



AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES PARA BEBIDAS

Rayane Brandão Gaspar

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Marcio Nele de Souza

Rio de Janeiro

Março de 2015

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES PARA BEBIDAS

Rayane Brandão Gaspar

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^ª. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. Marcio Nele de Souza, D.Sc.

Dr^ª. Ariane Leites Larentis, D.Sc.

Prof^ª. Suely Pereira Freitas, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2015

Gaspar, Rayane Brandão

Avaliação da estabilidade de emulsões para bebidas/
Rayane Brandão Gaspar. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE,
2015.

XIV, 97 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Marcio Nele de Souza

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Química, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 92-96.

1. Estabilidade. 2. Emulsões concentradas.
3. Encapsulamento. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.* II.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa
de Engenharia Química. III. Título.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me fortalecer e guiar durante toda a jornada.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e por estarem sempre presentes em minha trajetória me motivando e fornecendo todo o suporte que precisei para realizar meus sonhos sem nunca questioná-los.

À minha irmã, por ser sempre minha melhor amiga e a melhor irmã que eu poderia ter, que sempre me apoia em tudo, me ajuda a resolver todo e qualquer problema, e que sempre tem tempo para me escutar, seja nos momentos mais difíceis ou nos mais alegres.

Aos meus orientadores pela generosidade, paciência e disponibilidade em ajudar em todos os períodos de dificuldades e dúvidas, principalmente por me auxiliarem a chegar tão longe.

A todos meus amigos que graças à presença e companhia em todos os momentos foram elementos essenciais para tornar a caminhada mais leve e divertida muitas das vezes.

À amiga Dani que sempre esteve presente, desde a graduação, me ajudando nos momentos mais difíceis ou simplesmente rindo nos mais hilários.

À amiga Raquel que foi fundamental durante o mestrado. Sempre me ajudando com as disciplinas e sempre proporcionando ótimas conversas juntamente com a Dani.

À amiga Betinha que mesmo de longe sempre me motivou e me ouviu nos momentos em que mais precisei.

Aos colegas do Laboratório de Fenômenos Interfaciais e do LADEQ pela disponibilidade de tempo, auxiliando-me sempre que precisei.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

AValiação DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES PARA BEBIDAS

Rayane Brandão Gaspar

Março/2015

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Marcio Nele de Souza

Programa: Engenharia Química

O estudo de estabilidade de emulsões (o/a) para bebidas visa à sua predição para que seja garantida a qualidade do produto final. Este trabalho tem como objetivo o estudo de diversas formulações de emulsões usando um agente emulsionante natural, proteína isolada do soro do leite (*whey protein*). Pretende-se também realizar o encapsulamento de nutrientes (β -caroteno e vitamina E), relacionando as propriedades físico-químicas com a estabilidade destas emulsões. Foram realizadas análises de tensão superficial, formação de filmes em balança de Langmuir, potencial zeta, tamanho de gota e análise de turbidez das emulsões. Foi elaborado um planejamento experimental completo do tipo 2^3+3 pontos centrais, no qual foram variadas a razão óleo de laranja/água (30% a 60%), a concentração de goma arábica e de *whey protein* (1% a 15%), e a concentração de surfatante DSS (0mg/L a 100mg/L). Emulsões estáveis por, no mínimo 15 dias, foram obtidas quando foram utilizadas os dois agentes emulsionantes distintos. No entanto, as emulsões que continham goma arábica apresentaram estabilidade inferior àquelas com *whey protein*, sugerindo que aquele estabilizante pode estar sujeito à degradação. Outro ponto importante foi a observação que a presença de tensoativo não representa uma melhora da estabilidade, podendo seu uso ser dispensável. Para o encapsulamento dos nutrientes foi constatado que as emulsões mantêm-se estáveis assim como os nutrientes encapsulados.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

EVALUATION OF THE STABILITY OF EMULSIONS FOR BEVERAGES
APPLICATIONS

Rayane Brandão Gaspar

March/2015

Advisors: Helen Conceição Ferraz
Marcio Nele de Souza

Department: Chemical Engineering

The study of emulsions stability for beverage applications intend it prediction, thus the final quality is guaranteed. The aim of this study was to evaluate various emulsions formulation using a natural emulsifying agent, whey protein, the encapsulation of nutrientes such as β -carotene e vitamin E, and to relate their physicochemical properties with its stability. Analyses of surface tension, film formation in Langmuir trough, zeta potential, particle size and turbidity were carried out. A 2^3 factorial design was carried out, varying the ratio of orange oil/water (30% to 60%) and the concentration of whey protein (1% to 15%), arabic gum (1% to 15%) and surfactant DSS (0mg/L to 100mg/L). Emulsions with stability superior to 15 days, were obtained with both emulsifying agents. However, the emulsions with arabic gum showed lower stability. This suggest that the arabic gum may suffer degradation. Another important point was the fact that the surfactant did not improve the stability of the emulsions. To evaluate the encapsulation of nutrients, it was choosed those experiments that presented the greatestst stabilities. It was observerd, then, that the emulsion stability was preserved and also the nutrient stability.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. OBJETIVOS	3
CAPÍTULO II	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Emulsões	4
2.1.1. Classificação	6
2.1.2. Formação da emulsão	7
2.1.3. Mecanismos para a formação da emulsão.....	9
2.1.4. Principais agentes emulsionantes utilizados em emulsões para bebidas.....	12
2.1.5. Fatores que afetam a estabilidade	14
2.1.6. Mecanismos de desestabilização	16
2.1.7. Encapsulamento de nutrientes.....	19
2.2. Caracterização de emulsões.....	21
2.2.1. Potencial zeta	21
2.2.2. Tensão superficial	22
2.2.3. Tamanho de gota	24
2.2.4. Turbidez	25
2.2.5. Balança de Langmuir	27
CAPÍTULO III	31

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	31
3.1. Planejamento de experimentos	31
3.2. Preparo das emulsões.....	33
3.2.1. Preparo das fases aquosas	33
3.2.2. Preparo da fase oleosa	33
3.2.3. Formação da emulsão	34
3.3. Caracterização das emulsões	34
3.3.1. Balança de Langmuir	34
3.3.2. Índice de emulsificação	36
3.3.3. Tensão superficial.....	37
3.3.4. Tamanho de gota	37
3.3.5. Potencial zeta	38
3.3.6. Análise de estabilidade (Turbiscan)	38
3.3.7. Quantificação da quantidade encapsulada	39
CAPÍTULO IV	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Caracterização dos emulsionantes	41
4.1.1. Concentração micelar crítica do dioctil sulfosuccinato de sódio.....	41
4.1.2. Balança de Langmuir	42
4.2. Planejamento de experimentos	45
4.2.1. Planejamento de experimentos com a goma arábica como estabilizante...	46
4.2.2. Planejamento de experimentos com WPI como estabilizante	66
4.3. Encapsulamento de nutrientes	86
4.3.1. Estabilidade	86

