bulkley | $\tau_0$ (Pa)            | 0,08768    | 0,1188     | 0,1674     |
|                  | $K$ (Pa.s <sup>n</sup> ) | 0,0253     | 0,01972    | 0,04059    |
|                  | $n$                      | 0,8105     | 0,882      | 0,821      |
|                  | $R^2$                    | 0,9996     | 0,9999     | 0,9998     |

Adotando-se os valores de tensão crítica ( $\tau_0$ ) igual a zero, e por apresentarem os sistemas, índice de comportamento menor que 1, é possível afirmar que, em todos os casos, o modelo de Ostwald de Waele ajustou-se aos parâmetros analisados. O comportamento de fluido pseudoplástico (uma vez que a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da taxa de deformação aplicada) é comumente observado na maioria das emulsões (PERRICHIL, 2008; BOUYER et al., 2012).

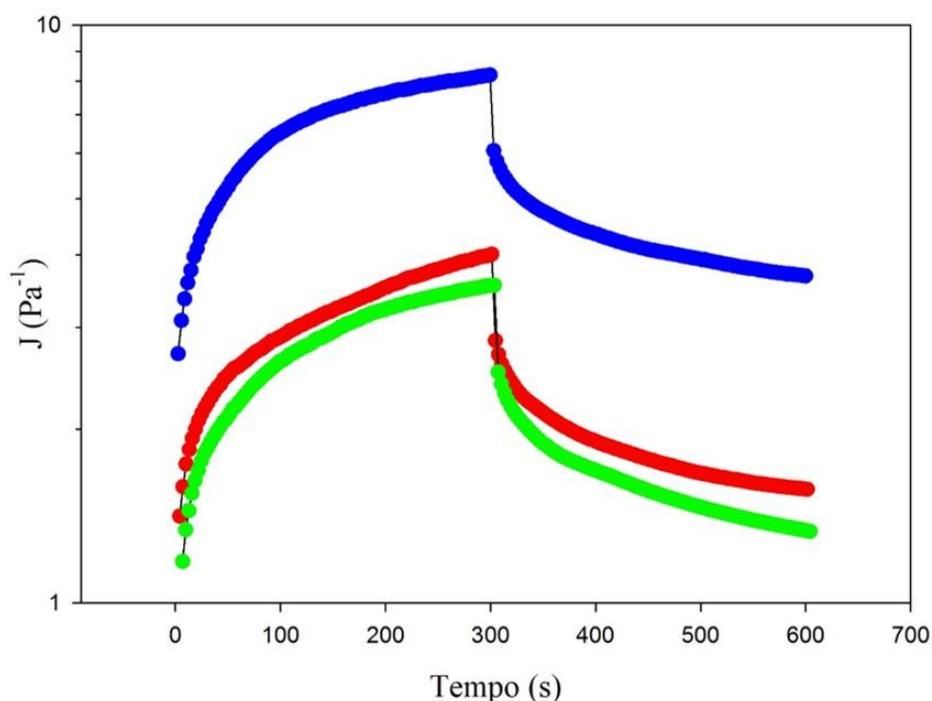
As medidas do módulo elástico ( $G'$ ) e do módulo viscoso ( $G''$ ) em função da velocidade angular (Figura 12), determinaram o comportamento viscoelástico das emulsões. Os testes foram realizados com valores de tensão dentro da região de viscoelasticidade linear ( $\tau=0,05$  Pa), a fim de se evitar danos às estruturas das amostras (GARCÍA et al., 2014).



**Figura 12** Módulo elástico ( $G'$ - símbolo fechado) e módulo módulo viscoso ( $G''$ - símbolo aberto), em função da velocidade angular, dos sistemas 19 (azul), 20 (vermelho) e 36 (verde).

Os três sistemas apresentaram  $G'$  maior que  $G''$ , indicando um comportamento de solução concentrada (PERRICHIL, 2008) ou elástico, semelhante a um sistema coloidal carregado (FARIA et al., 2013; ZETZL et al., 2014; GARCÍA et al., 2014) Os sistemas 20 e 36 apresentaram módulos elástico similares, porém, maiores que o do sistema 19, sugerindo que a concentração de GA teve maior influência que a OV, em relação a viscosidade das emulsões (PATEL et al., 2015).

Na Figura 13 são apresentados os testes de *creep recovery* dos sistemas 19, 20 e 36, resultado do valor de compliância ( $J$ ) e relação ao tempo.



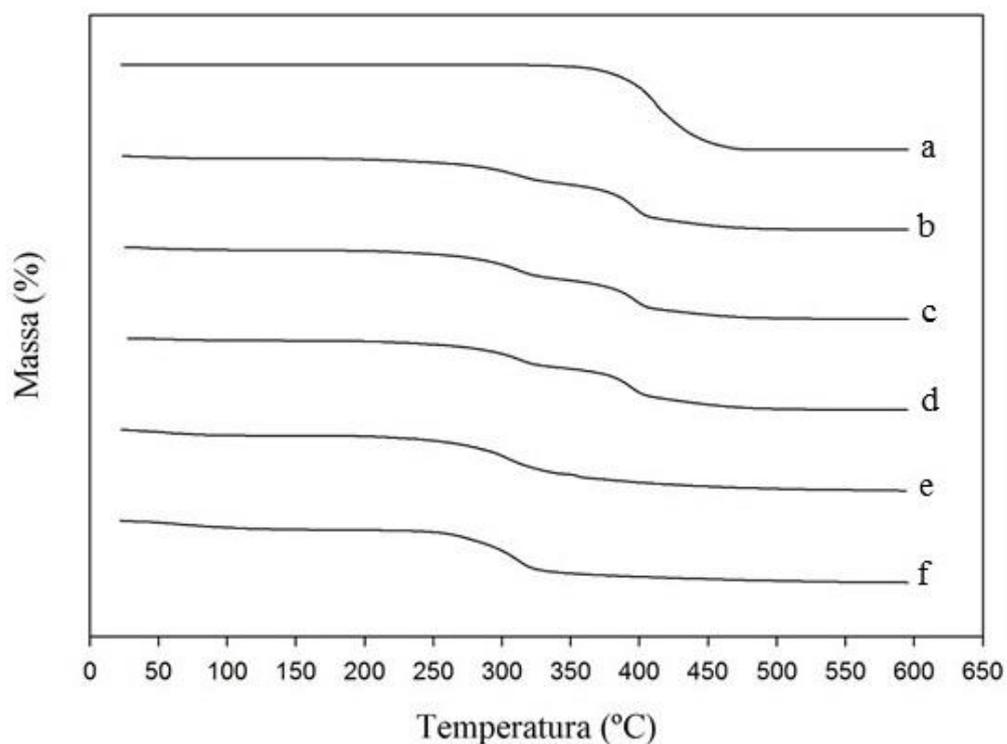
**Figura 13** Teste de creep recovery dos sistemas 19 (azul), 20 (vermelho) e 36 (verde).

O sistema 19 apresentou maior pico de deformação e menor recuperação durante o tempo de relaxação, em comparação aos sistemas 20 e 36. Por isso, apresentou menor viscosidade, o que pode ser explicado pela menor concentração de GA em sua formulação, já que os sistemas 20 e 36, que continham a mesma concentração de GA, apresentaram pico de deformação e de recuperação similares. Este teste corroborou os resultados dos testes de viscoelasticidade, e por isso, pode-se inferir que a concentração de GA influenciou os componentes viscoso e elástico das emulsões estudadas, e a estabilidade da emulsão em relação ao aumento da viscosidade da fase aquosa, com consequente inibição dos movimentos das gotas dispersas (PATEL et al., 2015).

Boyd et al (2009) observaram alteração significativa das propriedades reológicas da GX quando em mistura com outro polissacarídeo aniônico (acima de sua concentração crítica) foi misturado a ela. A consequência dessa interação foi a diminuição da viscoelasticidade da mistura, e consequentemente, separação de fase, devido a formação de uma estrutura não funcional. Dentre os sistemas avaliados, os que continham GA e GX foram menos estáveis.

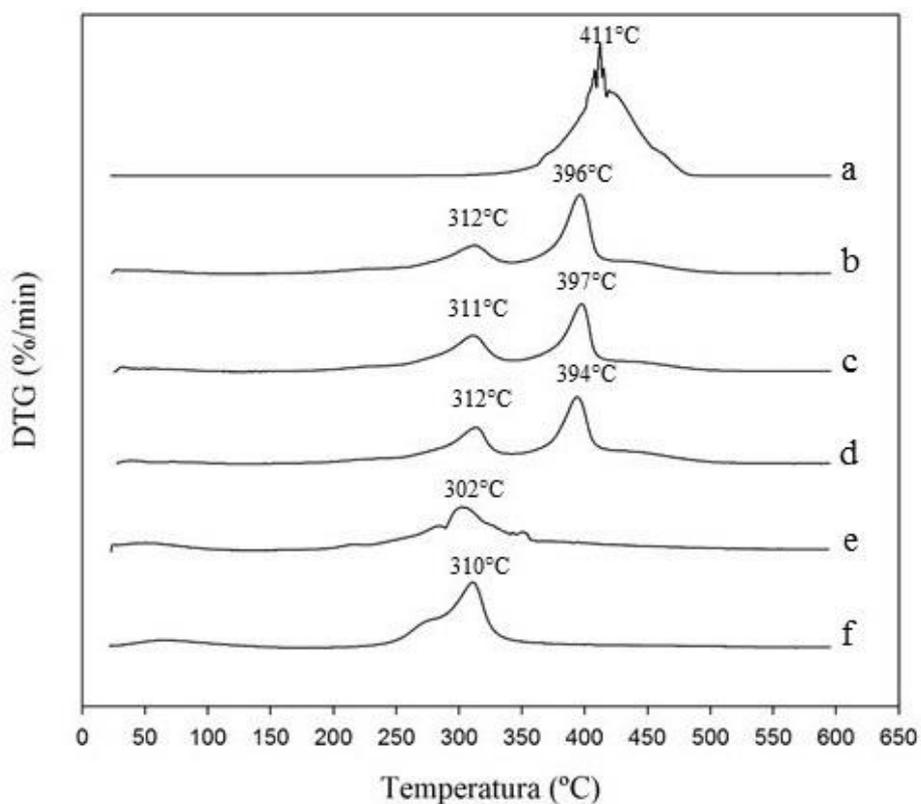
### 3.6 Propriedades Térmicas

Essa análise foi realizada nos sistemas que apresentaram IEE igual a 100% por 7 dias (sistemas 19, 20 e 36), bem como de seus componentes constituintes: OS, OV e GA. Os diagramas termogravimétricos do OS (Figura 14a) da OV (Figura 14e) e da GA (Figura 14f) apresentaram apenas uma etapa de perda de massa, e dos sistemas 19, 20 e 36 (Figura 14b-d), respectivamente, apresentaram duas etapas de perda de massa. À excessão do OS, a primeira etapa de perda de massa (50°C a 110°C) pode ser atribuída à perda de água ligada e adsorvida das moléculas. A segunda etapa de perda de massa dos sistemas 19, 20 e 36 (entre 300°C e 400°C), pode ser atribuída à desidratação e decomposição nos anéis sacarídeos da goma arábica (HOSSEINI et al., 2013).



**Figura 14** Diagramas termogravimétricos do OS (a), sistema 19 (b), sistema 20 (c), sistema 36 (d), OV (e) e GA (f).

A temperatura correspondente ao maior sinal de perda de massa pode ser observada por meio da primeira derivada da curva TGA (DTG) em relação ao tempo ou à temperatura (Figura 15).

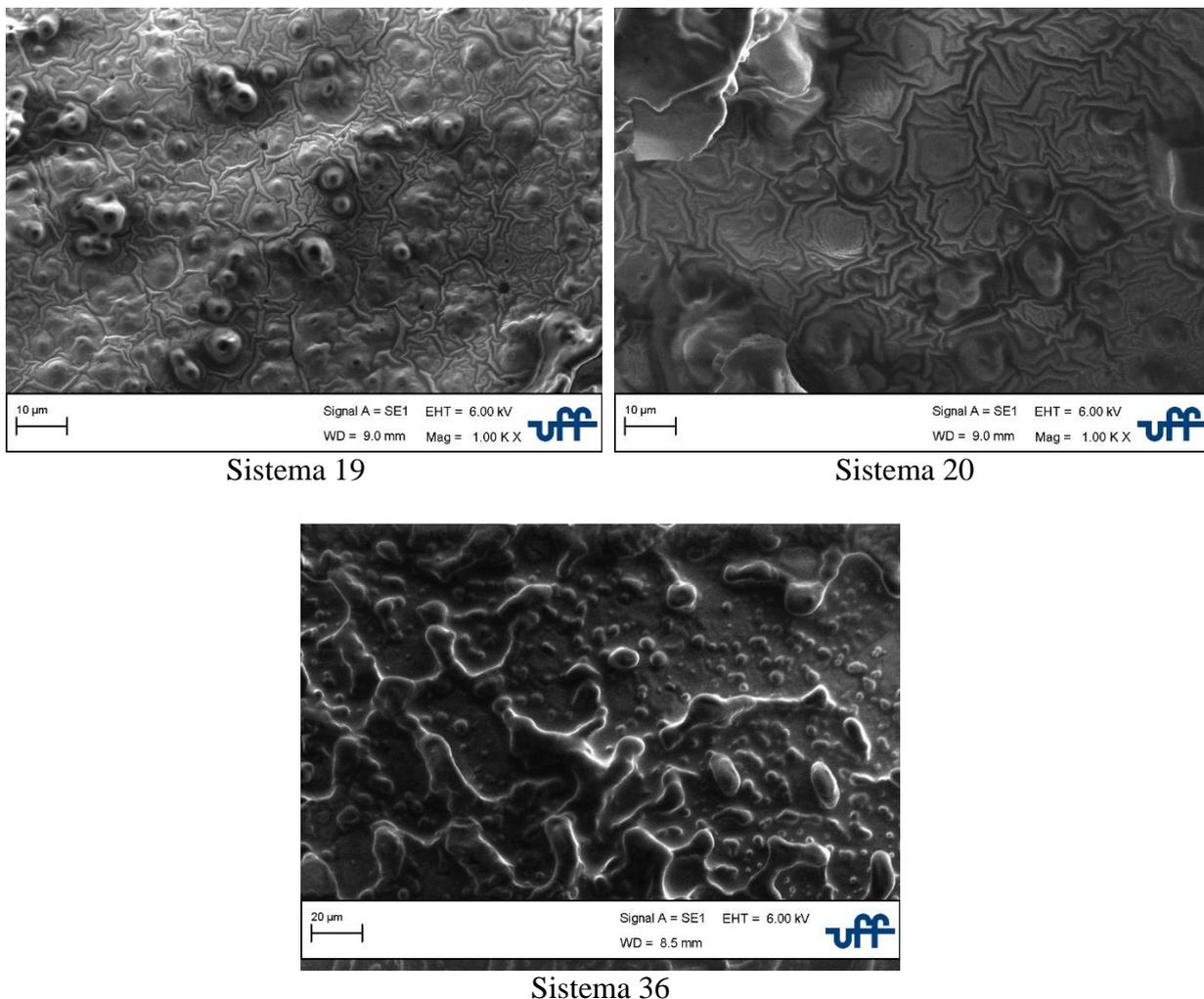


**Figura 15** DTG do OS (a), sistema 19 (b), sistema 20 (c), sistema 36 (d), OV (e) e GA (f).

A temperatura na qual ocorre a maior taxa de perda de massa, dos componentes do material analisado, é chamada de temperatura de degradação (TG). A degradação do OS iniciou-se à 340°C, atingindo o máximo à 411°C (Figura 15a). Os sistemas 19 (Figura 15b), 20 (Figura 15c) e 36 (Figura 15d) apresentaram duas etapas de degradação, à 312°C e 396°C, 311°C a 397°C e 312°C e 394°C, respectivamente. Portanto, não houve correlação positiva de concentração de biopolímero com resistência térmica. A OV apresentou uma etapa de degradação, a qual se iniciou à 190°C, atingindo o máximo à 302°C (Figura 15e). A GA apresentou uma etapa de degradação, a qual se iniciou à 200°C, conforme também reportado por Cozic et al (2009). Essa temperatura refere-se à degradação de polissacarídeos da molécula. A temperatura máxima de degradação da GA ocorreu à 310°C (Figura 15f). À excessão do OS, os três sistemas apresentaram resistência térmica maior que a de seus constituintes isoladamente, indicando haver uma contribuição dos biopolímeros nesse aspecto.

### 3.7 Observação morfológica das emulsões

As imagens de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 1000 vezes dos sistemas 19, 20 e 36, são apresentadas na Figura 16.



**Figura 16** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (aumento de 1000 vezes) dos sistemas 19, 20 e 36.

Pela imagem do sistema 19, é possível observar a morfologia das cápsulas de gotas de óleo adsorvidas e circundadas pelos biopolímeros OV e GA (processo de emulsificação). Mesmo apresentado, os três sistemas, o mesmo tempo de estabilidade à separação de fases, a maior quantidade de biopolímero no sistema 36, pode contribuir para a formação de uma estrutura mais resistente à instabilidade física, como observado nos testes reológicos.

#### 4 CONCLUSÕES

O método utilizado foi adequado para formar emulsões O/A, com os componentes pesquisados. O maior período de tempo de estabilidade à separação de fases, ocorreu em sistemas com GA e OV, e em ausência de GX. O comportamento reológico semelhante ao da maioria das emulsões alimentícias, indica um potencial para aplicação tecnológica dos sistemas compostos por GA e OV. Dessa forma podem tornar-se uma interessante opção para a elaboração de novos produtos, fortificados e suplementados de vários nutrientes, como o ácido graxo  $\omega$ -3, os carotenóides e as vitaminas lipossolúveis.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; HUANG, N. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects. Lactoglobulin , gum arabic , and xanthan gum for emulsifying sweet almond oil : Formulation and stabilization mechanisms of pharmaceutical emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 433, p. 77–87, 2013.

BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 359–378, 2012.

BOYD, M. J.; HAMPSON, F. C.; JOLLIFFE, I. G.; DETTMAR, P. W.; MITCHELL, J. R.; MELIA, C. D. Strand-like phase separation in mixtures of xanthan gum with anionic polyelectrolytes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2458–2467, 2009.

COZIC, C.; PICTON, L.; GARDA, M. R.; MARLHOUX, F.; LE CERF, D. Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1930–1934, 2009.

DESPLANQUES, S.; GRISEL, M.; MALHIAC, C.; RENO, F. Stabilizing effect of acacia gum on the xanthan helical conformation in aqueous solution. **Food hydrocolloids**, v. 35, p. 181–188, 2014.

FARIA, J. T. De; PAULA, V.; MINIM, R.; MINIM, L. A. Food Hydrocolloids Evaluating the effect of protein composition on gelation and viscoelastic characteristics of acid-induced whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 64–71, 2013.

GARCÍA, M. C.; ALFARO, M. C.; CALERO, N.; MUÑOZ, J. Influence of polysaccharides on the rheology and stabilization of  $\alpha$ -pinene emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, n. 1, p. 177–183, 2014.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M. Ultrasound-assisted formation of the canthaxanthin emulsions stabilized by arabic and xanthan gums. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 21–30, 1 jul. 2013.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by beta-lactoglobulin-pectin complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 475–85, 24 jan. 2007.

GÜZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin-pectin and  $\beta$ -lactoglobulin-pectin-chitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique. **Food Biophysics**, v. 1, n. 1, p. 30–40, 2006.

HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–6, 5 jun. 2013.

- IOSSEOGLOU, V. A. K. Stability of Acidic Egg White Protein Emulsions Containing Xanthan Gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 10164–10169, 2006.
- JAYME, M. ; DUNSTAN, D. .; GEE, M. . Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 6, p. 459–465, nov. 1999.
- MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297, 2011.
- MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active compounds**. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- MCNAMEE, B. F.; RIORDAN, E. D. O.; SULLIVAN, M. O. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4551–4555, 1998.
- MINE, Y.; NOUTOMI, T.; HAGA, N. Emulsifying and Structural Properties of Ovalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 443–446, 1991.
- MIRHOSSEINI, H.; PING, C.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum , xanthan gum and orange oil contents on  $\zeta$  -potential , conductivity , stability , size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 315, p. 47–56, 2008.
- MIRHOSSEINI, H.; TAN, C.; HAMID, N.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil on flavor release from diluted orange beverage emulsion. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1161–1172, 26 set. 2007.
- MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P. Discrimination of orange beverage emulsions with different formulations using multivariate analysis. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 90, n. 8, p. 1308–16, jun. 2010.
- NAKAUMA, M.; FUNAMI, T.; NODA, S.; ISHIHARA, S.; AL-ASSAF, S.; NISHINARI, K.; PHILLIPS, G. O. Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1254–1267, out. 2008.
- NIU, F.; SU, Y.; LIU, Y.; WANG, G.; ZHANG, Y.; YANG, Y. Ovalbumin-gum arabic interactions: effect of pH, temperature, salt, biopolymers ratio and total concentration. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 113, p. 477–82, 1 jan. 2014.
- PATEL, A. R.; DUMLU, P.; VERMEIR, L.; LEWILLE, B.; LESAFFER, A.; DEWETTINCK, K. Rheological characterization of gel-in-oil-in-gel type structured emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 84–92, 2015.
- PERRECHIL, F. DE ASSIS. Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí. 2008. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, M. D. S.; COCENZA, D. S.; GRILLO, R.; MELO, N. F. S. De; TONELLO, P. S.; OLIVEIRA, L. C. De; CASSIMIRO, D. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1-3, p. 366–374, 2011.

WANG, X.; LIU, F.; LIU, L.; WEI, Z.; YUAN, F.; GAO, Y. Physicochemical characterisation of  $\beta$ -carotene emulsion stabilised by covalent complexes of  $\alpha$ -lactalbumin with (À)-epigallocatechin gallate or chlorogenic acid. **Food Chemistry**, v. 173, p. 564–568, 2015.

YOU, D.; HUCK, J.; YOUNG, J.; JHON, G.; SUK, H. Nitric Oxide Effect of nitric oxide on conformational changes of ovalbumin accompanying self-assembly into non-disease-associated fibrils. **Nitric Oxide**, v. 47, p. 1–9, 2015.

ZEEB, B.; WEISS, J.; JULIAN, D. Electrostatic modulation and enzymatic cross-linking of interfacial layers impacts gastrointestinal fate of multilayer emulsions. **Food Chemistry**, v. 180, p. 257–264, 2015.

ZETZL, A. K.; GRAVELLE, A. J.; KURYLOWICZ, M.; DUTCHER, J.; BARBUT, S.; MARANGONI, A. G. ScienceDirect Microstructure of ethylcellulose oleogels and its relationship to mechanical properties. **Food Structure**, p. 1–14, 2014.

## **CAPÍTULO II**

### **ENCAPSULAMENTO DE $\beta$ -CAROTENO EM EMULSÃO O/A ESTABILIZADA COM GOMA ARÁBICA E OVALBUMINA**

## RESUMO

Nas últimas décadas, as emulsões têm sido amplamente utilizadas por diferentes indústrias, no encapsulamento, no transporte e na liberação controlada de vários componentes bioativos, como nutracêuticos, vitaminas, minerais e fármacos. A utilização de biopolímeros na produção de emulsões se tornou promissora, principalmente para as indústrias de alimentos, uma vez que esses compostos são inócuos ou de baixa toxicidade. Ainda, as emulsões óleo em água (O/A) permitem a veiculação de componentes lipofílicos em matrizes com alta concentração de água, como são os alimentos, facilitando estratégias como a fortificação e a suplementação desses componentes, como é o caso do  $\beta$ -caroteno. Os objetivos da pesquisa apresentada nesse capítulo foram: encapsular e avaliar a eficiência de encapsulamento e de retenção do  $\beta$ -caroteno sintético (à 25°C e 55°C) em emulsões O/A, estabilizadas por OV e GA; caracterizar os sistemas encapsuladores formados e avaliar suas estabilidades, à 25°C e 55°C, em relação à separação de fases. As emulsões foram elaboradas por técnica de emulsificação, composta de dois passos: pré homogeneização em ultraturrax e homogeneização em ultrassom. Os dados obtidos foram tratados pela análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan e t de Student, com valor de  $p < 0,05$ . À 25°C todos os sistemas apresentaram IEE igual a 100% por 7 dias. Porém, a 55°C o sistema com 1% de OV e 10% GA, ainda que com maior tamanho de partícula e menor valor de potencial zeta, foi o único que apresentou o mesmo índice por 7 dias. Os sistemas estudados podem ser classificados como macroemulsões ou emulsões convencionais, devido ao tamanho de partícula obtido (entre 0,1  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ ) e à aparência opaca apresentada. A eficiência de encapsulamento (EE) foi maior no sistema com 0,5% de OV e 10% de GA (50,2%). Porém, ao final da análise, a eficiência de retenção (ER) do  $\beta$ -caroteno, à 25°C e à 55°C, foi maior no sistema com 1% de OV e 10% de GA (40,2% e 0,1%, respectivamente). A concentração de OV, portanto, correlacionou-se positivamente, tanto com a estabilidade à separação de fases, quanto com a eficiência de retenção do  $\beta$ -caroteno. Por outro lado, para este, o aumento da temperatura de armazenamento em 30°C, diminuiu a ER em 40%.

**Palavras-chave:** Carotenóides, Microencapsulamento, Eficiência de retenção.

## ABSTRACT

In recent decades, the emulsions have been widely used by different industries, in packaging, delivery and controlled release of various bioactive components, such as nutraceuticals, vitamins, minerals and pharmaceuticals. The use of biopolymers for the production of emulsions become promising, especially for the food industry, since these compounds are safe and lower toxicity. Moreover, the type of oil in water emulsions (O/W) allows the placement of lipophilic components in arrays with a high concentration of water, as are the food, facilitating strategic the fortification and supplementation of these components, as is the case of  $\beta$ -carotene. The research aims presented and discussed in this chapter were: to encapsulate and to evaluate encapsulation efficiency and retention efficiency (at temperature of 25°C and 55°C) of synthetic  $\beta$ -carotene in O/W emulsion, stabilized by OV and AG; to characterize and to evaluate the stability of formed encapsulating systems at 25°C e 55°C, according to phase separation. The emulsions were prepared by emulsifying technique comprises two steps: pre-homogenization in Ultraturrax and homogenization in Ultrasound. Data were processed by analysis of variance (ANOVA) and means compared by Duncan test and Student's t test, with  $p < 0.05$ . At 25°C, all the systems presented ESI equal to 100% for 7 days. However, at 55°C the system OV1%GA10%, although presented larger particle size and lower value of zeta potential, was the one which presented the same index for 7 days. The systems studied can be classified as macroemulsions or conventional emulsions due to the particle size (between 0.1  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$ ) and opaque appearance obtained. The encapsulation efficiency (EE) was higher in the system OV0,5%GA10% (50.2%). However, at the end of analysis, the system OV1%GA10% presented larger retention efficiency (RE) of  $\beta$ -carotene, at 25°C and 55°C, (40.2% and 0.1%, respectively). The concentration of OV, therefore, correlated positively with both stability to phase separation, and retention efficiency of  $\beta$ -carotene. Moreover, for this system, when storage temperature increased to 30°C, ER decreased by 40%.

**Key-words:** Carotenoids, Microencapsulation, Retention efficiency.

## 1 INTRODUÇÃO

Os carotenóides representam um grande grupo de pigmentos orgânicos tetraterpenóides, amplamente distribuídos na natureza, dos quais fazem parte o beta-caroteno ( $\beta$ -caroteno), a cantaxantina, a crocetina, a bixina, o licopeno, a  $\beta$ -criptoxantina, a luteína, entre outros. São responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha da maioria das frutas e das folhas, e de algumas flores. Em alimentos processados, são utilizados como corantes em queijos (bixina) e manteiga ( $\beta$ -caroteno), por exemplo (BOBBIO; BOBBIO, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; SCHWARTZ; VON ELBE; GIUSTI, 2010). Possuem cadeia carbônica altamente insaturada, o que lhes confere maior suscetibilidade às reações de isomerização e de degradação oxidativa. Essas reações são aceleradas pelo calor (por exemplo, branqueamento), luz, ácido, adsorção em superfície de alumina e oxigênio. As consequências dessas reações são perda de cor e de atividade pró-vitamina A desses componentes (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

O  $\beta$ -caroteno é o carotenoide mais difundido entre os tecidos vegetais da natureza e desse grupo é o que possui maior atividade de pró-vitamina A. Essa atividade diferenciada se deve aos dois anéis  $\beta$ -ionona presentes em sua estrutura molecular. Vegetais como a cenoura, abóbora e batata doce, são exemplos de fonte alimentar desse carotenoide.

Sua estrutura molecular também possui várias ligações insaturadas de hidrocarbonetos terpênicos, o que o torna, como os demais carotenoides, susceptível à degradação oxidativa. Devido a essa característica, o  $\beta$ -caroteno é muito utilizado como antioxidante, uma vez que estabiliza o oxigênio singlete (uma espécie altamente reativa de oxigênio), e protege as células do processo de oxidação. É degradado também pelo calor e em meio ácido.

Também, é muito utilizado como corante em alimentos, tanto na forma natural, quanto na forma sintética, e apresenta função de corante mais estável quando complexado com proteínas (BOBBIO; BOBBIO, 2001; SCHWARTZ; VON ELBE; GIUSTI, 2010). É lipofílico, sendo, portanto, solúvel em óleos e em solventes orgânicos, como a acetona, clorofórmio, etanol, hexano e éter de petróleo. O comprimento de onda ultravioleta máximo de detecção do  $\beta$ -caroteno, com a utilização dos solventes etanol e hexano é de 450 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Nos últimos anos, muitos estudos sugeriram que o  $\beta$ -caroteno, quando consumido em quantidades adequadas, pode promover efeitos benéficos para a saúde humana, como a prevenção de certos tipos de câncer, doenças coronarianas, degeneração macular relacionada à idade, catarata e adenomas coloretais (XU et al., 2013). Essas informações aumentaram o interesse dos consumidores pelos alimentos-fonte desse carotenoide, e estimulando a indústria a desenvolverem novos alimentos enriquecidos (LEROUX et al., 2003; QIAN et al., 2012; YUAN et al., 2008; SCHWARTZ; VON ELBE; GIUSTI, 2010).

Vários sistemas, à base de emulsões, têm sido utilizados para o encapsulamento de componentes bioativos lipofílicos, como as microemulsões, nanoemulsões, emulsões de multicamadas e emulsões múltiplas. Inicialmente, esses componentes são incorporados na fase óleo, para posteriormente, formar-se as cápsulas, as quais são gotas de óleo com bioativo solubilizado, dispersas na fase aquosa do sistema.

O microencapsulamento do  $\beta$ -caroteno em emulsões pode aumentar sua proteção em relação aos fatores ambientais, principalmente durante o período de armazenamento, além de aumentar sua absorção e sua biodisponibilidade pelo organismo (ACOSTA, 2009; DE PAZ et al., 2012; XU et al., 2013). A melhor oferta desse carotenoide pode melhorar a qualidade dos tratamentos de doenças carenciais, bem como de estratégias de fortificação e de suplementação, principalmente, via alimentos ou outras matrizes inócuas, com alto teor de água.

Os objetivos do trabalho apresentado nesse capítulo são estudar o encapsulamento e a estabilidade do  $\beta$ -caroteno sintético em emulsões O/A, elaboradas com ovalbumina, óleo de soja e goma arábica, sob diferentes temperaturas, e caracterizar esses sistemas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

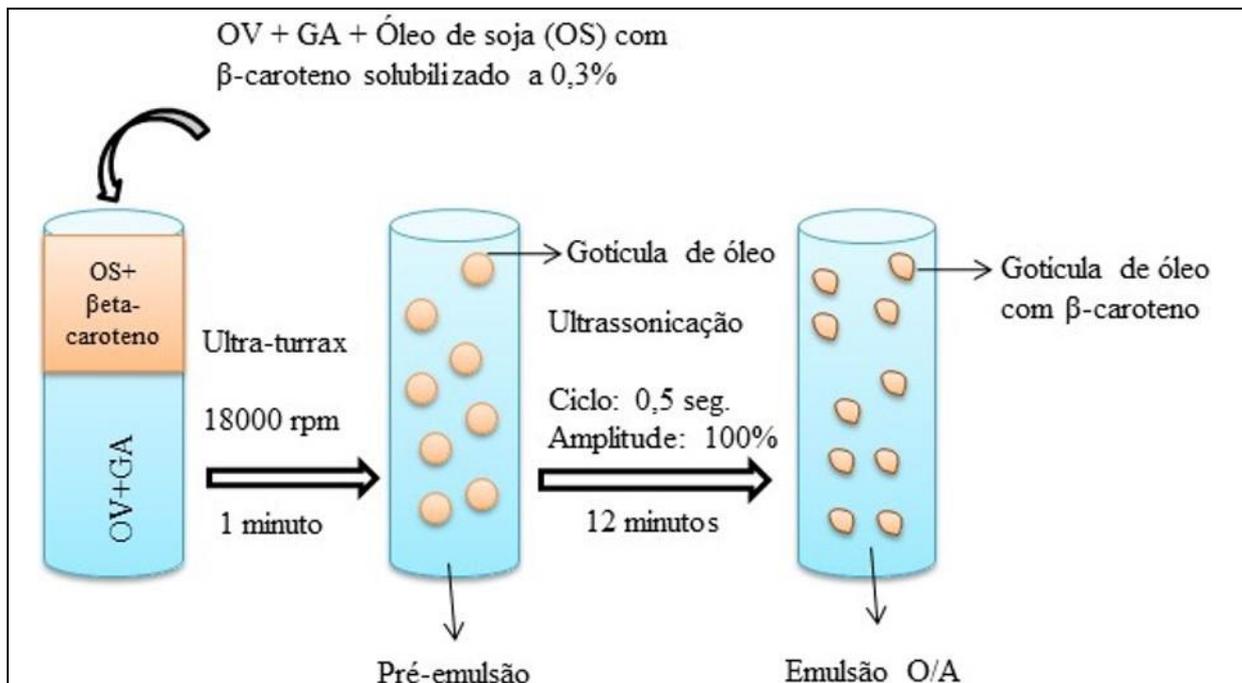
Goma arábica (51198), ovalbumina da clara do ovo de galinha (AS378, pureza entre 62% a 88%) e  $\beta$ -caroteno sintético tipo I (C9750), foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ácido cítrico anidro foi adquirido de Vetec (Brasil) e óleo de soja refinado (OS) de um mercado de Volta Redonda, RJ. Para ajuste do pH foi utilizado ácido cítrico anidro ( $C_6H_8O_7$ ; peso molecular 192,13). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Master System MS 2000, Gehaka, Brasil, condutividade igual a  $0,05 \mu S \cdot cm^{-1}$ ) em balança analítica (Shimadzu, AY220, Brasil) com incerteza de  $\pm 0,0001$  g. Para evitar o crescimento microbiano, foi utilizada azida de sódio (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 0,02% (m/m). Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados sem qualquer purificação.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Encapsulamento de $\beta$ -caroteno em emulsões simples O/A

Soluções-padrão de goma arábica a 30% (m/m) e de ovalbumina a 5% (m/m) foram inicialmente preparadas e mantidas sob agitação magnética a temperatura ambiente, por 12 horas, para garantir a total hidratação dos biopolímeros. Em um béquer, recoberto por papel alumínio, 0,3% (m/m) de  $\beta$ -caroteno foi adicionado e solubilizado em óleo de soja refinado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com auxílio de um agitador magnético, por 1 hora.