4.3.2. Quantidade encapsulada	88
CAPÍTULO V.....	89
5. CONCLUSÕES.....	89
CAPÍTULO VI.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXO I.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos tipos de emulsões.....	6
Figura 2. Representação dos processos que ocorrem durante a ruptura de gota.....	10
Figura 3. Método de inversão de fase pela temperatura.....	10
Figura 4. Emulsificação espontânea.....	11
Figura 5. Estrutura da goma arábica.....	13
Figura 6. Representação dos mecanismos de desestabilização de emulsões.....	17
Figura 7. Ilustração das forças de atração entre as moléculas na superfície e no interior de um líquido.....	23
Figura 8. Esquema de análise do Turbiscan.....	26
Figura 9. Monocamada de Langmuir.....	27
Figura 10. Exemplo de isoterma de compressão de um fosfolipídio.....	29
Figura 11. Orientação das moléculas durante as diferentes fases.....	30
Figura 12. Balança de Langmuir com placa de Wilhelmy e as barreiras.....	36
Figura 13. Gráfico de Tensão Superficial x Concentração de DSS.....	42
Figura 14. Isoterma de Compressão da goma arábica.....	44
Figura 15. Isotermas de Compressão para o WPI e DSS.....	45
Figura 16. Valores preditos x valores observados para a resposta estabilidade. – Planejamento Goma	48
Figura 17. Valores preditos x valores observados para a resposta tensão superficial. – Planejamento Goma.....	51
Figura 18. Valores preditos x valores observados para a resposta potencial zeta. – Planejamento Goma	54
Figura 19. Microscopia ótica das emulsões referentes aos pontos centrais.....	55

Figura 20. Microscopia ótica das emulsões mais instáveis.....	56
Figura 21. Microscopia ótica das emulsões mais estáveis.....	57
Figura 22. Valores preditos x valores observados para a resposta tamanho de partícula. – Planejamento Goma.....	60
Figura 23. Análise pelo Turbiscan para os experimentos 4,7 e 8.....	61
Figura 24. Análise pelo Turbiscan para os experimentos 1 e 2.....	62
Figura 25. Experimento 1 e experimento 2 após 24 horas.....	63
Figura 26. Análise pelo Turbiscan para os experimentos 3,5 e 6.....	64
Figura 27. Análise pelo Turbiscan para os experimentos centrais.....	65
Figura 28. Valores preditos x valores observados para a resposta estabilidade. – Planejamento WPI.....	68
Figura 29. Valores preditos x valores observados para a resposta tensão superficial. – Planejamento WPI.....	71
Figura 30. Valores preditos x valores observados para a resposta potencial zeta. – Planejamento WPI.....	74
Figura 31. Imagens do tamanho de gota para os pontos centrais.....	75
Figura 32. Microscopia ótica das emulsões mais instáveis.....	75
Figura 33. Microscopia ótica das emulsões mais estáveis.....	76
Figura 34. Valores preditos x valores observados para a resposta tamanho de gota. – Planejamento WPI.....	79
Figura 35. Análise pelo Turbiscan para o experimento 1.....	80
Figura 36. Emulsão 1 após 24 horas.....	81
Figura 37. Análise pelo Turbiscan para os experimentos 2,3,4,6,7 e 8.....	83
Figura 38. Análise pelo Turbiscan para o experimento 5.....	84
Figura 39. Análise pelo Turbiscan para os experimentos de ponto central.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de coloides.....	4
Tabela 2. Aplicações de emulsões.....	5
Tabela 3. Tipos de Emulsão.....	7
Tabela 4. Nutriente encapsulados em emulsão.....	20
Tabela 5. Níveis dos planejamentos de experimentos.....	32
Tabela 6. Resultados do planejamento de experimentos com a goma arábica como estabilizante.....	46
Tabela 7. Efeito das variáveis sobre a estabilidade das emulsões.....	46
Tabela 8. Resultado da análise da tensão superficial das emulsões.....	49
Tabela 9. Efeito das variáveis sobre a tensão superficial das emulsões.....	50
Tabela 10. Resultado da análise do potencial zeta das emulsões.....	52
Tabela 11. Efeito das variáveis sobre o potencial zeta das emulsões.....	53
Tabela 12. Resultado da análise do tamanho de gota das emulsões.	58
Tabela 13. Efeito das variáveis sobre o tamanho de gota.....	59
Tabela 14. Resultados do planejamento de experimentos com o WPI como estabilizante.....	66
Tabela 15. Efeito das variáveis sobre a estabilidade das emulsões.....	67
Tabela 16. Resultado da análise da tensão superficial das emulsões.....	69
Tabela 17. Efeito das variáveis sobre a tensão superficial das emulsões.....	70
Tabela 18. Resultado da análise do potencial zeta das emulsões.....	72
Tabela 19. Efeito das variáveis sobre o potencial zeta das emulsões.....	73
Tabela 20. Resultado da análise do tamanho de gota das emulsões.....	77
Tabela 21. Efeito das variáveis sobre o tamanho de gota.....	78

Tabela 22. Resposta do encapsulamento do β -caroteno.....	87
Tabela 23. Resposta do encapsulamento do α -tocoferol.....	87
Tabela 24. Quantidade de nutriente encapsulado.....	88

Capítulo I

Introdução

1.1. Introdução

Durante os últimos anos, a participação das bebidas não alcoólicas no segmento de bebidas em geral tem aumentado consideravelmente. Dessas bebidas, as prontas para consumo apresentaram um crescimento de aproximadamente 5,1 % em litros entre os anos de 2009 e 2010 (ABIR, 2011). O setor de alimentos e bebidas é o segundo maior do Brasil em valor bruto de produção da indústria de transformação. Em 2011, o faturamento das empresas do setor somou R\$ 383,3 bilhões, sendo R\$ 316,5 bilhões em alimentos e R\$ 66,8 bilhões em bebidas. A participação da indústria de alimentos e bebidas no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro é de 9% (ABIR, 2011). Esse crescimento do mercado impulsiona a formulação de novos produtos para acompanhar as necessidades dos consumidores, as tendências e a demanda mundial de bebidas com nutrientes específicos.

As bebidas, em sua maioria, geralmente são encontradas sob a forma de emulsões do tipo óleo em água. Dentre os principais fatores que afetam a qualidade do produto final, a estabilidade da emulsão é certamente a mais importante. A instabilidade das emulsões decorre de mecanismos físico-químicos como sedimentação, flotação, floculação e coalescência.

O entendimento das propriedades físico-químicas e dos fenômenos de superfície presentes nas emulsões são essenciais para a qualidade final do produto. Essa qualidade também é representada pelas propriedades nutricionais.

Neste contexto o uso de agentes emulsionantes naturais substituindo os sintéticos tem sido estudado. Na indústria alimentícia, tem-se obtido sucesso no uso de polímeros naturais como proteínas e polissacarídeos como emulsionantes ou estabilizantes para a formulação de emulsões estáveis (BOUYER, 2012).

O uso de proteínas como estabilizantes, além de conferir estabilidade às emulsões, confere também um valor nutritivo agregado. Este valor nutritivo pode ser elevado a partir do encapsulamento de nutrientes.

A adição de ingredientes bioativos a bebidas apresenta muitas alterações, particularmente com respeito à estabilidade dos componentes bioativos durante o processamento e armazenamento, sendo necessário prevenir interações indesejáveis com a matriz. A obtenção de benefícios para a saúde também requer ações para garantir a estabilidade dos componentes (MUSCHIOLIK, 2007).

A adição de ingredientes bioativos não deve afetar de forma negativa as propriedades sensoriais, como cor ou sabor dos alimentos. O tamanho de partículas afeta a textura, sendo que a adição de partículas grandes é indesejável em muitos casos.

A encapsulação permite a estabilização dos compostos com potencial bioativo (vitaminas, aromas, acidulantes, enzimas) durante o armazenamento e permite liberação quando necessária (na produção ou consumo) (MUSCHIOLIK, 2007).

Para a formulação de emulsões com nutrientes encapsulados 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).

Este trabalho dá continuidade à linha de pesquisa sobre estabilidade de emulsões no Laboratório de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT) do Programa de Engenharia Química. Almeida (2012) avaliou o uso dos estabilizantes goma arábica, amido e amido modificado. Nesta pesquisa, selecionou-se outro estabilizante natural, obtido da indústria de laticínios, para avaliar sua capacidade em estabilizar emulsões concentradas para indústria de bebidas.

1.2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo avaliar a estabilidade de emulsões do tipo o/a (óleo em água), para o preparo de bebidas, através do monitoramento de suas propriedades físico-químicas empregando técnicas de planejamento experimental.

Como objetivos específicos deste trabalho são propostos:

- ✓ Avaliar o uso da proteína do soro de leite (*whey protein*), um estabilizante natural;
- ✓ Avaliar o encapsulamento de nutrientes e sua estabilidade química;
- ✓ Avaliar a estabilidade destas emulsões e correlacionar com suas propriedades físico-químicas.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

2.1. Emulsões

Coloides são misturas heterogêneas de pelo menos duas fases diferentes, com a matéria de uma das fases na forma finamente dividida (sólido, líquido ou gás), denominada fase dispersa, misturada com a fase contínua (sólido, líquido ou gás), denominada meio de dispersão. A ciência dos coloides está relacionada com o estudo dos sistemas nos quais pelo menos um dos componentes da mistura apresenta uma dimensão no intervalo de 1 a 1000 nanômetros. A Tabela 1 apresenta os diferentes tipos de coloides de acordo com as fases dispersa e de dispersão (ou contínua).

Tabela 1. Classificação de coloides.

Colóide	Fase dispersa	Fase de dispersão	Exemplo
Aerossol líquido	Líquido	Gás	Neblina, desodorante
Aerossol sólido	Sólido	Gás	Fumaça, poeira
Espuma	Gás	Líquido	Espuma de sabão e de combate a incêndio
Espuma sólida	Gás	Sólido	Isopor®, poliuretana
Emulsão	Líquido	Líquido	Leite, maionese, manteiga
Emulsão sólida	Líquido	Sólido	Margarina, opala, pérola
Sol	Sólido	Líquido	Tinta, pasta de dente
Sol sólido	Sólido	Sólido	Vidro e plástico pigmentado

As emulsões são, então, sistemas dispersos que geralmente são formados por duas fases líquidas imiscíveis, uma aquosa e outra oleosa. Nestes sistemas a fase dispersa encontra-se finamente dividida e distribuída na fase contínua. Com isso, se a fase dispersa corresponde à fase oleosa, diz-se que a emulsão é do tipo óleo em água (o/a), já o contrário

é dito que é uma emulsão de água em óleo (a/o). Outros tipos de emulsões também são frequentes que são as emulsões múltiplas, podendo elas serem do tipo a/o/a ou o/a/o.

Por se tratar de dois líquidos imiscíveis, ou seja, com características físico-químicas distintas, para que haja a formação de uma emulsão é necessário a presença de um agente emulsionante, que pode ser um tensoativo. Já para conferir estabilidade às emulsões, outro aspecto importante para sua formulação, utiliza-se da adição de estabilizantes.

Para aplicação em bebidas, as mais comuns são as de óleo dispersas em água. Estas emulsões devem ser estáveis em todas as possíveis formas de serem encontradas, sejam elas concentradas, diluídas, carbonatadas etc. Para tal deve-se impedir que ocorra a separação de fases, que é considerado o caminho termodinâmico favorável.

As emulsões desempenham papéis importantes em outras áreas que não a de bebidas. Atualmente existem diversos exemplos de diferentes aplicações industriais de emulsões. Na Tabela 2 são mostrados alguns exemplos.

Tabela 2. Aplicações de emulsões (Adaptado de TADROS, 2009).

Aplicações industriais para emulsões	
Indústria de alimentos	Maionese bebidas
Indústria de cosméticos	Cremses, protetor solar
Agroindústria	Óleos auto-emulsionantes
Farmacêuticos	Emulsões lipídicas
Tintas	Emulsões de látex, resinas alquídicas
Indústria de óleo	Remoção de água em emulsões a/o

2.1.1. Classificação

De forma geral as emulsões podem ser classificadas em simples ou múltiplas e quanto ao tamanho de gota que é formada, como mostra a Figura 1. As emulsões simples podem ser do tipo óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o). Já as emulsões múltiplas são sistemas mais complexos, nos quais os mais simples seriam as emulsões duplas de óleo-em-água-em-óleo (o/a/o) ou os água-em-óleo-em-água (a/o/a) (BOUYER, 2012).

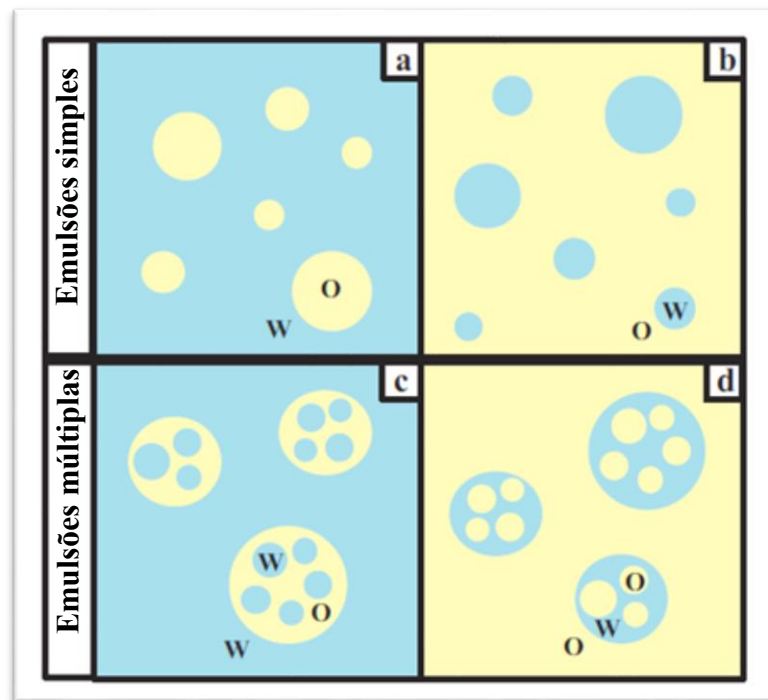


Figura 1. Representação dos tipos de emulsões. (Adaptado de BOUYER, 2012)

Já quanto ao tamanho de gota, as emulsões podem ser macro, micro ou nanoemulsões, conforme resumido na Tabela 3.