Para elaboração das emulsões OV 0,5%GA7,5% (sistema 1), OV 0,5%GA10% (sistema 2) e OV 1%GA10% (sistema 3), foram pesados em um béquer, a solução de biopolímero desejada, o óleo com  $\beta$ -caroteno solubilizado (OSB), o ácido cítrico e a água ultrapura, totalizando 10 g cada sistema. A concentração de ácido cítrico e de OSB adicionados foi 0,4% (m/m) e de 10% (m/m), respectivamente. O pH médio das emulsões foi de 3,86. Em seguida, os componentes foram submetidos a duas etapas de emulsificação, baseado no método proposto por Gharibzahedi; Razavi; Mousavi (2013): i) pré-homogeneização em ultra-turrax (T-25, IKA, Alemanha), a 18000 rpm, por 1 minuto e, ii) homogeneização utilizando uma sonda de ultrassom de 30 kHz (Hielscher, UP100H, Alemanha), com ciclo de 0,5 segundos e amplitude de 100%, por 12 minutos. As emulsões foram armazenadas sob temperatura controlada de 25°C e 55°C, ao abrigo da luz, em incubadora refrigerada (Tecnal, TE-424, Brasil) antes de serem submetidas as análises, para estudar a estabilidade e o comportamento da degradação  $\beta$ -caroteno. A Figura 17 representa, esquematicamente, a forma de preparo das emulsões O/A contendo  $\beta$ -caroteno encapsulado na fase óleo.



**Figura 17** Representação esquemática da forma de preparo das emulsões O/A contendo  $\beta$ -caroteno encapsulado na fase óleo.

## 2.2.2 Estabilidade da Emulsão

### 2.2.2.1 Índice de estabilidade da emulsão (teste de cremação)

A estabilidade das emulsões foi determinada pelo índice de estabilidade da emulsão (IEE), conforme proposto por (MIRHOSSEINI et al., 2008). As amostras foram elaboradas em duplicata, e então, transferidas para tubos de vidro com 1 cm de diâmetro e capacidade de 50 mL, os quais foram armazenados à temperatura constante de 25°C e 55°C, durante todo o período de tempo de análise (dia 0, 1, 2, 3 e 7). As alturas da emulsão e das fases creme e sedimentada foram medidas com auxílio de uma régua de aço inoxidável, graduada em centímetros. Para o cálculo do IEE, considerou-se a altura inicial da emulsão ( $A_E$ ), altura da fase creme ( $A_C$ ) e altura da fase sedimentada ( $A_S$ ), conforme Eq. 6.

$$IEE\% = \left( \frac{A_E - (A_C + A_S)}{A_E} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

### 2.2.2.2 Análise de tamanho médio das partículas e de potencial zeta

O potencial zeta ( $\zeta$ ) e o tamanho de partícula dos três sistemas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (dynamic light scattering - DLS), utilizando-se o equipamento Zetasizer – ZS90 nanoseries - software Zetasizer 7.03, 2013 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), com ângulo detector fixado a 90°C. As amostras foram diluídas, aproximadamente, duzentas vezes (1/200) em água ultrapura, para minimizar os efeitos da dispersão múltipla. As medidas foram realizadas nos dias 0 (logo após o preparo da emulsão), 1, 2, 3 e 7. O tamanho de partícula das emulsões foi descrito por média acumulada do diâmetro (nm), a distribuição do tamanho foi descrita pelo índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta foi determinado pelo modelo de Smoluchowski (mV).

### 2.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para reconhecimento das ligações e dos grupos químicos específicos dos componentes dos sistemas, foi realizada análise de FTIR dos sistemas 1, 2 e 3 e de seus constituintes: OS, GA e OV. Aliquota de 2 mL foram retiradas das emulsões frescas (recém preparadas), as quais foram congeladas a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 72 horas, e liofilizadas em um liofilizador (Terroni, Enterprise I, Brasil). Após a liofilização das alíquotas, estas foram mantidas em um dessecador até o momento da análise. Os espectros foram obtidos em uma faixa de número de ondas entre  $4000$  e  $500\text{ cm}^{-1}$ , por meio do método KBr, em um espectrômetro (Bruker FTiR, Vertex 70, Alemanha).

### 2.2.4 Observação microscópica das emulsões

Para observação microscópica das emulsões com  $\beta$ -caroteno encapsulado foi utilizado um microscópio de força atômica (AFM) (Nanosurf Flex AFM, EUA). As amostras frescas (recém preparadas) das emulsões foram diluídas cem vezes (1/100). Posteriormente, aliquota de  $2\mu\text{L}$  de cada amostra foi adicionada no centro de uma mica, a qual foi fixada em uma lâmina de microscopia. Para a secagem da aliquota, esta foi mantida em um dessecador, por 24 horas. As imagens foram produzidas utilizando-se uma ponteira ContAL G, operação em modo estático, com resolução de 521 pontos por linha.

### 2.2.5 Eficiência de encapsulamento (EE) e eficiência de retenção (ER) de $\beta$ -caroteno

Para o cálculo da eficiência de encapsulamento e da eficiência de retenção do  $\beta$ -caroteno foram utilizadas fórmulas proposta por McClements (2014), Eq. 7 e 8, respectivamente

Em que  $m_{\beta e}$  e  $m_{\beta total}$  são, respectivamente, a massa de  $\beta$ -caroteno encapsulado e a massa total de  $\beta$ -caroteno analisada no tempo 0; e  $m_{\beta t}$  e  $m_{\beta 0}$  são, respectivamente, a massa de  $\beta$ -caroteno encapsulado no tempo  $t$  e a massa de  $\beta$ -caroteno encapsulado no tempo 0.

$$EE = 100 \times \left( \frac{m_{\beta e}}{m_{\beta total}} \right) \quad \text{Eq. 7}$$

$$ER = 100 \times \left( \frac{m_{\beta t}}{m_{\beta 0}} \right) \quad \text{Eq. 8}$$

#### 2.2.5.1 Extração e determinação da concentração de $\beta$ -caroteno

A concentração de  $\beta$ -caroteno das emulsões foi determinada, segundo metodologia proposta por Yuan et al (2008), com pequenas adaptações. Etanol (2 mL) e hexano (3 mL) foram adicionados à 0,15 g de amostra da emulsão e, então, agitadas por 10 segundos, em um vórtex. Posteriormente, 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio (36%) foi adicionada à mistura, a fim de facilitar a separação da fração saponificável, da não-saponificável ( $\beta$ -caroteno). Ao abrigo da luz, a amostra foi lavada repetidamente com hexano (3 mL), e após tornar-se transparente, a fração hexânica (hexano +  $\beta$ -caroteno) foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Para leitura da absorvância nas horas 0 (após preparo), 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 e 72, foi utilizado um Espectrofotômetro (Biochrom, Libra S12, Reino Unido) com comprimento de onda ( $\lambda$ ) selecionado a 450 nm. A massa de  $\beta$ -caroteno das amostras, a

eficiência de encapsulamento e a eficiência de retenção foram determinadas com base em uma curva padrão de  $\beta$ -caroteno (> 93% de pureza), previamente preparada.

### **2.2.6 Análise estatística**

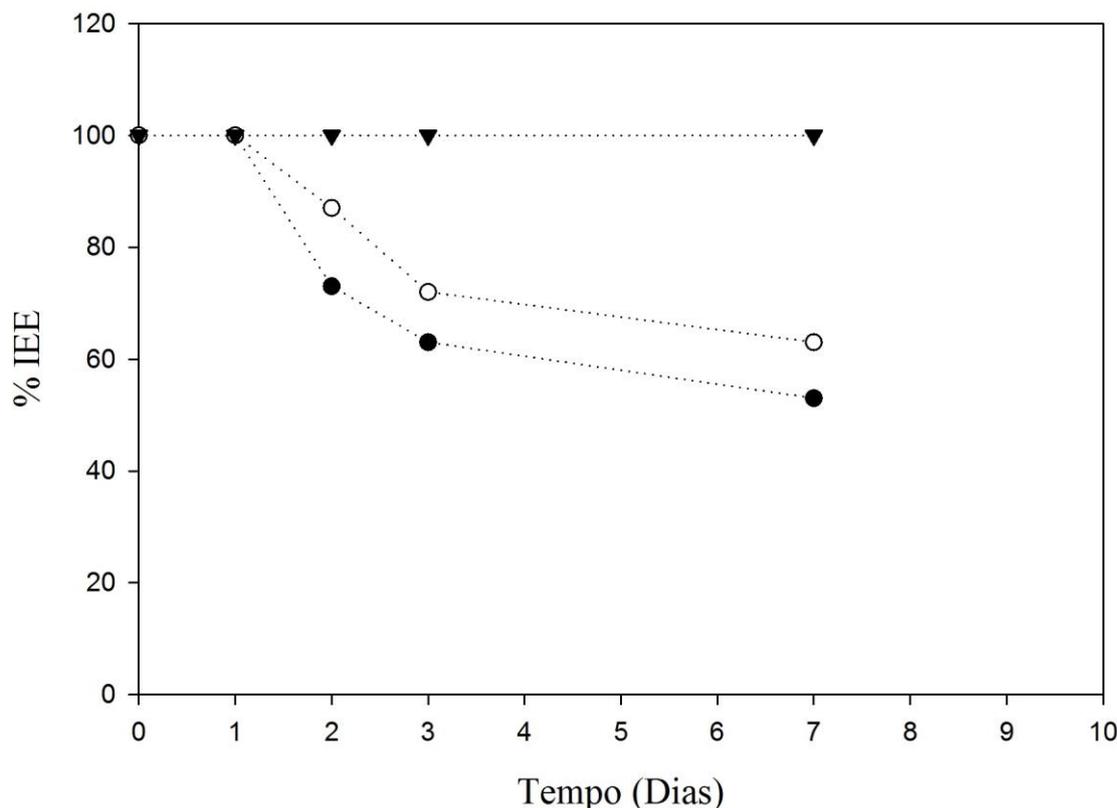
O tratamento estatístico dos valores de tamanho médio das partículas e do potencial zeta dos sistemas foi realizado por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan e t de Student, com valor de  $p < 0,05$ . Os valores de IEE foram calculados por meio da média aritmética de duas medidas. Todas as amostras foram realizadas em duplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estabilidade da emulsão

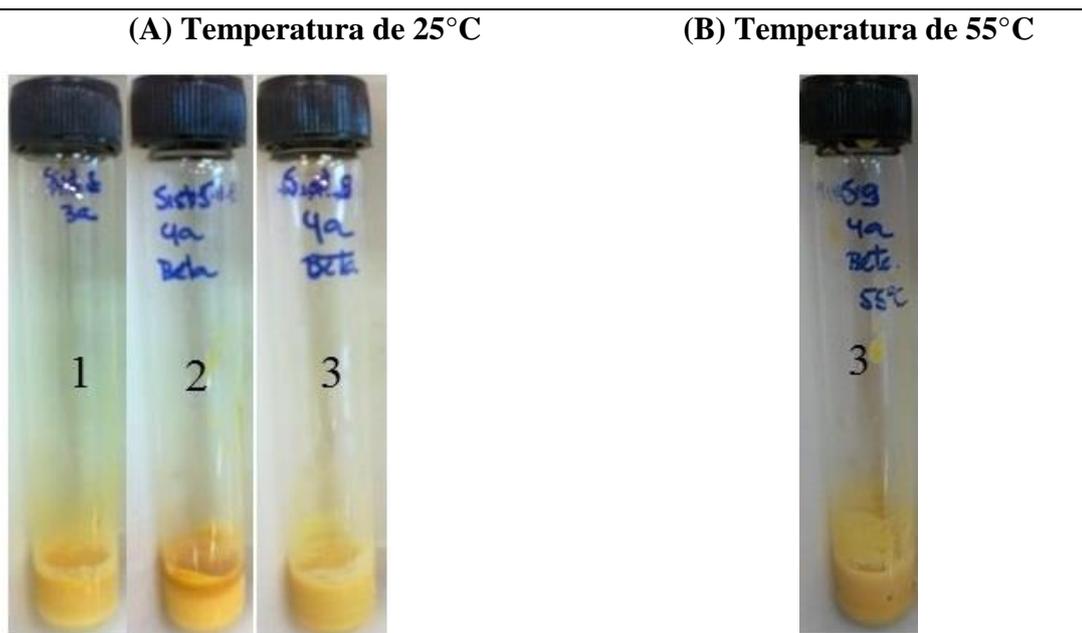
##### 3.1.1 Índice de estabilidade da emulsão (teste de cremação)

Os sistemas 1, 2 e 3 apresentaram IEE igual a 100%, à 25°C, durante todos os dias de análise. Pode-se inferir, portanto, que o encapsulamento de  $\beta$ -caroteno, não influenciou a estabilidade dos sistemas, à separação de fases. Na Figura 18 são apresentados os IEE dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 55°C.



**Figura 18** IEE dos sistemas 1, 2 e 3 com  $\beta$ -caroteno encapsulado, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à temperatura constante de 55°C. Sistema 1 (●); sistema 2 (○); sistema 3 (▼).

O sistema 3 apresentou IEE igual a 100% em todos os dias de análise, à temperatura de armazenamento de 25°C e de 55°C. Entretanto, à 55°C, os sistemas 1 e 2 apresentaram separação de fases, no dia 2 (IEE igual a 73% e 87%, respectivamente). Na Figura 19A são apresentadas fotografias dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, a temperatura de 25°C, e na Figura 19B, é apresentada fotografia do sistema 3, no dia 7, à temperatura de 55°C.



**Figura 19 (A):** Fotografias, da esquerda para direita, dos sistemas 1, 2 e 3, respectivamente, com  $\beta$ -caroteno encapsulado, no dia 7, à temperatura de 25°C; **(B):** Fotografia do sistema 3, com  $\beta$ -caroteno encapsulado, no dia 7, à temperatura de 55°C.

Esses resultados demonstram que, à temperatura de armazenamento de 55°C, a concentração de OV correlacionou-se positivamente com o tempo de estabilidade das emulsões, uma vez que os sistemas 2 e 3, continham as mesmas concentrações de GA e de OS. Pode-se inferir, também, que segundo as condições estudadas, a concentração de OV foi o fator limitante para a formação de uma monocamada interfacial, suficientemente espessa para estabilização da emulsão, em relação ao processo de coalescência e ao aumento da temperatura de armazenamento.

### 3.1.2 Tamanho médio das partículas das emulsões armazenadas à 25°C

Os valores de tamanho médio das partículas e de PDI dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 25°C, são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** Valores de tamanho médio das partículas e de PDI dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 25°C.\*

| Tamanho de partícula (nm)/ PDI |                          |                           |                           |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Dia                            | Sistema 1                | Sistema 2                 | Sistema 3                 |
| 0                              | 1386 <sup>cB</sup> (0,3) | 1322 <sup>cB</sup> (0,2)  | 1575 <sup>dA</sup> (0,2)  |
| 1                              | 1853 <sup>aA</sup> (0,3) | 1455 <sup>bB</sup> (0,3)  | 1605 <sup>dAB</sup> (0,2) |
| 2                              | 1596 <sup>bB</sup> (0,2) | 1414 <sup>bcC</sup> (0,2) | 2066 <sup>cA</sup> (0,2)  |
| 3                              | 1515 <sup>bC</sup> (0,3) | 1591 <sup>aB</sup> (0,3)  | 2598 <sup>aA</sup> (0,2)  |
| 7                              | 1155 <sup>dC</sup> (0,3) | 1605 <sup>aB</sup> (0,2)  | 2330 <sup>bA</sup> (0,4)  |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, e maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste de Duncan).

Entre os dias analisados, o PDI dos sistemas variou de 0,2 a 0,4, o que sugere serem sistemas polidispersos, devido a distribuição de tamanho de partícula heterogênea ( $PDI > 0,2$ ) (SILVA et al., 2011; ZEEB; WEISS; JULIAN, 2015). No entanto, o sistema 3 apresentou distribuição de tamanho de partícula mais homogênea, do dia 0 ao 3. O sistema 1 apresentou aumento significativo de tamanho de partícula entre o dia 0 e 1, porém, do dia 2 ao dia 7, apresentou diminuição significativa desse parâmetro. Embora seja consenso que o tamanho de partícula tende a aumentar com o tempo, devido aos vários processos de desestabilização inerentes às emulsões (WALSTRA; VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011), a diminuição desses valores a partir do dia 1, pode ser explicada pelo valor de PDI ( $> 0,2$ ). O sistema 2 apresentou aumento significativo de tamanho de partícula entre os dias 0 e 1, e no dia 3, a partir do qual manteve-se constante até o dia 7. O sistema 3 apresentou aumento significativo de tamanho de partícula no dia 2 e 3, e diminuição significativa no dia 7, o que pode ser explicado também, pelo valor de PDI (0,4). O maior tamanho de partícula, ao final da análise, foi correlacionado positivamente com a concentração de biopolímeros dos sistemas. Por isso, o sistema 3 foi o que apresentou maior tamanho de partícula, e o sistema 1, o menor.

Comparando os sistemas de mesma composição, sem  $\beta$ -caroteno e com  $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7 de análise, à 25°C (Tabela 9), os sistemas com  $\beta$ -caroteno apresentaram, em geral, tamanho das partículas significativamente maior que os sistemas sem adição desse carotenoide. No entanto, a estabilidade dos sistemas não foi influenciada por esse aumento, uma vez que todos apresentaram IEE igual a 100% por 7 dias.

**Tabela 9** Comparação do tamanho médio das partículas (nm) dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem  $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 25°C.\*

| Sistemas | sem $\beta$ -caroteno   | com $\beta$ -caroteno   |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| Dia 0    |                         |                         |
| 1        | 1072 <sup>b</sup> (0,4) | 1386 <sup>a</sup> (0,3) |
| 2        | 1151 <sup>b</sup> (0,4) | 1322 <sup>a</sup> (0,2) |
| 3        | 1067 <sup>b</sup> (0,4) | 1575 <sup>a</sup> (0,2) |
| Dia 1    |                         |                         |
| 1        | 1431 <sup>b</sup> (0,3) | 1853 <sup>a</sup> (0,3) |
| 2        | 1319 <sup>b</sup> (0,3) | 1455 <sup>a</sup> (0,3) |
| 3        | 1547 <sup>a</sup> (0,3) | 1605 <sup>a</sup> (0,2) |
| Dia 7    |                         |                         |
| 1        | 1428 <sup>a</sup> (0,3) | 1155 <sup>b</sup> (0,3) |
| 2        | 1463 <sup>b</sup> (0,3) | 1601 <sup>a</sup> (0,2) |
| 3        | 1633 <sup>b</sup> (0,3) | 2330 <sup>a</sup> (0,4) |

\*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste t de Student).

No dia 7 de análise, o sistema 3 com  $\beta$ -caroteno, quando comparado ao mesmo, sem a adição do carotenoide, apresentou tamanho de partícula 1,4 vezes maior.

Esses sistemas podem ser classificados como macroemulsões ou emulsões convencionais, devido ao tamanho médio de partículas que apresentaram (entre 0,1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ), ao tempo de estabilidade (metaestáveis) e pela aparência opaca (MCCLEMENTS, 2011).

### 3.1.3 Potencial zeta ( $\zeta$ -potencial) das emulsões armazenadas à 25°C

O valor de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 25°C, são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** Potencial zeta (mV) dos sistemas 1, 2 e 3 nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 25°C.\*

| Dia | Sistema 1           | Sistema 2            | Sistema 3           |
|-----|---------------------|----------------------|---------------------|
| 0   | -24,6 <sup>bA</sup> | -27,4 <sup>cB</sup>  | -26,3 <sup>cB</sup> |
| 1   | -24,5 <sup>bB</sup> | -22,1 <sup>bB</sup>  | -14,3 <sup>bA</sup> |
| 2   | -11,7 <sup>aA</sup> | -16,4 <sup>aAB</sup> | -20,8 <sup>cB</sup> |
| 3   | -25,6 <sup>bB</sup> | -25,7 <sup>cB</sup>  | -23,6 <sup>cA</sup> |
| 7   | -28,2 <sup>bB</sup> | -26,5 <sup>cB</sup>  | -8,7 <sup>aA</sup>  |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, e maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste de Duncan).

A medida do potencial zeta pode prever o processo de floculação (valor absoluto menor que 25mV) ou não (valor absoluto maior que 25mV) em emulsões, uma vez que a estabilidade desses sistemas pode ser influenciada pela carga elétrica interfacial (GÜZEY; MCCLEMENTS, 2006; MIRHOSSEINI et al., 2008). Ao contrário da variável tamanho de partícula, ao final da análise (dia 7), o maior valor de potencial zeta correlacionou-se inversamente com a concentração de biopolímeros dos sistemas.

Comparando os sistemas de mesma composição, sem  $\beta$ -caroteno e com  $\beta$ -caroteno, ao final da análise (Tabela 11), os sistemas com  $\beta$ -caroteno, no geral, apresentaram valor absoluto de potencial zeta, significativamente menor que os sistemas sem adição desse carotenoide. No entanto, a estabilidade dos sistemas não foi influenciada pela diminuição desse parâmetro, uma vez que o sistema 3 apresentou valor de -8,7 mV e IEE igual a 100%.

**Tabela 11** Comparação do valor de potencial zeta (mV) dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem  $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 25°C.\*

| Sistemas | sem $\beta$ -caroteno | com $\beta$ -caroteno |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| Dia 0    |                       |                       |
| 1        | -27,3 <sup>b</sup>    | -24,6 <sup>a</sup>    |
| 2        | -27,3 <sup>a</sup>    | -27,4 <sup>a</sup>    |
| 3        | -27,9 <sup>a</sup>    | -26,3 <sup>a</sup>    |
| Dia 1    |                       |                       |
| 1        | -26,5 <sup>b</sup>    | -24,5 <sup>a</sup>    |
| 2        | -26,3 <sup>b</sup>    | -22,1 <sup>a</sup>    |
| 3        | -25,8 <sup>b</sup>    | -14,3 <sup>a</sup>    |
| Dia 7    |                       |                       |
| 1        | -30,6 <sup>a</sup>    | -28,2 <sup>b</sup>    |
| 2        | -28,8 <sup>a</sup>    | -26,5 <sup>a</sup>    |
| 3        | -26,4 <sup>b</sup>    | -8,7 <sup>a</sup>     |

\*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste t de Student).

### 3.1.4 Tamanho médio das partículas das emulsões armazenadas à 55°C

Os valores de tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 55°C, são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12** Valores de tamanho médio das partículas (nm) e de PDI dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 55°C.\*

| Dia | Sistema 1                | Sistema 2                | Sistema 3                |
|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0   | 1150 <sup>bB</sup> (0,3) | 1396 <sup>bB</sup> (0,2) | 3293 <sup>aA</sup> (0,2) |
| 1   | 3129 <sup>aA</sup> (0,3) | 3887 <sup>aA</sup> (0,2) | 3515 <sup>aA</sup> (0,3) |
| 2   | 3503 <sup>aA</sup> (0,3) | 4056 <sup>aA</sup> (0,2) | 4640 <sup>aA</sup> (0,2) |
| 3   | 3240 <sup>aB</sup> (0,3) | 4654 <sup>aA</sup> (0,2) | 4364 <sup>aA</sup> (0,2) |
| 7   | 3096 <sup>aA</sup> (0,3) | 3908 <sup>aA</sup> (0,3) | 4515 <sup>aA</sup> (0,2) |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, e maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste de Duncan).

No geral, os sistemas 1, 2 e 3 apresentaram aumento de tamanho de partícula ao longo dos dias de análise. Os sistemas que apresentaram menor valor e variação de PDI, ao longo dos dias de análise, foram os sistemas 2 e 3. O sistema 1, na maioria dos dias de análise, apresentou PDI de 0,3, o que sugere ser um sistema polidisperso, devido a distribuição de tamanho de partícula heterogênea (ZEEB; WEISS; JULIAN, 2015; SILVA et al., 2011). Ao final da análise (dia 7), não houve diferença significativa do tamanho de partícula entre os sistemas. Comparando os sistemas de mesma composição, sem  $\beta$ -caroteno e com  $\beta$ -caroteno (Tabela 13), no dia 0, os sistemas 2 e 3 com  $\beta$ -caroteno apresentaram

aumento significativo de tamanho médio das partículas. Nos dias 1 e 7 todos os sistemas com  $\beta$ -caroteno apresentaram aumento significativo do tamanho de partícula.

**Tabela 13** Comparação do tamanho médio das partículas (nm) dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem  $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 55°C.\*

| Sistemas | sem $\beta$ -caroteno   | com $\beta$ -caroteno   |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| Dia 0    |                         |                         |
| 1        | 1072 <sup>a</sup> (0,4) | 1150 <sup>a</sup> (0,3) |
| 2        | 1151 <sup>b</sup> (0,4) | 1396 <sup>a</sup> (0,2) |
| 3        | 1067 <sup>b</sup> (0,4) | 3293 <sup>a</sup> (0,2) |
| Dia 1    |                         |                         |
| 1        | 1431 <sup>b</sup> (0,3) | 3129 <sup>a</sup> (0,3) |
| 2        | 1319 <sup>b</sup> (0,3) | 3887 <sup>a</sup> (0,2) |
| 3        | 1547 <sup>b</sup> (0,3) | 3515 <sup>a</sup> (0,3) |
| Dia 7    |                         |                         |
| 1        | 1428 <sup>b</sup> (0,3) | 3096 <sup>a</sup> (0,3) |
| 2        | 1463 <sup>b</sup> (0,3) | 3908 <sup>a</sup> (0,3) |
| 3        | 1633 <sup>b</sup> (0,3) | 4515 <sup>a</sup> (0,2) |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste t de Student).

No dia 7 de análise, o sistema 3 com  $\beta$ -caroteno, quando comparado ao mesmo, sem a adição do carotenoide, apresentou tamanho de partícula 2,7 vezes maior. Esses resultados indicam que além do microencapsulamento do  $\beta$ -caroteno, o aumento do tamanho de partícula também foi influenciado pelo aumento da temperatura de armazenamento, já que à 25°C, o aumento foi de 1,4 vezes. Portanto, o aumento em 30°C da temperatura de armazenamento, foi o suficiente para praticamente dobrar o tamanho da partícula do sistema 3 com  $\beta$ -caroteno. No entanto, mesmo com esse expressivo aumento, esse sistema foi o que apresentou IEE igual a 100% pelo maior período de tempo (7 dias), em comparação aos sistemas 1 e 2, que apresentaram IEE igual a 100%, por 2 dias. Portanto, a estabilidade desses sistemas correlacionou-se positivamente com a concentração de OV, já que o sistema 2 continha a mesma concentração de GA que o sistema 3.

### 3.1.5 Potencial zeta ( $\zeta$ -potencial) das emulsões armazenadas à 55°C

O valor de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 55°C, são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** Potencial zeta (mV) dos sistemas 1, 2 e 3 com  $\beta$ -caroteno encapsulado, nos dias 0, 1, 2, 3 e 7, armazenados à 55°C.\*

| Dia | Sistema 1           | Sistema 2            | Sistema 3           |
|-----|---------------------|----------------------|---------------------|
| 0   | -28 <sup>cC</sup>   | -22,1 <sup>aB</sup>  | -20 <sup>bA</sup>   |
| 1   | -24,2 <sup>bB</sup> | -28,1 <sup>cB</sup>  | -13,8 <sup>aA</sup> |
| 2   | -23,8 <sup>bB</sup> | -25,3 <sup>bcC</sup> | -21 <sup>bA</sup>   |
| 3   | -22,6 <sup>aB</sup> | -21 <sup>aB</sup>    | -14,8 <sup>aA</sup> |
| 7   | -23,8 <sup>bB</sup> | -23,6 <sup>abB</sup> | -21,1 <sup>bA</sup> |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna, e maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste de Duncan).

Ao final da análise (dia 7) não houve diferença significativa no valor de potencial zeta dos sistemas 1 e 2, e o sistema 3 foi o que apresentou menor valor desse parâmetro. Ao contrário da variável tamanho de partícula, os maiores valores de potencial zeta correlacionaram-se inversamente com a concentração de biopolímeros. No entanto, mesmo apresentando menor valor de potencial zeta em relação aos demais sistemas, em todos os dias de análise, e ainda, sendo o valor absoluto menor que 25 mV, o sistema 3, como mencionado anteriormente, foi o que apresentou IEE igual a 100%, pelo maior período de tempo. Comparando os sistemas de mesma composição, sem  $\beta$ -caroteno e com  $\beta$ -caroteno, ao final da análise (Tabela 15), os sistemas com  $\beta$ -caroteno apresentaram valor de potencial zeta significativamente menor que os sistemas sem adição desse carotenoide.

**Tabela 15** Comparação do valor de potencial zeta (mV) dos sistemas 1, 2 e 3, com e sem  $\beta$ -caroteno, nos dias 0, 1 e 7, armazenados à 55°C.\*

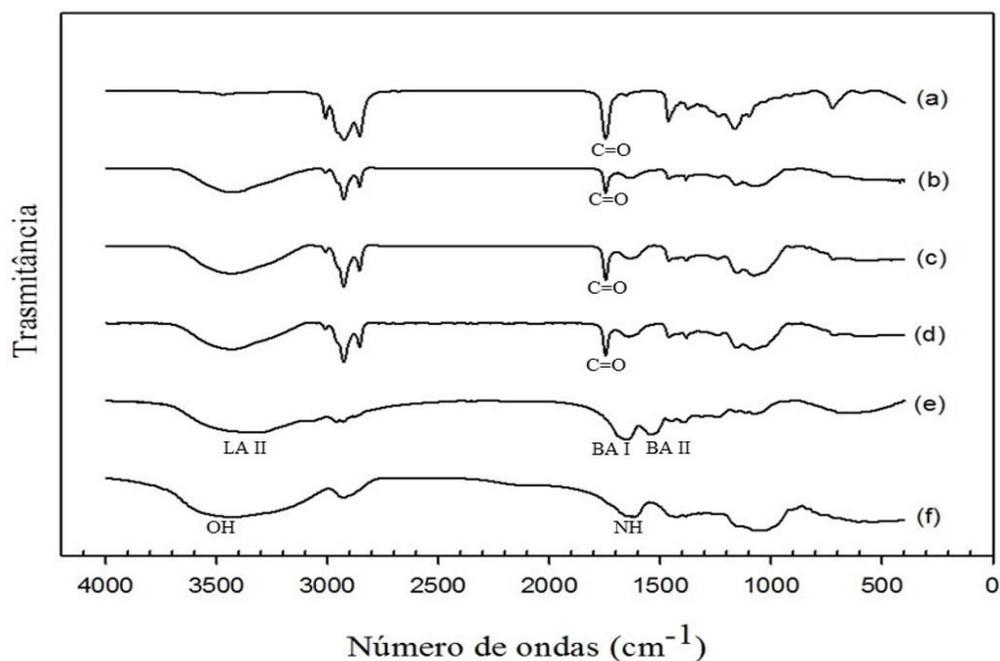
| Sistemas | sem $\beta$ -caroteno | com $\beta$ -caroteno |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| Dia 0    |                       |                       |
| 1        | -27,3 <sup>a</sup>    | -28 <sup>a</sup>      |
| 2        | -27,3 <sup>b</sup>    | -22,1 <sup>a</sup>    |
| 3        | -27,9 <sup>b</sup>    | -20 <sup>a</sup>      |
| Dia 1    |                       |                       |
| 1        | -26,5 <sup>b</sup>    | -24,2 <sup>a</sup>    |
| 2        | -26,3 <sup>a</sup>    | -28,1 <sup>a</sup>    |
| 3        | -25,8 <sup>b</sup>    | -13,8 <sup>a</sup>    |
| Dia 7    |                       |                       |
| 1        | -30,6 <sup>b</sup>    | -23,8 <sup>a</sup>    |
| 2        | -28,8 <sup>b</sup>    | -23,6 <sup>a</sup>    |
| 3        | -26,4 <sup>b</sup>    | -21,1 <sup>a</sup>    |

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Como os sistemas 1 e 2 com  $\beta$ -caroteno, apresentaram IEE igual a 100% por 7 dias, quando armazenados à 25°C, parece que o menor tempo de estabilidade desses sistemas (2 dias), quando armazenados à 55°C, deveu-se ao aumento da temperatura de armazenamento (aumento de 30°C). Por outro lado, a maior quantidade OV do sistema 3, contribuiu mais expressivamente para estabilidade à separação de fases, uma vez que o tempo de estabilidade desse sistema foi igual ao do sistema de mesma composição com  $\beta$ -caroteno, armazenado à 25°C.

### 3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros em infravermelho do OS, dos sistemas 1, 2 e 3, da OV e da GA são apresentados na Figura 20.

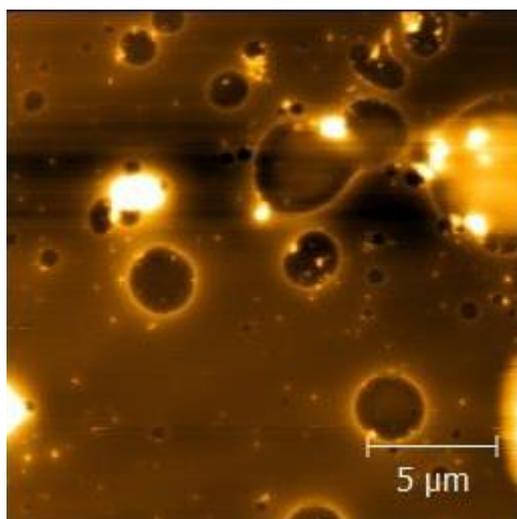


**Figura 20** Espectro de FTIR do OS (a), sistema 1 (b), sistema 2 (c), sistema 3 (d), OV (e) e GA (f).

A banda  $1730\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20a) refere-se ao alongamento do grupo carbonila (C=O) do óleo de soja (ZAGONEL; PERALTA-ZAMORA; RAMOS, 2004), e embora de menor intensidade, pode ser observada nos três sistemas (Figura 20b-d). A banda  $3400\text{ cm}^{-1}$  da OV, refere-se à ligação amina tipo II - LA II (SHOJAEI et al., 2015). A banda amida I (BA I), de  $1700\text{ a }1600\text{ cm}^{-1}$ , refere-se ao grupo carbonila (C=O) e a banda amida II (BA II), de  $1600\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20e), à ligações C-N e N-H de grupos amida da proteína (SAVADKOOHI et al., 2014; SHOJAEI et al., 2015). A banda  $3426\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20f) da GA refere-se ao grupo hidroxila (OH) (KONG et al., 2014). No entanto, no espectro dos três sistemas (Figura 20b-d), essa banda não é facilmente diferenciada da ligação amina tipo II da OV ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ), devido a proximidade dos valores das vibrações de ambos. A banda  $1620\text{ cm}^{-1}$  (Figura 20f) da GA pode ser indistinguível também no espectro dos três sistemas. Essa vibração refere-se a ligação N-H, possivelmente da fração proteica do biopolímero (WANG; WILLIAMS; SENAN, 2014).