Tabela 3. Tipos de Emulsão.

Tipos de Emulsão			
	Tamanho de gota	Característica	Estabilidade
Macroemulsão	> 100nm	Opaca, turva	Termodinamicamente instável
Microemulsão	<100nm	Transparente ou levemente turva	Termodinamicamente estável *
Nanoemulsão	<100nm	Transparente ou levemente turva	Termodinamicamente instável

*Considerada estável em condições específicas de temperatura e composição.

2.1.2. Formação da emulsão.

Para a formação de emulsões é necessário que ocorra a quebra da fase dispersa em partículas menores, para que deste modo esta fique distribuída pela fase contínua. Esta distribuição faz com que a área interfacial aumente consideravelmente. O trabalho mínimo necessário para aumentar a área interfacial é dado pela equação 1.

$$W = \gamma_i \times \Delta A \quad (1)$$

Em que:

γ_i é a tensão interfacial entre as duas fases líquidas e

ΔA é a mudança de área interfacial.

A diferença de energia livre para a formação da emulsão é dada pela equação 2.

$$\Delta G^{\text{form}} = \gamma_i \Delta A - T \Delta S \quad (2)$$

Em que:

γ_i é a tensão interfacial entre as duas fases líquidas;

ΔA é a mudança de área interfacial;

T é a temperatura do sistema e

ΔS é a variação de entropia do sistema.

Sabendo que a tensão interfacial entre dois líquidos sempre é maior que zero e que com a formação de gotas a área final sempre irá aumentar, tem-se que o primeiro termo da equação 2 sempre será positivo. Apesar de haver um aumento na entropia do sistema após a emulsificação, o aumento na área é muito superior a este. Com isso, a formação de uma emulsão é um processo termodinamicamente instável e não espontâneo, pois a energia livre de Gibbs de formação é positiva.

A presença de um agente emulsionante é capaz de basicamente estabilizar esta emulsão formada, através de sua adsorção na interface líquido-líquido. Isto gera, então, uma redução na tensão interfacial entre as fases. A redução da tensão interfacial reduz a quantidade de trabalho necessário para a formação da emulsão, como pode ser observado pela equação 1.

O agente emulsionante também é capaz de diminuir a taxa de coalescência da fase dispersa, pois ele forma um filme entre essas fases, sendo formada, assim, uma espécie de barreira estérica, elétrica e/ou mecânica. A barreira mecânica aumenta a resistência a choques entre as gotas dispersas, prevenindo-as de coalescerem. Já as barreiras estéricas e elétricas inibem a aproximação das gotas, devido a impedimentos estéricos ou forças repulsivas eletrostáticas (ROSEN,2004).

2.1.3. Mecanismos para a formação de emulsão.

Apesar do agente emulsionante ser capaz de reduzir a energia para a formação da emulsão, ainda assim seu preparo requer certa energia para que haja a expansão da interface entre as fases.

Existem três mecanismos principais para a formação de uma emulsão. São eles: emulsificação por ruptura de gota, emulsificação por inversão de fase e emulsificação espontânea.

O método de ruptura de gota é um método físico que depende da natureza mecânica do processo, assim como das propriedades físico-químicas dos componentes. A indústria de bebidas utiliza este método, uma vez que este pode ser utilizado com diferentes tipos de óleos e emulsionantes (McCLEMENTS, 2013).

A Figura 2 ilustra os vários processos que ocorrem durante a emulsificação por ruptura de gota. São eles: quebra da gota, adsorção do emulsionante e colisão entre gotas, que pode levar ou não à coalescência.

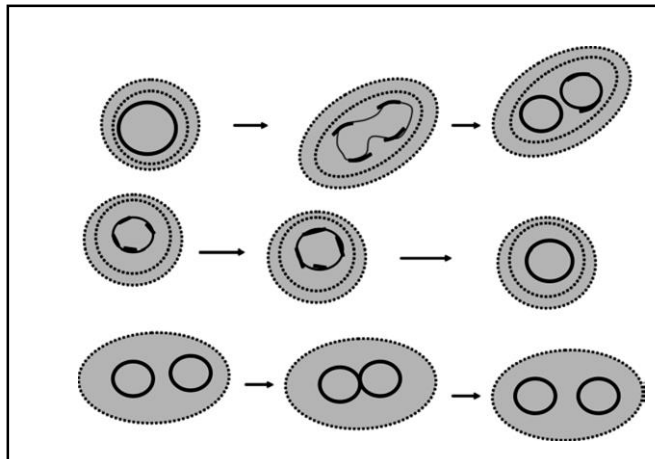


Figura 2. Representação dos processos que ocorrem durante a ruptura de gota. (TADROS, 2009)

Alguns métodos foram desenvolvidos com o intuito de formar emulsões com tamanhos de gotas reduzidos. Entre estes métodos, destaca-se o de inversão de fase. Neste método ocorre a inversão de uma emulsão a/o para uma o/a, como pode ser observado na Figura 3 (FERNANDEZ *et al.*, 2004; THAKUR, VILLETTE, AUBRY, & DELAPLACE, 2008).

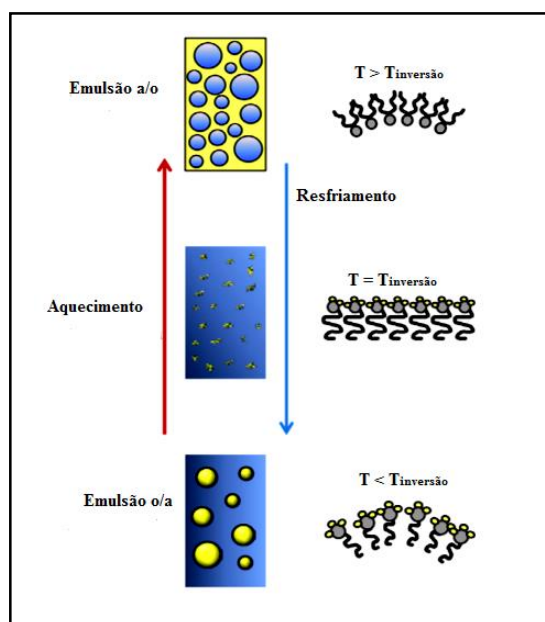


Figura 3. Método de inversão de fase pela temperatura. (Adaptado de McCLEMENTS, 2013)

No método de emulsificação por inversão de fase pela temperatura, a transição ocorrerá em função da força iônica, do pH, da temperatura e do surfactante. Uma desvantagem para este método é que as emulsões tendem a coalescer se forem estocadas a uma temperatura próxima àquela da inversão de fase.