### 3.3 Observação microscópica das emulsões

A AFM é um método eficiente para observação de morfologia de superfícies, além de tamanho e distribuição de tamanho de partículas (HOSSEINI et al., 2013). É possível identificar, pela imagem plana (Figura 21) do sistema 1, a forma esférica das gotas dispersas. A distribuição e o tamanho médio das partículas observados, parecem apresentar compatibilidade com os dados obtidos pela análise de tamanho de partícula.



**Figura 21** Imagem plana de AFM, do sistema 1.

### 3.4 Eficiência de encapsulamento (EE) e eficiência de retenção de $\beta$ -caroteno (ER)

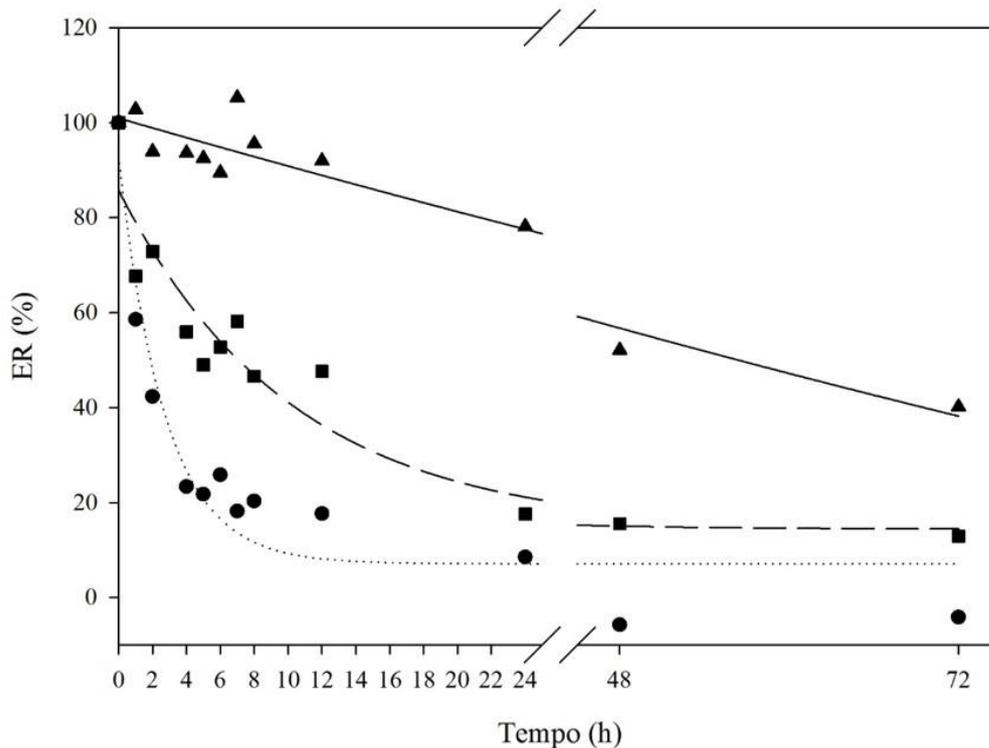
A EE dos sistemas 1, 2 e 3 foi de 46,3%, 50,2% e 36,1, respectivamente, demonstrando que a menor concentração de OV (0,5%) associada com a maior concentração de GA (10%) foi a melhor combinação para esse índice. Segundo McClements (2014), um bom sistema encapsulador deve apresentar EE igual ou maior que 80%. Ainda assim, as EE de encapsulamento do  $\beta$ -caroteno alcançada pelos sistemas estudados, principalmente do sistema 1 e 2, foram semelhantes à reportada por Jarunglumlert, Nakagawa, Adachi (2015), por meio da técnica da desidratação por atomização (spray drying).

As equações que melhor se ajustaram aos dados de eficiência de retenção de  $\beta$ -caroteno dos sistemas estudados, nas horas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48, 72, à temperatura de armazenamento de 25°C e 55°C, foram do tipo decaimento exponencial, e estão apresentadas na Tabela 16.

**Tabela 16** Equação de ajuste (decaimento exponencial) da eficiência de retenção do  $\beta$ -caroteno encapsulado nos sistemas 1, 2 e 3, às temperaturas constantes de 25 e 55 °C.

| Sistema | Temperatura | Equação                                    | R <sup>2</sup> |
|---------|-------------|--|----------------|
| 1       | 25°C        | $y = -111,57 + 212,51^{(-0,005 \times x)}$ | 0,92           |
| 2       |             | $y = 14,39 + 71,39^{(-0,09 \times x)}$     | 0,88           |
| 3       |             | $y = 7,10 + 85,84^{(-0,37 \times x)}$      | 0,90           |
| 1       | 55°C        | $y = 3,97 + 79,43^{(-0,08 \times x)}$      | 0,73           |
| 2       |             | $y = -5,40 + 98,70^{(-0,08 \times x)}$     | 0,94           |
| 3       |             | $y = 5,36 + 89,27^{(-0,38 \times x)}$      | 0,87           |

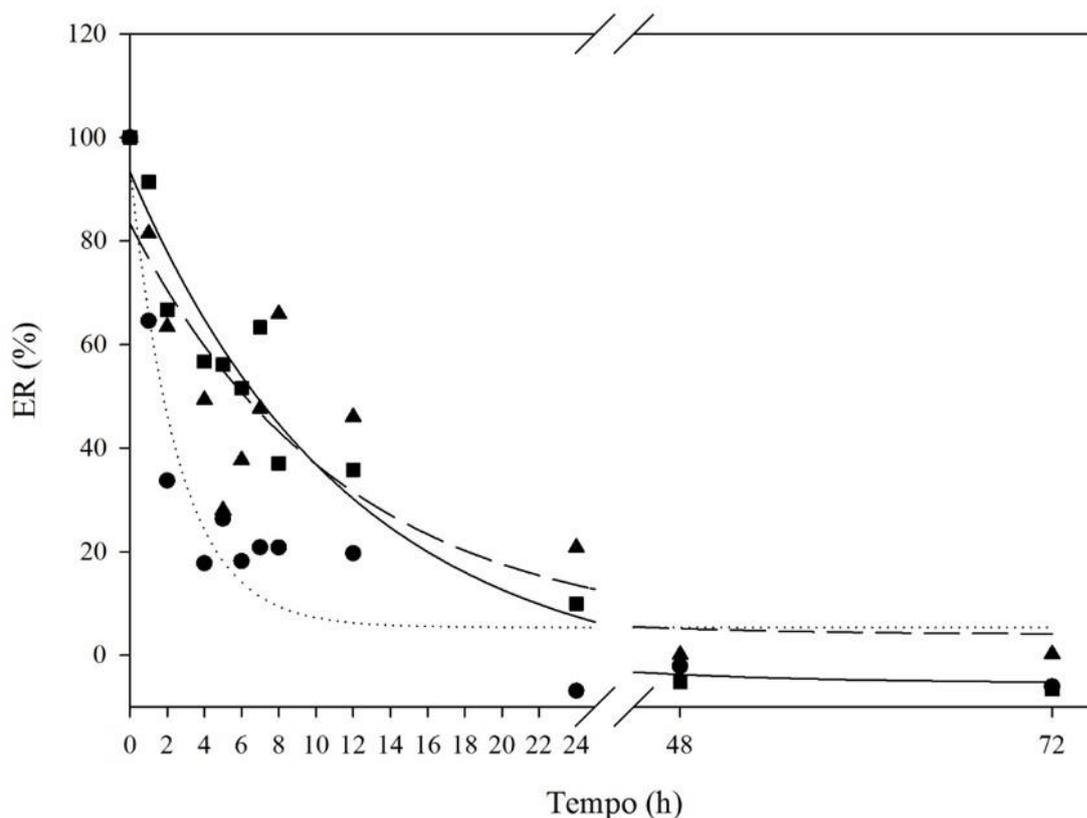
Conforme apresentado na Figura 22, nas horas 24, 48 e 72 (final da análise), à temperatura de armazenamento de 25°C, o sistema 3 apresentou os melhores valores de ER (78,1%, 52,1% e 40,2%, respectivamente), em comparação ao sistema 2 (17,6%, 15,5% e 12,9%, respectivamente) e ao sistema 1 (8,5% na hora 24 e degradação total do  $\beta$ -caroteno nas horas 48 e 72), indicando que a concentração de biopolímero dos sistemas correlacionou-se positivamente com a proteção do carotenoide encapsulado.



**Figura 22** Comportamento em decaimento exponencial da eficiência de retenção do  $\beta$ -caroteno encapsulado nos sistemas 1 (●), sistema 2 (■) e sistema 3 (▲), à temperatura constante de 25°C, nas horas, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 e 72, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,92, 0,88 e 0,90, respectivamente.

Na hora 24, com aumento da concentração da GA em 2,5% e da OV em 100% (comparação dos sistemas 1 e 3), a ER do  $\beta$ -caroteno aumentou 69,6%, e quando utilizada a mesma concentração de GA (10%), com aumento de 100% da OV (comparação dos sistemas 2 e 3), a ER aumentou 60,5%. Na hora 48 e 72, o aumento da concentração da OV em 100% (comparação do sistema 3 com os sistemas 1 e 2), aumentou a ER em 36,6% e 27,3%, respectivamente. É provável que o aumento da OV e da GA nos sistemas, contribuiu para um melhor processo de emulsificação e, conseqüentemente, para melhor estabilidade da emulsão e do carotenoide.

Conforme demonstrado na Figura 23, nas horas 12, 24, 48 e 72 (final da análise), à temperatura de armazenamento de 55°C, o sistema 3 também apresentou os melhores valores de ER (46%, 20,8%, 0,1% e 0,1%, respectivamente), em comparação ao sistema 2 (35,8% e 10% nas horas 12 e 24, respectivamente), e degradação total do  $\beta$ -caroteno nas horas 48 e 72) e ao sistema 1 (19,7% na hora 12 e degradação total do  $\beta$ -caroteno nas horas 24, 48 e 72).



**Figura 23** Comportamento em decaimento exponencial da eficiência de retenção do  $\beta$ -caroteno encapsulado nos sistemas 1 (●), sistema 2 (■) e sistema 3 (▲), à temperatura constante de 55°C, nas horas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,94, 0,73 e 0,87, respectivamente.

Na hora 12, com aumento de 2,5% na concentração da GA e de 100% na concentração de OV (comparação dos sistemas 1 e 3), a ER do  $\beta$ -caroteno aumentou 26,3%. Quando utilizada a mesma concentração de GA (10%), com aumento de 100% da OV (comparação dos sistemas 2 e 3), a ER aumentou 10,2%, na hora 12 e 10,8%, na hora 24. A ER, portanto, correlacionou-se positivamente com a concentração OV, já que o sistema 2 continha a mesma concentração de GA que o sistema 3. O aumento de 30°C na temperatura de armazenamento do sistema 3, por exemplo, diminuiu a ER em 40%.

Importante considerar, que em todos os sistemas estudados, considerável quantidade de  $\beta$ -caroteno foi degradada, antes mesmo do início da análise (tempo 0), que é o tempo ao final do preparo da emulsão. Isso pode indicar que o armazenamento do  $\beta$ -caroteno sintético, mesmo à baixa temperatura, o processo de solubilização em óleo (1 h à temperatura ambiente), bem como a forma e o tempo de elaboração das emulsões, contribuíram expressivamente para degradação de 49,82% a 62,9% do carotenóide, entre os sistemas estudados.

Em um estudo reportado por Yuan et al (2008), à 25°C, o  $\beta$ -caroteno encapsulado em nanoemulsões O/A, estabilizadas por surfactantes sintéticos, degradou-se em 25%, ao final de 4 semanas de análise. Também estudando a degradação do  $\beta$ -caroteno em nanoemulsões O/A, estabilizadas por mistura de proteína do soro do leite e pectina, Xu et al (2013) reportaram ER de  $\beta$ -caroteno, aproximadamente de 40%, na hora 72, à 55°C, e em pH 4,0, semelhante ao

encontrado na hora 12 de análise, nos sistemas 2 (35,8%) e 3 (46%). Esses resultados demonstram que a EE e ER do  $\beta$ -caroteno dependem, principalmente, do tipo de estabilizante utilizado, do pH do meio, da forma de preparo e do tipo de emulsão formada.

#### 4 CONCLUSÕES

As condições de solubilização do  $\beta$ -caroteno na fase óleo das emulsões, parecem ter sido decisivas para se alcançar um adequado encapsulamento desse carotenoide, nos sistemas estudados. A razão entre OV e GA de 1:10, respectivamente, mostrou-se mais eficiente em aumentar a estabilidade dos sistemas, à separação de fases, e também, em melhor inibir a degradação do  $\beta$ -caroteno, à 25°C e 55°C. À 55°C, a degradação do  $\beta$ -caroteno foi expressivamente maior e mais rápida. Além da temperatura, possivelmente outros fatores influenciaram a degradação do carotenoide, como o pH e o oxigênio, uma vez que, antes mesmo do início das análises, quantidade significativa do carotenoide foi degradada. Devido ao menor custo do processo de formação das macroemulsões O/A, o encapsulamento de  $\beta$ -caroteno nesses sistemas, pode ser uma opção vantajosa para aplicação em produtos com vida de prateleira curta, já que possui, esse carotenoide, reconhecidos benefícios à saúde humana.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 3–15, fev. 2009.

BOBBIO, P. A; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**, 3ª edição. São Paulo, Varela, 2001.

DE PAZ, E.; MARTÍN, Á.; ESTRELLA, A.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MATIAS, A. A.; DUARTE, C. M. M.; COCERO, M. J. Formulation of  $\beta$ -carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-on-water emulsions for application as natural colorant. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 17–27, jan. 2012.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M. Ultrasound-assisted formation of the canthaxanthin emulsions stabilized by arabic and xanthan gums. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 21–30, 1 jul. 2013.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in colloid and interface science**, v. 128-130, n. 2006, p. 227–48, 21 dez. 2006.

HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–6, 5 jun. 2013.

KONG, H.; YANG, J.; ZHANG, Y.; FANG, Y.; NISHINARI, K.; PHILLIPS, G. O. Synthesis and antioxidant properties of gum arabic-stabilized selenium nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 155–162, 2014.

JARUNGLUMLERT, T.; NAKAGAWA, K.; ADACHI, S. Influence of aggregate structure of caseine on the encapsulation efficiency of  $\beta$ -carotene entrapped via hydrophobic interaction. **Food Structure**, v. 5, p. 42-50, 2015.

LEROUX, J.; LANGENDORFF, V.; SCHICK, G.; VAISHNAV, V.; MAZOYER, J. Emulsion stabilizing properties of pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 4, p. 455–462, jul. 2003.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **The Royal Society of Chemistry**, 7, p. 2297-2316, nov. 2011.

MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active compounds**. Boca Raton: CRC Press, 2014.

MIRHOSSEINI, H.; PING, C.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum , xanthan gum and orange oil contents on  $\zeta$  -potential , conductivity , stability , size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 315, p. 47–56, 2008.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1440–7, 1 dez. 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Analysis in Foods**. Washington: Ilsi Press, 2001.

SAVADKOOHI, S.; BANNIKOVA, A.; KASAPIS, S.; ADHIKARI, B. Structural behaviour in condensed bovine serum albumin systems following application of high pressure. **Food Chemistry**, v. 150, p. 469–476, 2014.

SCHWARTZ, S. J.; VON ELBE, J. H.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 445-498.

SHOJAEI, M.; NAVAEI, F.; JALILI-FIROOZINEZHAD, S.; FATURECHI, R.; MAJIDI, M.; BONAKDAR, S. Fabrication and characterization of ovalbumin films for wound dressing applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 158–164, 2015.

SILVA, M. D. S.; COCENZA, D. S.; GRILLO, R.; MELO, N. F. S. De; TONELLO, P. S.; OLIVEIRA, L. C. De; CASSIMIRO, D. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1-3, p. 366–374, 2011.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. Sistemas Dispersos: Considerações Básicas. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 611-660.

WANG, H.; WILLIAMS, P. a.; SENAN, C. Synthesis, characterization and emulsification properties of dodecyl succinic anhydride derivatives of gum Arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 143–148, 2014.

XU, D.; YUAN, F.; GAO, Y.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. a. Influence of pH, metal chelator, free radical scavenger and interfacial characteristics on the oxidative stability of  $\beta$ -carotene in conjugated whey protein-pectin stabilised emulsion. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 1098–1104, 2013.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 61–68, jan. 2008.

ZAGONEL, G. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; RAMOS, L. P. Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1021–1025, 2004.

ZEEB, B.; WEISS, J.; JULIAN, D. Electrostatic modulation and enzymatic cross-linking of interfacial layers impacts gastrointestinal fate of multilayer emulsions. **Food Chemistry**, v. 180, p. 257–264, 2015.