No método de emulsificação espontânea a emulsão é formada misturando-se a fase orgânica e a fase aquosa (ANTON & VANDAMME, 2009; MILLER, 1988; POUTON & PORTER, 2006). A fase orgânica geralmente contém o óleo e o surfactante. A mistura pode ocorrer de diversas formas, seja adição por titulação da fase aquosa à orgânica ou o contrário (Figura 4). O tamanho de gota formado pode ser controlado variando a composição das duas fases e as condições de agitação. (SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2009).

Este método é bastante aconselhável para o preparo dos principais tipos de emulsões que são utilizadas no mercado de bebidas; as “*cloud emulsions*” que conferem turbidez às bebidas e as emulsões flavorizadas que conferem sabor. A principal desvantagem deste método é a necessidade de altas concentrações de tensoativos. (McCLEMENTS, 2013)

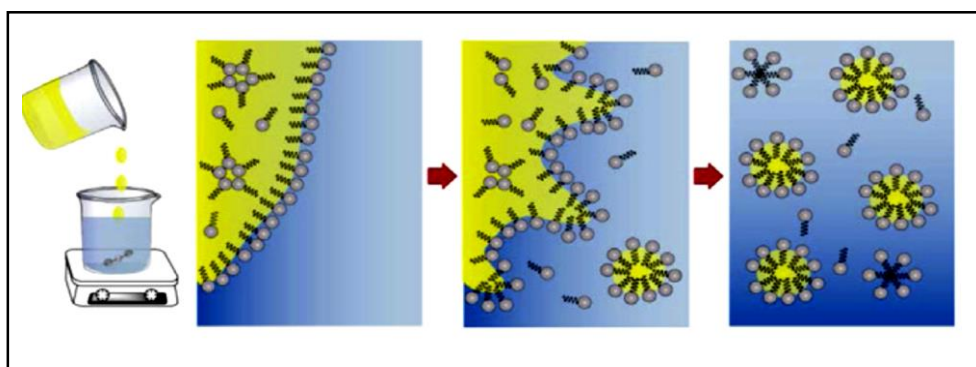


Figura 4. Emulsificação espontânea (McCLEMENTS,2013).

2.1.4. Principais agentes emulsionantes utilizados em emulsões para bebidas.

Os principais agentes emulsionantes para bebidas podem ser divididos em três grupos:

- Polímeros naturais
 - Goma arábica, goma xantana, amido etc.
- Polímeros Sintéticos
 - Amido modificado, polietilenoglicol etc.
- Misturas
 - Proteína isolada do soro de leite.

As emulsões para bebidas, geralmente, são estabilizadas por polissacarídeos anfifílicos como a goma arábica ou amidos modificados.

A goma arábica é uma resina natural composta por polissacarídeos e glicoproteínas que é extraída de duas espécies de acácia. É frequentemente usada como espessante e estabilizante para vários alimentos. Sua estrutura apresenta três frações de biopolímeros de alta massa molar (ANDERSON *et al* 1985; PHILLIPS & WILLIAMS, 1995; JAYME *et al*, 1999) (Figura 5). Ela é considerada um emulsionante eficiente pois possui alta solubilidade e baixa viscosidade em água, e é capaz de formar um filme ao redor das gotas da emulsão (GLICKSMAN, 1983).

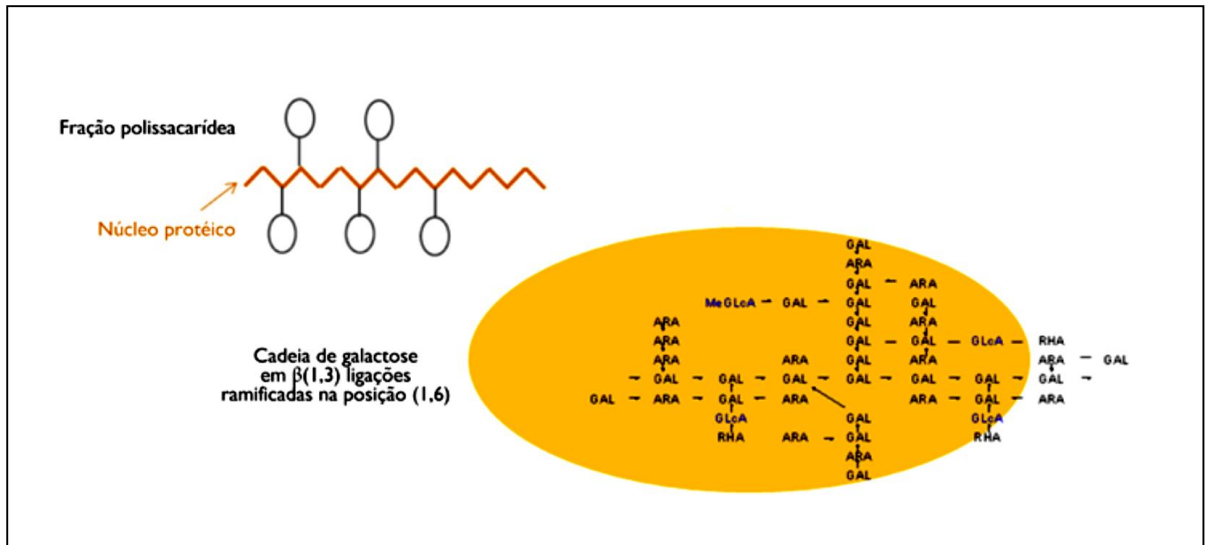


Figura 5. Estrutura da goma arábica (Adaptado de Fincher, 1983)

O uso da goma arábica como estabilizante já foi bastante estudado em diferentes condições de processamento. Como exemplo tem-se que a goma arábica é capaz de estabilizar emulsões flocoadas, quando estas apresentam diferentes pHs, força iônica e temperatura de armazenamento. No entanto, devido a uma baixa afinidade na interface água-óleo, são necessárias concentrações elevadas para formar emulsões estáveis. (TSE, 1995; McCLEMENTS, 2002; CHAROEN, 2011)

As proteínas são capazes de adsorver na superfície da interface reduzindo, assim, a tensão interfacial. As proteínas podem ser utilizadas em concentrações menores, quando comparadas com os polissacarídeos anfífilos. Por outro lado, as proteínas são mais suscetíveis a variações no pH, força iônica, temperatura, prejudicando, então, a estabilidade da emulsão (CHANAMAI, 2002; NORDE, 2003).

A proteína isolada do soro do leite (WPI) é constituída principalmente pela β -lactoalbumina, podendo ainda conter as proteínas α -lactoalbumina e lactoglobulina. A

massa molar do WPI é aproximadamente igual a 18 kDa e seu ponto isoelétrico é em torno de 5 (BLISJENSTEIN *et al*, 2013). Com isso, em torno deste pH as gotas da emulsão tendem a flocular. Porém, em pHs mais elevados ou baixos, torna-se mais difícil a aproximação das gotas devido a repulsões eletrostáticas. Já em temperaturas acima de 70°C ocorre a desnaturação do WPI, acarretando assim, a agregação de gotas (KIM *et al*, 2002).

O uso da proteína isolada do soro de leite tem sido bastante estudado. O *whey protein* é capaz de aumentar a estabilidade da emulsão devido a interações eletrostáticas (TAHERIAN *et al*, 2011). Em outro estudo também foi possível observar um aumento da estabilidade química das emulsões, quando este é adicionado (TRENTIN *et al*, 2011). O aumento da estabilidade de emulsões que contêm *whey protein* são resultantes de mudanças em suas propriedades físico-químicas. A adição de WPI pode resultar em um aumento de viscosidade dificultando assim que ocorra o processo de floculação (SOLEIMANPOUR *et al*, 2013).

2.1.5. Fatores que afetam a estabilidade.

De maneira geral, as forças atrativas de Van der Waals e as interações repulsivas entre as gotas irão influenciar na estabilidade de uma emulsão. Esta estabilidade geralmente está relacionada a resistência à coalescência das gotas dispersas. Isso é dependente da natureza física do filme interfacial, da existência de barreira elétrica ou estérica, da viscosidade da fase contínua, da distribuição do tamanho de gota, da temperatura, do volume de fase dispersa e da diferença de densidade entre as fases. (ROSEN,2004)

As gotas de uma emulsão colidem a todo momento, devido ao frequente movimento destas. O filme interfacial deve ser resistente a esses choques, para que este não se rompa e acarrete na coalescência das gotas. O filme deve ter natureza física elástica para conseguir acompanhar as deformações das gotas.

A presença de gotas carregadas na emulsão dificulta a aproximação destas, evitando a coalescência e a floculação, devido a formação de uma barreira elétrica

A viscosidade da fase contínua irá influenciar diretamente na frequência de colisão. Quando a fase contínua possui elevada viscosidade, o coeficiente de difusão das gotas fica reduzido, dificultando assim o movimento das gotas. A viscosidade da fase contínua aumenta com o aumento da concentração de partículas suspensas.

Em relação a distribuição de tamanho de gota tem-se que quanto mais uniforme for esta distribuição, mais estável será a emulsão. As gotas maiores possuem área interfacial menor, são, então mais estáveis e tendem a crescer mais que as menores.

A frequência de colisão também depende do volume da fase dispersa. Por exemplo, com o aumento da concentração de óleo mais gotas serão formadas, aumentando a probabilidade de choque entre as gotas, favorecendo assim a coalescência destas.

A diferença de densidade entre as fases também é um fator importante. Se essa diferença for muito significativa, pode ocorrer a separação de fases da emulsão. Para contornar este problema, faz-se uso de compostos que são conhecidos como agentes de peso que quando adicionados a uma das fases tem a função de deixar as densidades das duas fases mais próximas.

2.1.6. Mecanismos de desestabilização.

As emulsões para alimentos podem tornar-se instáveis devido a diversos mecanismos físico-químicos. Geralmente, o termo “estabilidade da emulsão” se refere à capacidade de uma emulsão resistir a mudanças nas suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo. Torna-se, então, importante conseguir identificar qual o mecanismo físico ou químico dominante responsável pela instabilidade de uma emulsão, pois esse conhecimento poderá ajudar a determinar uma estratégia efetiva para melhorar a sua estabilidade. (McCLEMENTS,1999; DICKINSON, 1992)

Dentre os mecanismos físicos podem ser citados os seguintes: os processos de separação devido à ação da gravidade, flotação/sedimentação, floculação, coalescência, amadurecimento de Ostwald e inversão de fase. (Figura 6)

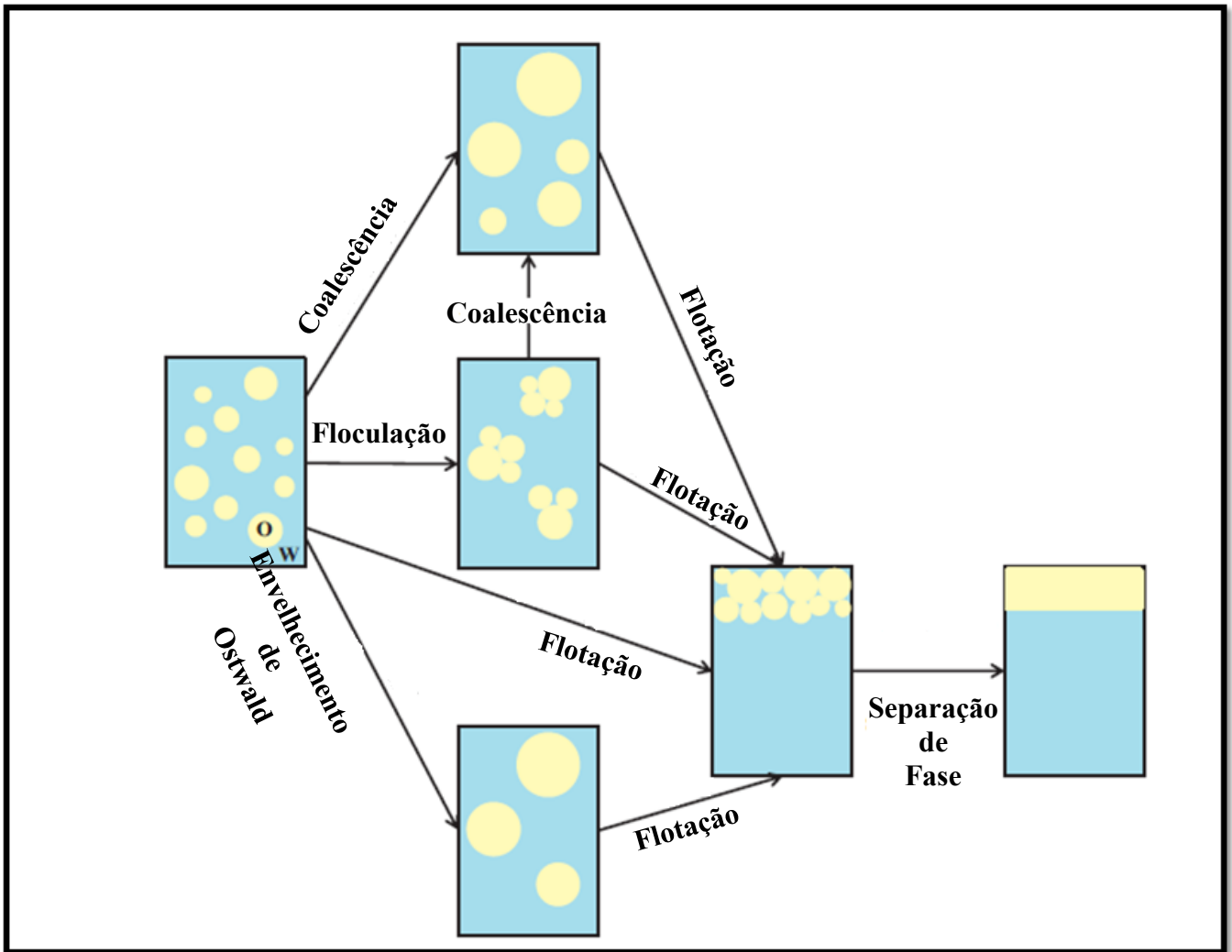


Figura 6. Representação dos mecanismos de destabilização de emulsões

(adaptado de BOUYER, 2012).