## **CAPÍTULO III**

# **EMULSÕES MÚLTIPLAS: FORMAÇÃO E APLICAÇÃO EM MICROENCAPSULAMENTO DE COMPONENTES BIOATIVOS**

**Luciano José Barreto Pereira<sup>I</sup> Edwin Elard Garcia-Rojas<sup>I,II\*</sup>**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Publicado em Ciência Rural, Santa Maria, v.45, n.1, p.155-162, jan, 2015. doi:10.1590/0103-8478cr20140315

## RESUMO

Emulsões múltiplas têm sido reconhecidas como uma nova tecnologia para as indústrias de alimentos. Devido a sua estrutura diferenciada dos demais sistemas coloidais, ou seja, existência de duas fases dispersas, esse grupo de emulsão apresenta vantagens em relação às emulsões convencionais, principalmente, no que se refere ao encapsulamento, à proteção e à liberação controlada de componentes bioativos. Assim, a estabilidade e a biodisponibilidade dos encapsulados podem ser aumentadas ou otimizadas, fato que possibilita o planejamento de melhores resultados pela indústria, por meio da produção de novos alimentos. Ainda, com a perspectiva de aumentar o valor nutricional de muitos alimentos industrializados, infere-se uma maior contribuição deles para a promoção da saúde e para prevenção e tratamento de certas doenças crônico-degenerativas. A presente revisão apresenta as bases da tecnologia usual de elaboração de emulsão múltipla, os principais processos de instabilidade a que esse sistema está susceptível, e a aplicação de emulsões múltiplas como sistemas encapsuladores e transportadores de componentes bioativos.

**Palavras-chave:** Encapsulamento, Sistemas coloidais, Biodisponibilidade, Novos alimentos.

## ABSTRACT

Multiple emulsions have been recognized as a new technology for the food industry. Due to their different structure from other colloidal systems, namely the existence of two dispersed phases, this group of emulsion has advantages over conventional emulsions, especially with regard to packaging, protection and controlled release of bioactive components. Thus, the stability and bioavailability of encapsulated may be increased or optimized, a fact that enables the planning of better results by the industry through the production of new foods. Also, the prospect of increasing the nutritional value of many processed foods, infers greater contribution to the promotion of health and prevention and treatment of certain chronic diseases. This review presents the bases of the usual technology of preparation of multiple emulsion, the main processes of instability that this system is susceptible, and the application of multiple emulsions as encapsulating systems and carriers of bioactive components.

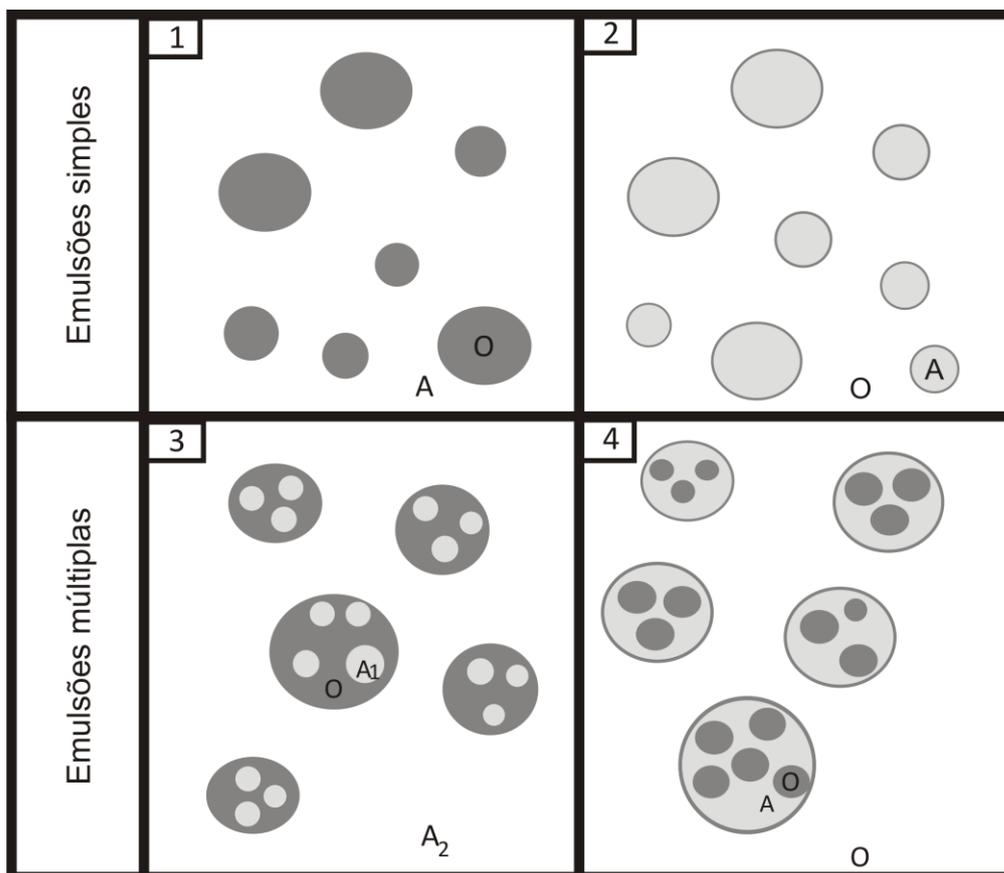
**Key words:** Encapsulation, Colloidal systems, Bioavailability, Novel foods.

## 1 Introdução

Emulsões são sistemas coloidais largamente utilizados pela indústria de alimentos, e consistem de mistura, dispersão ou suspensão de dois ou mais líquidos imiscíveis, geralmente, óleo e água. Esses sistemas apresentam uma fase dispersa, em forma de gotas esféricas e pequenas (diâmetro de 0,1 $\mu$ m a 100 $\mu$ m), e uma fase contínua (HILL, 1996; WALSTRA & VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011; LAM & NICKERSON, 2013). São termodinamicamente instáveis (metaestáveis), devido à positiva e elevada energia livre (tensão interfacial) existente entre as duas fases. Entretanto, quanto menor o tamanho das gotas dispersas e maiores a densidade e a viscosidade da fase contínua, maior e melhor será a estabilidade cinética da emulsão (MCCLEMENTS, 2011; SAMAVATI et al., 2011).

Existem dois grupos principais de emulsão: emulsões simples e emulsões múltiplas. Seus tipos são definidos conforme a distribuição relativa das diferentes fases que compõem o sistema. Sistemas formados por gotas de óleo, dispersas em uma fase aquosa, são chamados de emulsões simples óleo/água (O/A), tendo, como exemplo, o leite, o iogurte, os cremes, os molhos para saladas, a maionese, o sorvete e as sopas. Menos frequente, sistemas formados por gotas de água dispersas em uma fase óleo são chamados emulsões simples água/óleo (A/O), tendo, como exemplo, a margarina e a manteiga.

Emulsões múltiplas possuem estrutura mais complexa que a das emulsões simples. Os tipos mais comuns são água/óleo/água (A/O/A) e óleo/água/óleo (O/A/O). Por exemplo, emulsões A/O/A são compostas de gotas de água dispersas em gotas de óleo, sendo que estas últimas são dispersas, ainda, em outra fase aquosa, chamada de fase aquosa externa (BOUYER et al., 2012). As emulsões múltiplas têm sido frequentemente empregadas no preparo de micro e nanoencapsulados hidrofílicos e lipofílicos, na forma sólida ou semi-sólida, tais como fármacos, corantes, minerais, probióticos, antioxidantes, vitaminas, entre outros (HILL, 1996; MCCLEMENTS et al., 2007; PERRECHIL, 2008; WALSTRA & VAN VLIET, 2010; BOUYER et al., 2012; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b; LAM & NICKERSON, 2013; BENICHOU et al., 2014). Na Figura 24, são apresentadas, esquematicamente, as estruturas das emulsões simples e múltiplas.



**Figura 24** Representação esquemática das estruturas das emulsões simples e múltiplas mais comuns. 1: emulsão simples O/A; 2: emulsão simples A/O; 3: emulsão múltipla A/O/A; 4: emulsão múltipla O/A/O. A: fase aquosa; O: fase óleo; A<sub>1</sub>: fase aquosa interna; A<sub>2</sub>: fase aquosa externa. Adaptado de: BOUYER et al. (2012).

Devido a suas características estruturais, as emulsões múltiplas possuem alto potencial para aplicação em alimentos, como: liberação controlada de aromas e sabores, modulação de aromas e sabores indesejáveis, produção de alimentos com baixo conteúdo calórico-lipídico (*diet e light*), transporte e liberação controlada de componentes bioativos encapsulados, e proteção dessas substâncias da oxidação e da ação de certas enzimas, após sua ingestão e durante o processo digestivo (BENICHOU et al., 2004; MUSCHIOLIK, 2007; MCCLEMENTS et al., 2007; DICKINSON, 2011; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013a).

A liberação controlada de componentes bioativos de uma emulsão múltipla, da fase contínua interna para fase contínua externa, tem sido demonstrada em diversas pesquisas da área médica, farmacêutica, de cosméticos, entre outras. Para aplicação em alimentos, faz-se necessária, portanto, a formação de um sistema o mais estável possível, para, então, suplementá-lo de componentes bioativos sensíveis a variações ambientais, geralmente protegidos na fase contínua interna (MUSCHIOLIK, 2007).

Neste artigo de revisão, são abordadas as bases da tecnologia usual de elaboração de emulsão múltipla, os principais processos de instabilidade que esse sistema está susceptível, e finalmente, a aplicação de emulsões múltiplas como sistemas encapsuladores e transportadores específicos de componentes bioativos.

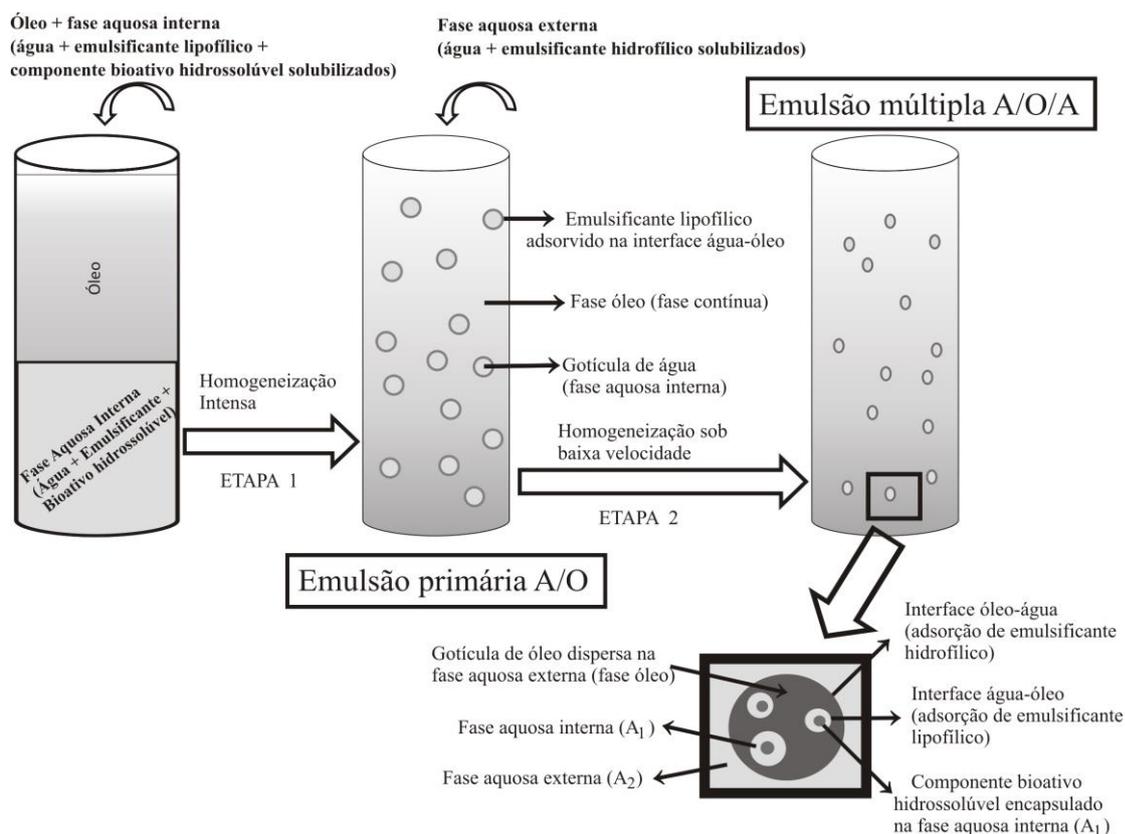
## 2 Emulsões Múltiplas

Emulsões múltiplas, também chamadas de emulsões duplas ou de “emulsões de emulsões”, são sistemas multi-compartimentalizados, aparentemente de fase única, porém, formados por três fases, geralmente com diferentes composições, nos quais emulsões O/A e A/O coexistem (GARTI, 1997; BENICHOU et al., 2004). Os tipos mais comuns de emulsão múltipla são A/O/A e O/A/O, sendo as primeiras mais utilizadas em alimentos. Emulsões A/O/A consistem de gotas pequenas de água (chamadas de fase aquosa interna -  $A_1$ ) dispersas em gotas maiores de óleo, sendo essas gotas de óleo, ainda, dispersas em outra fase aquosa (chamada de fase aquosa externa -  $A_2$ ). Esse grupo de emulsão é, portanto, composto por duas fases aquosas (uma interna e outra externa) e uma fase óleo, localizada entre as duas fases aquosas. As fases são separadas por dois tipos de interface: interface A/O e O/A, as quais são estabilizadas por meio de emulsificantes lipofílico e hidrofílico, respectivamente (JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b). Possuem baixa estabilidade termodinâmica (metaestáveis) e, por isso, ao longo do tempo de armazenamento, ocorrem mudanças em suas estruturas, que ocasionam perda de componentes bioativos neles encapsulados. Por isso, para serem de uso prático, as emulsões múltiplas devem exibir, sob condições de armazenamento, perda mínima de encapsulados, quando destinadas a esse fim. (MUSCHIOLIK, 2007; HERZI et al., 2014).

## 3 Elaboração de Emulsão Múltipla

Com o objetivo principal de garantir estabilidade cinética às emulsões múltiplas, sua elaboração é realizada em duas etapas, chamadas de etapas de emulsificação. Para tanto, faz-se necessária a utilização de dois emulsificantes, um hidrofílico (com alto valor de balanço hidrofílico-lipofílico – BHL), como, por exemplo, o Tween 80, e outro lipofílico (com baixo valor de balanço hidrofílico-lipofílico – BHL), como o monoestearato de glicerila (WALSTRA & VAN VLIET, 2010; AKHTAR et al., 2013, HERZI et al., 2014).

As etapas de emulsificação contribuem significativamente para a obtenção de sistemas de composição bem definidos e com distribuição de tamanho de partículas mais homogênea. No caso da elaboração de emulsão múltipla A/O/A, forma-se, na primeira etapa, uma emulsão primária, do tipo  $A_1/O$ , mediante homogeneização intensa (alta pressão ou alta velocidade de agitação/mistura). Para tanto, faz-se necessária a utilização de um emulsificante lipofílico, capaz de produzir e estabilizar a interface  $A_1-O$ . Na segunda etapa, procede-se a homogeneização da emulsão primária  $A_1/O$  com outra fase aquosa ( $A_2$ ), por meio de homogeneização com menor velocidade de agitação. Para tanto, faz-se necessária a utilização de um emulsificante hidrofílico, capaz de produzir e estabilizar a interface  $O-A_2$ . Dessa forma, uma emulsão múltipla do tipo  $A_1/O/A_2$  é formada. A aplicação de processos de homogeneização mais suaves, na segunda etapa, evita a ruptura das gotas da fase aquosa interna ( $A_1/O$ ). No entanto, se o processo de homogeneização for demasiadamente suave, podem-se obter sistemas altamente polidispersos, e, ao contrário, se muito intenso, a eficiência de encapsulamento diminui (GARTI, 1997; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013a). Dependendo do método utilizado para elaboração de emulsão múltipla A/O/A e de sua composição, esse tipo de emulsão pode permanecer estável por mais de 8 meses, se utilizada em matriz alimentícia (MUSCHIOLIK, 2007). Na Figura 25, é apresentado, esquematicamente, o método usualmente utilizado para elaboração de emulsão múltipla do tipo A/O/A, para aplicação em microencapsulamento (fase aquosa interna) de componente bioativo hidrossolúvel.



**Figura 25** Representação esquemática do método usualmente utilizado para elaboração de emulsão múltipla do tipo A/O/A para aplicação em encapsulamento (fase aquosa interna) de componente bioativo hidrossolúvel.

#### 4 Mecanismo de Desestabilização das Emulsões Múltiplas

Segundo a lei da termodinâmica, todos os sistemas tendem a reestabelecerem seus estados iniciais de energia mínima e, por isso, no caso de emulsões, há tendência natural de diminuição da área de contato interfacial. Isso justifica a susceptibilidade das emulsões à separação de fase, e outras instabilidades como: floculação, coalescência, cremação, sedimentação e maturação de Ostwald. Os processos de instabilidade mais comuns observados em emulsões múltiplas são a maturação de Ostwald e a coalescência, os quais são apresentados a seguir (WALSTRA & VAN VLIET, 2010; BOUYER. et al., 2012; HERZI et al., 2014).

##### 4.1 Maturação de Ostwald

Maturação de Ostwald é um processo no qual ocorre difusão das gotas da fase dispersa para a fase contínua, sem que haja contato entre as gotas. Neste caso, as gotas aumentam de tamanho. É um processo irreversível e depende da solubilidade dos constituintes da fase dispersa em relação aos da fase contínua. Portanto, é incomum sua ocorrência em emulsões O/A preparadas com óleos apolares (baixa solubilidade), constituídos por triacilgliceróis de cadeia longa, como, óleo de milho, de soja, de girassol e de peixe. Ao contrário, a maturação de Ostwald pode ocorrer rapidamente, se utilizado, no preparo das emulsões, óleos polares, como triacilgliceróis de cadeia curta, óleos aromáticos e óleos

essenciais (DAMODARAN, 2005; WALSTRA & VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011).

## **4.2 Coalescência**

A coalescência é um processo irreversível e, ao contrário da maturação de Ostwald, é caracterizada pelo aumento das gotas dispersas, quando suas paredes são destruídas. A coalescência parcial ocorre quando parte do óleo das gotas cristaliza-se, formando-se uma rede de cristais que não coalesce completamente. Portanto, a ruptura do filme entre gotas muito próximas pode ser desencadeada por um cristal que se projeta da superfície de uma gota. Durante fluxo ou agitação, esse processo pode ocorrer a uma velocidade seis ordens de grandeza maior que a da chamada verdadeira coalescência (WALSTRA & VAN VLIET, 2010).

## **5 Emulsão Múltipla como Sistema Encapsulador e Transportador de Componentes Bioativos**

### **5.1 Componentes bioativos**

Componentes bioativos ou substâncias bioativas são classificadas em duas categorias: nutracêuticos e tóxicos. Os nutracêuticos são componentes ativos naturais, que, ao contrário das substâncias tóxicas, apresentam efeito benéfico à saúde. No geral, os alimentos contêm tanto substâncias nutracêuticas quanto tóxicas. No entanto, alimentos que apresentam balanço positivo de nutracêuticos têm potencial necessário para melhorar o estado de saúde, o bem-estar e também de reduzir o risco de certas doenças crônico-degenerativas. Esses alimentos são chamados de alimentos funcionais. A maioria dos vegetais consumidos pelo homem possui essa característica. O efeito das substâncias nutracêuticas tem se mostrado promissor em relação à prevenção de câncer e, a partir desse resultado, o isolamento e o encapsulamento dessas substâncias têm sido realizados por diferentes indústrias (MCCLEMENTS et al., 2009; HO et al., 2010; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b).

Uma variedade de sistemas coloidais tem sido empregada no encapsulamento e transporte de componentes bioativos para consumo oral, os quais incluem: microemulsões, lipossomas, nanoemulsões, emulsões simples, emulsões de multicamada, emulsões múltiplas, nanopartículas de lipídeos sólidos, suspensões de nanocristais e partículas poliméricas (FLANGAN & SINGH, 2006; MCCLEMENTS et al., 2007; MULLER et al., 2011; MCCLEMENTS, 2011).

Em comparação às emulsões simples, emulsões múltiplas mostram-se mais eficazes como meios de microencapsulamento, de proteção, de transporte e de liberação controlada de componentes bioativos, tanto hidrossolúveis quanto lipossolúveis (CHEN et al., 2006; FLANGAN & SINGH, 2006; SPERNATH & ASERIN, 2006; MCCLEMENTS et al., 2007; AKHTAR et al., 2013). As características químicas e estruturais desses sistemas multicompartimentalizados tornam possível, sob condições ambientais diversas, o encapsulamento, em diferentes locais, de componentes bioativos. Por exemplo, componentes bioativos hidrossolúveis (mineirais, vitaminas, aminoácidos, peptídios, fibras, entre outros) podem ser encapsulados, tanto na fase aquosa interna ( $A_1$ ), quanto na fase aquosa externa ( $A_2$ ) de uma emulsão A/O/A. Os componentes lipossolúveis, como vitaminas A, D, E e K, são encapsulados na fase óleo da emulsão múltipla A/O/A ou nas fases óleo de emulsões

múltiplas O/A/O, durante a primeira ou segunda etapa de homogeneização (JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013a).

As propriedades de encapsulamento das emulsões múltiplas A/O/A são frequentemente avaliadas em termos de eficiência de encapsulamento (EE), a qual é definida como a quantidade de componente encapsulado remanescente na fase aquosa interna ( $A_1$ ), após o processo de elaboração da emulsão múltipla (JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013a).

Devido aos benefícios à saúde, medicamentos (anticarcinogênicos, hormônios, entre outros), cosméticos (cremes com compostos encapsulados), e nutracêuticos são exemplos de substâncias-alvo da tecnologia de microencapsulamento, por meio de técnica de emulsificação (BENICHOU et al., 2004; KUKIZAKI & GOTO, 2007; MUSCHIOLIK, 2007).

## **6 Novos Produtos com Componentes Bioativos Encapsulados**

Devido à crescente preocupação dos consumidores em geral, das autoridades públicas e da mídia em relação à saúde, à qualidade de vida e à nutrição equilibrada, centros de pesquisa e indústrias afins têm realizado estudos com o escopo de melhorar, principalmente, a estabilidade e a biodisponibilidade de vários componentes bioativos. Muitos desses componentes são quimicamente instáveis e, por isso, tendem a se degradar ao longo do tempo de armazenamento, como é o caso dos lipídios poli-insaturados, dos carotenoides, dos flavonoides, dos fitosteróis, do ácido ascórbico, entre outros (MCCLEMENTS & DECKER, 2000; MCCLEMENTS et al., 2009; BOON et al., 2010).

O desenvolvimento de novos produtos requer estratégia adequada para definir e garantir a presença dos componentes desejados (nutrientes, nutracêuticos, corantes, fármacos, entre outros), seja por aumento da proporção dos que exibem efeito benéfico à saúde e/ou por redução dos que interagem com outros componentes da formulação; ou que apresentam alguma implicação negativa para a saúde do consumidor. Uma variedade de matérias-primas (de origem animal e vegetal), associada à aplicação estratégica de tecnologia específica, podem ser utilizadas em vários processos de produção (JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b). Alimentos que não sejam fontes de nutrientes específicos, ou que, por consequência de um processamento, tenham reduzidos, significativamente, seus teores, podem ser fortificados via esses novos produtos.

Sendo as emulsões múltiplas meios adequados para o microencapsulamento de componentes bioativos diversos, e uma vez utilizadas em matriz alimentícia, tornam-se uma interessante opção tecnológica, a qual permitirá, por exemplo, o aumento do consumo de tais substâncias (JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b). Na Tabela 17, são apresentadas as características gerais de formação de emulsões múltiplas empregadas no microencapsulamento de componentes bioativos.

**Tabela 17** Características gerais de formação de emulsões múltiplas empregadas no microencapsulamento de componentes bioativos.

| Tipo    | Encapsulado                                 | Emulsificantes                                 | Fase óleo                                   | Equipamentos utilizados e condições operacionais   | Referência             |
|---------|---|--|---|--|------------------------|
| A/O/A   | Mg <sup>+2</sup>                            | PGPR*<br>(lipofílico)                          | Miglyol                                     | Etapa 1 (Emulsão primária A/O)<br>Célula de Couette - gap: 200µm<br>taxa de agitação: 2600s <sup>-1</sup> .<br><br>Etapa 2 (Emulsão múltipla A/O/A)<br>Célula de Couette - gap: 100 µm<br>taxa de agitação: 6300s <sup>-1</sup> a 14.500 s <sup>-1</sup> . | HERZI et al., 2014.    |
| O/A/O** | Óleo essencial de <i>Satureja hortensis</i> | Tween 80<br>(hidrofílico)                      | Óleo essencial de <i>Satureja hortensis</i> | Etapa 1 (Emulsão primária O/A)<br>Homogeneizador Ultra Turrax<br>taxa de agitação: 13.500 rpm/5 min.<br><br>Etapa 2 (Emulsão múltipla O/A/O)<br>Homogeneizador Ultra Turrax<br>taxa de agitação: 10.000 rpm/3 min.   | HOSSEINI et al., 2013. |
| A/O/A   | Flavonoides (Quercetina e Antocianina)      | Arlacel P135<br>Citrol PG3PR*<br>(lipofílicos) | Óleo de girassol                            | Etapa 1 (Emulsão primária A/O)<br>Homogeneizador a pressão (300 bar).<br><br>Etapa 2 (Emulsão múltipla A/O/A)<br>Agitação suave por 5 min;<br><i>Spinning disc</i><br>taxa de agitação: 2000 rpm/7mL s <sup>-1</sup> .                                     | AKHTAR et al., 2013.   |
| O/A/O   | Ômega-3                                     | Caseinato de sódio<br>(hidrofílico)            | Mistura de óleos ricos em ômega-3           | Etapa 1 (Emulsão primária O/A)<br>Misturador Silverson/5min;<br>Homogeneizador a pressão<br>Pressão (estágio 1): 17,24 Mpa;<br>Pressão (estágio 2): 3,45 Mpa;<br>Temperatura de operação: (55°C).  | O' DWYER et al., 2013. |
|         |   | PGPR*<br>(lipofílico)                          | Óleo de palma/Óleo de girassol              | Etapa 2 (Emulsão múltipla O/A/O)<br>Misturador Silverson.  |                        |

\*polirricinoleato de poliglicerol (emulsificante extraído do óleo de mamona).

\*\*elaboração de emulsão múltipla como parte do processo de formação de micropartículas de alginato.

## 7 Digestão de Componentes Bioativos Microencapsulados em Sistemas Transportadores

Para se elaborar uma emulsão capaz de transportar, eficientemente, nano ou micropartículas, faz-se necessária a compreensão dos processos fisiológicos que regulam a captação e a biodisponibilidade da substância em questão, uma vez que o processo de digestão e de absorção podem diferir, significativamente, de uma substância para outra, e de um alimento para outro (ACOSTA, 1999).

Biodisponibilidade é a fração da dose ingerida de alguma substância (nutriente, nutracêutico, fármacos) presente na corrente sanguínea, que se torna, a partir de então, disponível em algum sítio de ação no organismo, seja para utilização ou para armazenamento (ACOSTA, 1999; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013b). Entretanto, absorção intestinal refere-se à fração da dose que é absorvida através da parede intestinal.

Após o alimento ter sido parcialmente digerido, por meio da mastigação, ele é dissolvido no estômago, em condições ácidas (pH entre 1 e 2), por aproximadamente 3 horas. Porém, a dissolução de um componente bioativo, dependendo de sua estabilidade em pH

ácido, pode não ser desejada. Neste caso, ele pode, por exemplo, ser protegido do meio ácido do estômago, por revestimentos elaborados a partir do tecido do intestino.

O tamanho médio dos agregados de sais biliares varia de 4nm (para micelas) a 60nm (para vesículas). Em alguns casos, esses compostos atuam como sistemas naturais de transporte de nanopartículas. Por exemplo, carotenoides dissolvidos em moléculas de triacilgliceróis (como ocorrem nas fontes naturais) são emulsificados pelos sais biliares, porém seus extratos purificados não se tornam biodisponíveis, se consumidos sem alimentos, uma vez que as micelas de sais biliares, por apresentarem tamanho menor que esses componentes, não os solubilizam. Nesse caso, os carotenoides devem fazer parte de uma formulação de transporte, como as emulsões múltiplas A/O/A ou O/A/O, a qual garanta sua biodisponibilidade no organismo (ACOSTA, 1999). Ainda, muitos componentes bioativos são cristalinos às temperaturas ambiente e corporal, e por isso, têm reduzidas suas solubilidade e permeabilidade, sendo outro fator limitante da absorção deles, através do trato gastrointestinal (PORTER et al., 2008).

Por isso, para elaboração de um eficiente sistema microencapsulador-transportador de componentes bioativos, deve-se compreender os principais fatores que influenciam a sua formação, sua estabilidade, suas propriedades e desempenho (MCCLEMENTS, 2012).

## 8 CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, as emulsões múltiplas, devido, principalmente, às suas características estruturais, têm sido empregadas de forma eficaz no microencapsulamento, na proteção e na liberação controlada de componentes bioativos hidrossolúveis e lipossolúveis. Resultados de pesquisas desse período permitiram melhor compreensão de variáveis como: estabilidade, solubilidade, permeabilidade, eficiência de encapsulamento e biodisponibilidade de vários componentes bioativos. Embora ainda sejam necessárias pesquisas para um maior aprofundamento no que tange à biodisponibilidade dos encapsulados no organismo humano (em todas as etapas do processo digestório), a aplicação de emulsões múltiplas, como veiculadores desses componentes em novos alimentos, tornou-se possível e promissora para a indústria de alimentos. Além de serem capazes, não somente de melhorar a estabilidade e os aspectos sensoriais dos alimentos, são também fontes potenciais de nutracêuticos. Dessa forma, podem fazer parte de estratégias de aumento do consumo dessas substâncias e, conseqüentemente, contribuir para a promoção, a prevenção, e até mesmo para o tratamento de certas doenças crônico-degenerativas, como hipertensão arterial, obesidade, diabetes melitos tipo 2, câncer, entre outras.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.14, p.3-15, 2009.

AKHTAR, M. et al. Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. **Food Hydrocolloids**, v.34, p.1-6, 2013.

BENICHO, A. et al. Double emulsions stabilized with hybrids natural polymers for entrapment and slow release of active matters. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108/109, p.29-41, 2004.

BOON, C.S. et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.50, n.6, p.515-532, 2010.

BOUYER, E. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, n.1-2, p.359-378, 2012.

CHEN, L. et al. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, n.5, p.272-283, 2006.

DAMODARAN, S. Protein stabilization of emulsions and foams. **Journal of Food Science**, v.70, n.3, p.54-66, 2005.

DICKINSON, E. Double emulsions stabilized by food biopolymers. **Food Biophysics**, v.6, p.1-11, 2011.

FLANGAN J.; SINGH, H. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, n.3, p.221-237, 2006.

GARTI, N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.30, n.3, p.222-235, 1997.

HERZI, S. et al. Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.441, p.489-495, 2014.

HILL, S.E. Emulsion. In: HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. Cap.6, p.153-185.

HO, CHI-TANG. et al. Substâncias bioativas: nutracêuticas e tóxicas. In: DAMODARAN, S. et al. **Química de alimentos de fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap.12, p.585-608.

HOSSEINI, S.M.H. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.62, p.582-588, 2013.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales. **Nutrición Hospitalaria**, v.28, n.5, p.1413-1421, 2013a.

- JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Potencial applicatons of multiple emulsions in the developmet of healthy and functional foods. **Food Research International**, v.52, n.1, p.64-74, 2013b.
- KUKIZAKI, M.; GOTO, M. Preparation and evaluation of uniformly sized solid lipid microcapsules using membrane emulsification. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.293, n.1-3, p.87-94, 2007.
- LAM, R.S.H.; NICKERSON, M.T. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. **Foods Chemistry**, v.141, n.2, p.975-984, 2013.
- MCCLEMENTS, D.J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsion: Implications for emulsion-based delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.174, p.1-30, 2012.
- MCCLEMENTS, D.J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **The Royal Society of Chemistry**, v.7, p.2297-2316, 2011.
- MCCLEMENTS, D.J. et al. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v.72, n.8, p.109-124, 2007.
- MCCLEMENTS, D.J. et al. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.49, n.6, p.577-606, 2009.
- MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v.65, n.8, p.1270-1282, 2000.
- MULLER, R.H. et al. State of the art of nanocrystals-special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.78, n.1, p.1-9, 2011.
- MUSCHIOLIK, G. Multiple emulsions for food use. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.12, n.4-5, p.213-220, 2007.
- O' DWYER, S.P. et al. Formation, rheology and susceptibility to lipid oxidation of multiple emulsions (O/W/O) in table spreads containing omega-3 rich oils. **LWT – Food Science and Technology**, v.51, n.2, p.484-491, 2013.
- PERRECHIL, F.A. **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**. 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- PORTER, C.J.H. et al. Lipid-based systems for the enhanced delivery of poorly water soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, n.6, p.615-616, 2008.
- SAMAVATI, V. et al. Stability and rheology of dispersions containing polysaccharide, oleic acid and whey protein isolate. **Journal of Texture Studies**, v.43, n.1, p.63-76, 2011.

SPERNATH, A.; ASERIN, A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.128/130, p.47-64, 2006.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. Sistemas dispersos: considerações básicas. In: DAMODARAN, S. et al. **Química de alimentos de fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap.13, p.611-660.

## CONCLUSÃO GERAL

O método de elaboração de emulsão utilizado nessa pesquisa, permitiu a formação de emulsões O/A, por meio da maioria das formulações testadas. O maior período de tempo de estabilidade à separação de fases, correlacionou-se com a presença, concomitante, dos biopolímeros GA e OV, e ausência de GX. Parece ter havido uma interação molecular indesejável, e conseqüente formação de uma monocamada interfacial pouco espessa e de baixa aderência, quando os biopolímeros GA, OV e GX estiveram presentes no mesmo sistema. Devido ao comportamento reológico semelhante ao da maioria das emulsões alimentícias, os sistemas compostos por GA e OV apresentaram potencial para aplicação tecnológica nessas matrizes. As condições de solubilização do  $\beta$ -caroteno na fase óleo das emulsões, parecem ter sido decisivas para se alcançar um adequado encapsulamento desse carotenoide, nos sistemas estudados. Sistemas contendo os biopolímeros OV e GA na razão de 1:10, respectivamente, mostraram-se mais eficientes em aumentar a estabilidade dos sistemas, à separação de fases, e também em melhor inibir a degradação do  $\beta$ -caroteno, à 25°C e 55°C. No entanto, como esperado, à 55°C, a degradação do  $\beta$ -caroteno foi expressivamente maior e mais rápida. Além da temperatura, possivelmente outros fatores influenciaram a degradação do carotenoide, como o pH e o oxigênio, uma vez que, antes mesmo do início das análises, quantidade significativa do carotenoide foi degradada. Devido aos resultados de eficiência de encapsulamento e de retenção de  $\beta$ -caroteno, e ao custo do processo de formação das emulsões, esses sistemas podem ser uma interessante opção para o encapsulamento de  $\beta$ -caroteno em matrizes aquosas. Sendo assim, podem ter aplicações para diversos fins, como, por exemplo, corantes hidrossolúveis para alimentos e cosméticos, e como meio de suplementação de  $\beta$ -caroteno em novos produtos, já que possui, esse carotenoide, reconhecidos benefícios à saúde humana.

## SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Outros métodos de formação de emulsão, como a técnica de deposição por multicamada, podem ser experimentados, na tentativa de se alcançar maior compatibilidade molecular entre os biopolímeros GA, GX e OV, e então, aumentar a estabilidade à separação de fase, dos sistemas por eles constituídos.

Estudos da aplicação de métodos conservantes, como o *spray drying* e a liofilização, nos sistemas encapsuladores de  $\beta$ -caroteno, podem ser conduzidos, no intuito de se investigar possível aumento da proteção desse carotenoide, contra os diversos fatores extrínsecos e intrínsecos que influenciam na sua degradação.

## ANEXOS

A - Formulações de emulsões O/A com diferentes combinações e concentrações dos biopolímeros OV, GX e GA (Tabela 18).

B - Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas e de potencial zeta dos sistemas 1, 2, 3, 19, 20 e 36 (Tabelas 19 a 62).

**ANEXO A - Formulações de emulsões O/A com diferentes combinações e concentrações dos biopolímeros OV, GX e GA (Tabela 18).**

| Sistemas | OV (%) | GX (%) | GA (%) | % IEE* (dia 0) | % IEE* (dia 7) |
|----------|--------|--------|--------|----------------|----------------|
| 1        | 0      | 0      | 2,5    | -              | -              |
| 2        | 0      | 0      | 5      | -              | -              |
| 3        | 0      | 0      | 7,5    | 100            | -              |
| 4        | 0      | 0      | 10     | 100            | -              |
| 5        | 0      | 0,1    | 2,5    | 100            | -              |
| 6        | 0      | 0,1    | 5      | -              | -              |
| 7        | 0      | 0,1    | 7,5    | -              | -              |
| 8        | 0      | 0,1    | 10     | 100            | -              |
| 9        | 0      | 0,25   | 2,5    | -              | -              |
| 10       | 0      | 0,25   | 5      | 100            | -              |
| 11       | 0      | 0,25   | 7,5    | 100            | -              |
| 12       | 0      | 0,25   | 10     | 100            | -              |
| 13       | 0      | 0,5    | 2,5    | 100            | -              |
| 14       | 0      | 0,5    | 5      | 100            | -              |
| 15       | 0      | 0,5    | 7,5    | 100            | -              |
| 16       | 0      | 0,5    | 10     | 100            | -              |
| 17       | 0,5    | 0      | 2,5    | -              | -              |
| 18       | 0,5    | 0      | 5      | 100            | -              |
| 19       | 0,5    | 0      | 7,5    | 100            | 100            |
| 20       | 0,5    | 0      | 10     | 100            | 100            |
| 21       | 0,5    | 0,1    | 2,5    | 100            | -              |
| 22       | 0,5    | 0,1    | 5      | 100            | -              |
| 23       | 0,5    | 0,1    | 7,5    | 100            | -              |
| 24       | 0,5    | 0,1    | 10     | 100            | -              |
| 25       | 0,5    | 0,25   | 2,5    | -              | -              |
| 26       | 0,5    | 0,25   | 5      | -              | -              |
| 27       | 0,5    | 0,25   | 7,5    | -              | -              |
| 28       | 0,5    | 0,25   | 10     | 100            | -              |
| 29       | 0,5    | 0,5    | 2,5    | -              | -              |
| 30       | 0,5    | 0,5    | 5      | 100            | -              |
| 31       | 0,5    | 0,5    | 7,5    | 100            | -              |
| 32       | 0,5    | 0,5    | 10     | 100            | -              |
| 33       | 1      | 0      | 2,5    | 100            | -              |
| 34       | 1      | 0      | 5      | 100            | -              |
| 35       | 1      | 0      | 7,5    | 100            | -              |
| 36       | 1      | 0      | 10     | 100            | 100            |
| 37       | 1      | 0,1    | 2,5    | -              | -              |
| 38       | 1      | 0,1    | 5      | -              | -              |
| 39       | 1      | 0,1    | 7,5    | 100            | -              |
| 40       | 1      | 0,1    | 10     | 100            | -              |
| 41       | 1      | 0,25   | 2,5    | -              | -              |
| 42       | 1      | 0,25   | 5      | -              | -              |
| 43       | 1      | 0,25   | 7,5    | -              | -              |
| 44       | 1      | 0,25   | 10     | -              | -              |
| 45       | 1      | 0,5    | 2,5    | -              | -              |
| 46       | 1      | 0,5    | 5      | -              | -              |
| 47       | 1      | 0,5    | 7,5    | -              | -              |
| 48       | 1      | 0,5    | 10     | 100            | -              |

OV: ovalbumina; GX: goma xantana; GA: goma arábica.

\* Valores de IEE igual a 100% indicam emulsão estável à separação de fases.

**ANEXO B - Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas e de potencial zeta dos sistemas 1, 2, 3, 19, 20 e 36 (Tabelas 19 a 62).**

Tabela 19 Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 0 (Tabela 5)

| FV    | GL | SQ          | QM        | F    | p      |
|-------|----|-------------|-----------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 58156,915   | 29078,458 | 0,65 | 0,5264 |
| ERRO  | 39 | 1738475,565 | 44576,297 |      |        |
| TOTAL | 41 | 1796632,480 |           |      |        |

Tabela 20 Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 1 (Tabela 5)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 377151,793  | 188575,896 | 5,30 | 0,0089 |
| ERRO  | 42 | 1495781,407 | 35613,843  |      |        |
| TOTAL | 44 | 1872933,200 |            |      |        |

Tabela 21 Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 7 (Tabela 5)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 322330,150  | 161165,075 | 4,98 | 0,0129 |
| ERRO  | 33 | 1067370,600 | 32344,564  |      |        |
| TOTAL | 35 | 1389700,750 |            |      |        |

Tabela 22 Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas do sistema 19 (Tabela 5)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 803087,375  | 401543,688 | 20,40 | <,0001 |
| ERRO  | 27 | 531400,347  | 19681,494  |       |        |
| TOTAL | 29 | 1334487,722 |            |       |        |

Tabela 23 Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas do sistema 20 (Tabela 5)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F     | p      |
|-------|----|-------------|-------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 507504,1444 | 253752,0722 | 18,26 | <,0001 |
| ERRO  | 27 | 375264,5556 | 13898,6872  |       |        |
| TOTAL | 29 | 882768,7000 |             |       |        |

Tabela 24 Análise de variância dos valores de tamanho médio das partículas do sistema 36 (Tabela 5)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F     | p      |
|-------|----|-------------|-------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 3718533,440 | 1859266,720 | 32,86 | <,0001 |
| ERRO  | 60 | 3394962,670 | 56582,711   |       |        |
| TOTAL | 62 | 7113496,110 |             |       |        |

Tabela 25 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 0 (Tabela 6)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 1,83902778  | 0,91951389 | 1,07 | 0,3612 |
| ERRO  | 21 | 18,05722222 | 0,85986772 |      |        |
| TOTAL | 23 | 19,89625000 |            |      |        |

Tabela 26 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 1 (Tabela 6)

| FV    | GL | SQ         | QM         | F    | p      |
|-------|----|------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 1,57444444 | 0,78722222 | 2,93 | 0,0845 |
| ERRO  | 15 | 4,03500000 | 0,26900000 |      |        |
| TOTAL | 17 | 5,60944444 |            |      |        |

Tabela 27 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 19, 20 e 36, no dia 7 (Tabela 6)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 63,3658730  | 31,6829365 | 4,41 | 0,0276 |
| ERRO  | 18 | 129,2122222 | 7,1784568  |      |        |
| TOTAL | 20 | 192,5780952 |            |      |        |

Tabela 28 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 19 (Tabela 6)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 75,0161111  | 37,5080556 | 6,96 | 0,0048 |
| ERRO  | 21 | 113,1488889 | 5,3880423  |      |        |
| TOTAL | 23 | 188,1650000 |            |      |        |

Tabela 29 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 20 (Tabela 6)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 19,83611111 | 9,91805556 | 5,67 | 0,0123 |
| ERRO  | 18 | 31,47055556 | 1,74836420 |      |        |
| TOTAL | 20 | 51,30666667 |            |      |        |

Tabela 30 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 36 (Tabela 6)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 14,16444444 | 7,08222222 | 15,89 | 0,0002 |
| ERRO  | 15 | 6,68500000  | 0,44566667 |       |        |
| TOTAL | 17 | 20,84944444 |            |       |        |

Tabela 31 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 472323,586  | 236161,793 | 5,74 | 0,0069 |
| ERRO  | 36 | 1482373,183 | 41177,033  |      |        |
| TOTAL | 38 | 1954696,769 |            |      |        |

Tabela 32 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 819021,634  | 409510,817 | 2,83 | 0,0748 |
| ERRO  | 30 | 4340603,005 | 144686,767 |      |        |
| TOTAL | 32 | 5159624,639 |            |      |        |

Tabela 33 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F     | p      |
|-------|----|-------------|-------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 3103266,247 | 1551633,124 | 64,62 | <.0001 |
| ERRO  | 36 | 864363,650  | 24010,101   |       |        |
| TOTAL | 38 | 3967629,897 |             |       |        |

Tabela 34 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F      | p      |
|-------|----|-------------|-------------|--------|--------|
| TRAT  | 2  | 9040266,150 | 4520133,075 | 543,03 | <.0001 |
| ERRO  | 36 | 299660,517  | 8323,903    |        |        |
| TOTAL | 38 | 9339926,667 |             |        |        |

Tabela 35 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F      | p      |
|-------|----|-------------|------------|--------|--------|
| TRAT  | 2  | 9564979,07  | 4782489,54 | 248,44 | <.0001 |
| ERRO  | 36 | 693006,52   | 19250,18   |        |        |
| TOTAL | 38 | 10257985,59 |            |        |        |

Tabela 36 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas do sistema 1, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 4  | 2804662,256 | 701165,564 | 43,38 | <.0001 |
| ERRO  | 52 | 840491,639  | 16163,301  |       |        |
| TOTAL | 56 | 3645153,895 |            |       |        |

Tabela 37 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas do sistema 2, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 4  | 717073,420  | 179268,355 | 11,74 | <.0001 |
| ERRO  | 58 | 885306,517  | 15263,905  |       |        |
| TOTAL | 62 | 1602379,937 |            |       |        |

Tabela 38 Análise de variância dos valores do tamanho médio das partículas do sistema 3, à 25°C (Tabela 8)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 4  | 10520528,18 | 2630132,04 | 28,27 | <.0001 |
| ERRO  | 64 | 5954208,72  | 93034,51   |       |        |
| TOTAL | 68 | 16474736,89 |            |       |        |

Tabela 39 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 32,3458333  | 16,1729167 | 5,84 | 0,0078 |
| ERRO  | 27 | 74,7958333  | 2,7702160  |      |        |
| TOTAL | 29 | 107,1416667 |            |      |        |

Tabela 40 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 627,325107  | 313,662554 | 4,46 | 0,0202 |
| ERRO  | 30 | 2111,029481 | 70,367649  |      |        |
| TOTAL | 32 | 2738,354588 |            |      |        |

Tabela 41 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 549,782091  | 274,891045 | 6,54 | 0,0038 |
| ERRO  | 36 | 1512,036940 | 42,001026  |      |        |
| TOTAL | 38 | 2061,819031 |            |      |        |

Tabela 42 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 34,0288889  | 17,0144444 | 7,73 | 0,0018 |
| ERRO  | 33 | 72,6333333  | 2,2010101  |      |        |
| TOTAL | 35 | 106,6622222 |            |      |        |

Tabela 43 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F      | p      |
|-------|----|-------------|-------------|--------|--------|
| TRAT  | 2  | 2809,368800 | 1404,684400 | 123,22 | <,0001 |
| ERRO  | 33 | 376,182000  | 11,399455   |        |        |
| TOTAL | 35 | 3185,550800 |             |        |        |

Tabela 44 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 1, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 4  | 2295,746814 | 573,936703 | 25,52 | <,0001 |
| ERRO  | 49 | 1101,963329 | 22,489048  |       |        |
| TOTAL | 53 | 3397,710143 |            |       |        |

Tabela 45 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 2, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 981,286000  | 245,321500 | 20,98 | <,0001 |
| ERRO  | 55 | 643,075833  | 11,692288  |       |        |
| TOTAL | 59 | 1624,361833 |            |       |        |

Tabela 46 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 3, à 25°C (Tabela 10)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 4  | 2482,081460 | 620,520365 | 14,21 | <,0001 |
| ERRO  | 55 | 2401,638425 | 43,666153  |       |        |
| TOTAL | 59 | 4883,719885 |            |       |        |

Tabela 47 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F     | p      |
|-------|----|-------------|-------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 38058673,21 | 19029336,60 | 21,45 | <,0001 |
| ERRO  | 36 | 31938760,21 | 887187,78   |       |        |
| TOTAL | 38 | 69997433,42 |             |       |        |

Tabela 48 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 3448529,39  | 1724264,69 | 1,90 | 0,1663 |
| ERRO  | 33 | 30020940,83 | 909725,48  |      |        |
| TOTAL | 35 | 33469470,22 |            |      |        |

Tabela 49 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 7060389,37  | 3530194,69 | 1,35 | 0,2751 |
| ERRO  | 31 | 81318070,43 | 2623163,56 |      |        |
| TOTAL | 33 | 88378459,80 |            |      |        |

Tabela 50 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 11050757,77 | 5525378,89 | 8,28 | 0,0014 |
| ERRO  | 30 | 20027378,47 | 667579,28  |      |        |
| TOTAL | 32 | 31078136,24 |            |      |        |

Tabela 51 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 11167404,78 | 5583702,39 | 2,48 | 0,1019 |
| ERRO  | 28 | 63026250,57 | 2250937,52 |      |        |
| TOTAL | 30 | 74193655,35 |            |      |        |

Tabela 52 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas dos sistema 1, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F     | p       |
|-------|----|-------------|-------------|-------|---------|
| TRAT  | 4  | 42706174,14 | 10676543,54 | 17,26 | <0,0001 |
| ERRO  | 52 | 32169926,53 | 618652,43   |       |         |
| TOTAL | 56 | 74876100,67 |             |       |         |

Tabela 53 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas do sistema 2, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p       |
|-------|----|-------------|------------|-------|---------|
| TRAT  | 4  | 75921042,3  | 18980260,6 | 18,03 | <0,0001 |
| ERRO  | 52 | 54736915,4  | 1052633,0  |       |         |
| TOTAL | 56 | 130657957,7 |            |       |         |

Tabela 54 Análise de variância dos valores de tamanho das partículas do sistema 3, à 55°C (Tabela 12)

| FV    | GL | SQ          | QM        | F    | p      |
|-------|----|-------------|-----------|------|--------|
| TRAT  | 4  | 18639445,0  | 4659861,2 | 1,80 | 0,1413 |
| ERRO  | 54 | 139424558,6 | 2581936,3 |      |        |
| TOTAL | 58 | 158064003,5 |           |      |        |

Tabela 55 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 0, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM          | F     | p      |
|-------|----|-------------|-------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 449,9475897 | 224,9737949 | 58,63 | 0,0001 |
| ERRO  | 36 | 138,1360000 | 3,8371111   |       |        |
| TOTAL | 38 | 588,0835897 |             |       |        |

Tabela 56 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 1, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 1306,066117 | 653,033059 | 23,19 | 0,0001 |
| ERRO  | 33 | 929,423452  | 28,164347  |       |        |
| TOTAL | 35 | 2235,489569 |            |       |        |

Tabela 57 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 2, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 2  | 119,0572222 | 59,5286111 | 18,68 | 0,0001 |
| ERRO  | 33 | 105,1458333 | 3,1862374  |       |        |
| TOTAL | 35 | 224,2030556 |            |       |        |

Tabela 58 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 3, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 405,519439  | 202,759719 | 8,17 | 0,0013 |
| ERRO  | 33 | 818,920192  | 24,815763  |      |        |
| TOTAL | 35 | 1224,439631 |            |      |        |

Tabela 59 Análise de variância dos valores de potencial zeta dos sistemas 1, 2 e 3, no dia 7, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 2  | 53,9459848  | 26,9729924 | 5,93 | 0,0067 |
| ERRO  | 30 | 136,3691667 | 4,5456389  |      |        |
| TOTAL | 32 | 190,3151515 |            |      |        |

Tabela 60 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 1, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F     | p      |
|-------|----|-------------|------------|-------|--------|
| TRAT  | 4  | 205,0556667 | 51,2639167 | 33,99 | <,0001 |
| ERRO  | 55 | 82,9541667  | 1,5082576  |       |        |
| TOTAL | 59 | 288,0098333 |            |       |        |

Tabela 61 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 2, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM        | F    | p      |
|-------|----|-------------|-----------|------|--------|
| TRAT  | 4  | 380,137018  | 95,034254 | 7,62 | <,0001 |
| ERRO  | 52 | 648,383333  | 12,468910 |      |        |
| TOTAL | 56 | 1028,520351 |           |      |        |

Tabela 62 Análise de variância dos valores de potencial zeta do sistema 3, à 55°C (Tabela 14)

| FV    | GL | SQ          | QM         | F    | p      |
|-------|----|-------------|------------|------|--------|
| TRAT  | 4  | 615,965584  | 153,991396 | 6,39 | <,0002 |
| ERRO  | 58 | 1396,657143 | 24,080296  |      |        |
| TOTAL | 62 | 2012,622727 |            |      |        |

FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: valor de F; p: valor de p; Total: erro corrigido.