Esses mecanismos de destabilização estão correlacionados com as propriedades físico-química dos componentes de uma emulsão e da emulsão final. Por exemplo, um aumento no tamanho de gota aumenta a probabilidade de flocular, coalescer etc. Esses processos muitas vezes ocorrem consecutivamente ou até mesmo simultaneamente (TADROS, 2004).

No caso de emulsões óleo/água, a flotação/sedimentação devido à ação da gravidade vai ocorrer quando a densidade do óleo for menor/maior do que a densidade da água. Na maioria dos casos, o óleo possuirá uma densidade menor do que a da água, podendo resultar na flotação (TADROS, 2004). Porém, esta pode ser prevenida com a adição de agentes de peso que aumentarão a densidade do óleo, igualando as duas densidades e evitando esses mecanismos de desestabilização por ação da gravidade.

A separação gravitacional ocorre sem a perda da identidade individual da gota. Ela ocorre, com o tempo, em quase todos os sistemas de emulsão onde há uma diferença na densidade das duas fases. A taxa de flotação/sedimentação depende das características físicas do sistema, especialmente da viscosidade da fase contínua. Esse processo não representa necessariamente uma mudança no estado disperso do sistema e pode, em muitos casos, ser revertido com o fornecimento de pouca energia (MYERS, 1999).

O mecanismo de floculação é caracterizado pela aproximação das gotas, com formação de agregados, porém sem a perda de identidade, ou seja, há a manutenção do filme interfacial e da individualidade das gotas. Na floculação, as gotas ficam próximas umas das outras por muito tempo, porém, as forças atrativas não são suficientemente significativas para que elas coalesçam formando uma única gota (AUFLEM, 2002).

A floculação antecede a coalescência e a ruptura do sistema. A floculação pode ser em vários casos um processo reversível, que pode ser revertido com o fornecimento de muito menos energia do que a requerida no processo original de emulsificação (MYERS, 1999).

No mecanismo de coalescência ocorre a formação de uma única gota maior a partir de duas ou mais gotas. Neste processo há a redução da área interfacial total e a ruptura do filme interfacial entre as gotas. Embora a coalescência resulte de mudanças microscópicas

significativas na condição da fase dispersa (ex: mudanças no tamanho médio de partícula e distribuição), ela pode não resultar imediatamente numa alteração macroscópica aparente do sistema.

A separação de fases, por outro lado, é macroscopicamente aparente, e é uma consequência do processo microscópico de coalescência da gota. Nesse evento, a identidade individual da gota é perdida, assim como as propriedades físicas e químicas da emulsão (MYERS, 1999).

O envelhecimento de Ostwald é resultado do fato que as fases não são totalmente imiscíveis. Com isso, as gotas menores possuirão solubilidade maior quando comparadas com as gotas maiores. As gotas menores tenderão a desaparecer e a se depositar em gotas maiores, ocorrendo, então, o crescimento de gotas maiores em detrimento das menores (TADROS,2004).

2.1.7. Encapsulamento de nutrientes.

Devido a suas características estruturais, as emulsões possuem alto potencial para aplicação em alimentos, como: liberação controlada de aromas e sabores, modulação de aromas e sabores indesejáveis, liberação controlada de componentes encapsulados, e proteção dessas substâncias da oxidação e da ação de certas enzimas durante o processo de fabricação e armazenamento (BENICHOU et al., 2004; MUSCHIOLIK, 2007; MCCLEMENTS et al., 2007; DICKINSON, 2011; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013; JIMÉNEZCOLMENERO, 2013).

Para a aplicação no encapsulamento de nutrientes, faz-se necessária, então, a formação de um sistema o mais estável possível para que o encapsulado fique protegido

pela fase contínua (MUSCHIOLIK, 2007).

Uma variedade de sistemas coloidais tem sido empregada no encapsulamento de nutrientes, 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). A tabela 4 abaixo apresenta alguns nutrientes que já foram estudados seu encapsulamento em emulsões.

Tabela 4. Nutriente encapsulados em emulsão.

Nutriente	Concentração	Autor
Vitamina E	10-50%	HATANAKA et al, 2010
D-Limoneno	5%	DONSI et al, 2011
β - Caroteno	0,30%	LIANG et al, 2013
Resveratrol	0,01%	SESSA et al, 2011
Licopeno	10%	ROCHA et al,2012
β - Caroteno	15%	YUAN et al, 2007

Neste contexto, a proteína do soro do leite tem sido utilizada como estabilizante em emulsões com encapsulamento de nutrientes. Essa proteína, assim como as outras proteínas do leite, é um excelente agente encapsulante para compostos hidrofóbicos. As proteínas do leite também são capazes de interagir de forma covalente ou eletrostática com os nutrientes, e isso torna a emulsão mais estável (LIVNEY, 2010).

Ainda no que diz respeito a estabilidade de emulsões com nutrientes, Hatanaka *et al.*, em 2010, avaliaram o efeito da concentração de nutriente na estabilidade de emulsões

contendo vitamina E. Constatou-se que, quanto menor a quantidade de nutriente, mais estável é a emulsão, pois a tendência é que com o aumento da concentração, haja um aumento na agregação das gotas (HATANAKA et al, 2010).

Outro aspecto importante no encapsulamento de nutrientes é a acessibilidade deste. Em 2013, Liang *et al.* avaliaram a estabilidade de nanoemulsões contendo β -caroteno estabilizadas com amidos modificados. Foi observado que o aumento da massa molar do amido pode aumentar da gota formada, tornar a emulsão e o nutriente mais estáveis, porém reduz a bioacessibilidade deste, devido a impedimentos estéricos.(LIANG et al, 2010).

2.2.Caracterização de emulsões.

2.2.1. Potencial zeta

Sistemas contendo emulsão podem apresentar cargas elétricas devido à adsorção de moléculas ionizadas ou ionizáveis na superfície das gotas. As características elétricas da superfície das gotas dependem do tipo e concentração das espécies adsorvidas, assim como composição iônica e propriedades físicas da fase dispersa. Esta carga elétrica é importante, pois pode determinar a natureza de sua interação com outras espécies carregadas ou seu comportamento na presença de um campo elétrico.

As gotículas em muitas emulsões não conseguem agregar-se pois utiliza-se da adição de emulsificantes iônicos que adsorvem na superfície da gota, evitando a coalescência por repulsão eletrostática (DICKINSON, 1992; FRIBERG et al., 2004; MCCLEMENTS, 1999; MCCLEMENTS, 2007).

As propriedades elétricas de uma gota podem ser caracterizadas através do seu potencial zeta. Este potencial corresponde ao potencial elétrico no plano de cisalhamento. É dependente da superfície da partícula e da fase dispersa, podendo ser afetado pelo pH e força iônica do meio. A interação das gotas se dá pela magnitude do potencial zeta, portanto, para que haja a estabilidade de emulsões por repulsão eletrostática, as gotas devem ter potencial zeta superiores a 30 mV, em módulo (MIRHOSSEIN et al., 2007).

No caso de uso de proteínas como estabilizantes para emulsões, o potencial zeta representa uma ótima ferramenta de análise pois dependendo do pH em que se encontram, as proteínas possuem carga.

Kim et al, em 2002, estudou o uso da proteína isolada do soro do leite como estabilizante para emulsões. Foi observado que em pH 7 a proteína possuía carga negativa, o que aumentava a repulsão eletrostática das gotas

2.2.2. Tensão superficial.

A tensão superficial está relacionada à diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior. As moléculas em um líquido interagem umas com as outras e o grau desta atração vai depender das propriedades de cada substância. As interações de uma molécula no interior de um líquido são equilibradas por forças igualmente atrativas em todas as direções. Já as moléculas na superfície têm suas forças de atração formando uma resultante no sentido do interior do líquido.

Por conta desse desequilíbrio de forças, as moléculas na superfície estão em um estado energético maior do que as moléculas no interior do líquido. A maior quantidade possível de moléculas irá sair da superfície e ir para o interior do líquido, por isso a

superfície tende a contrair espontaneamente. A tensão superficial é, portanto, uma medida da energia de coesão presente numa interface (Figura 7) (SHAW, 1980; ADAMSON, 1976).

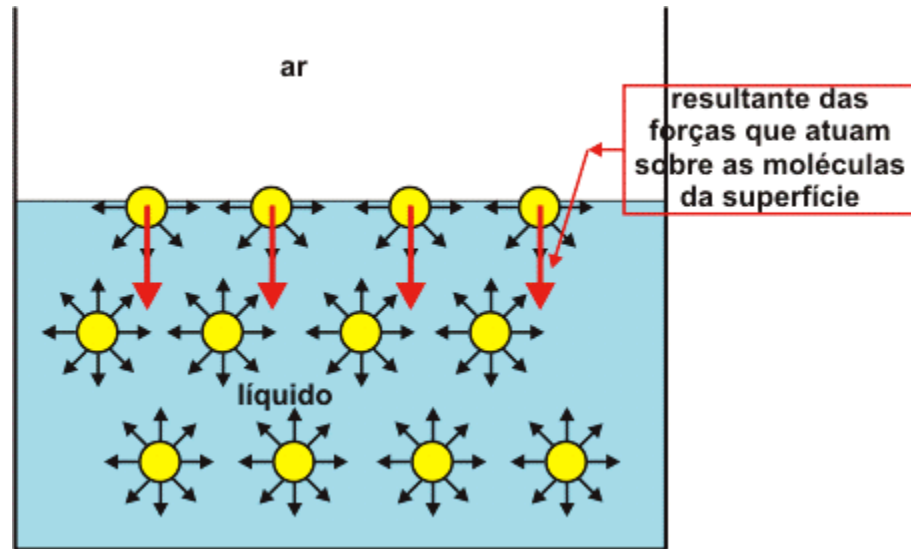


Figura 7. Ilustração das forças de atração entre as moléculas na superfície e no interior de um líquido (adaptado de SHAW, 1980).

A presença de um segundo componente pode tanto aumentar quanto diminuir a tensão superficial de uma fase aquosa. Por exemplo, moléculas orgânicas com caráter anfifílico têm tendência de se dispor na interface já que a dissolução das mesmas em água é desfavorável. Desta forma, espécies anfifílicas se acumulam na superfície, dando origem a um filme superficial diminuindo a tensão superficial da água.

2.2.3. Tamanho de gota.

O tamanho das gotas em uma emulsão provoca um forte impacto em sua estabilidade. Quando têm-se gotas de tamanho maior torna-se propício ocorrer flocculação, coalescência; já gotas muito pequenas, com o decorrer do tempo podem desaparecer dependendo de sua solubilidade na fase dispersa.

As propriedades óticas também têm relação com o tamanho de gota. Podendo a emulsão ser turva (macroemulsão) ou transparente (micro e nanoemulsões). Em produtos alimentícios, por exemplo, o diâmetro médio de uma gota encontra-se na faixa de 0,1 a 100 μm (McCLEMENTS, 2007).

Segundo Kokal, em 2002, a distribuição do tamanho de gotas exerce influência na viscosidade das emulsões. Quando as gotas são menores, as emulsões tendem a ser mais viscosas. De acordo com Becker, em 1997, o aumento da estabilidade pode ser atribuído às elevadas viscosidades encontradas em emulsões com tamanho de gotas pequenos.

Levando em conta a distribuição de tamanhos de gota podem-se relacionar os sistemas emulsionados como monodispersos (gotas que possuem o mesmo tamanho) ou polidispersos (gotas que apresentam um intervalo de tamanhos). Cabe ressaltar que, ao reportar informações a respeito do tamanho das gotas, faz-se necessário especificar qual tipo de medida está sendo considerado, diâmetro ou o raio. Emulsões polidispersas podem ser caracterizadas por uma distribuição de tamanho de gotas.

Yang *et al.*, em 2013, estudaram as influências da composição da fase oleosa, da composição da fase aquosa, da concentração de surfactante no tamanho de gota formada. Concluiu-se que a fase oleosa não deve ter alta viscosidade caso o objetivo seja a

formação de gotas menores. Também foi observado que quando a fase aquosa é mais viscosa, as gotas formadas são menores (YANG,2013).

Também em 2013, Soleimanpour et al avaliaram as influências da concentração de estabilizante e óleo no tamanho de gota formado. Constatou-se que altas concentrações de óleo e baixas concentrações de emulsionantes tendem a formar gotas de tamanho maior (SOLEIMANPOUR, 2013).

2.2.4. Turbidez

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, logo a fase dispersa pode podem coalescer, flocular, sedimentar ou migrar para a superfície, o que influencia diretamente na turbidez/opacidade da emulsão (McCLEMENTS, 2007).

É importante conseguir definir quais mecanismos de desestabilização estão ocorrendo. Para tal utilizam-se técnicas ou analíticas ou puramente visuais. O monitoramento das propriedades óticas, com o auxílio do equipamento Turbiscan, por exemplo, permite uma análise mais confiável e precisa. (MENGUAL *et al.*,1999)

Essas propriedades óticas são acompanhadas através da seguinte maneira: o equipamento Turbiscan possui dois detectores de irradiação, um para o feixe de luz que é transmitido após que este passa pela amostra, e outro para o feixe de luz que é espalhado, ou seja aquele que não consegue atravessar a amostra (Figura 8).

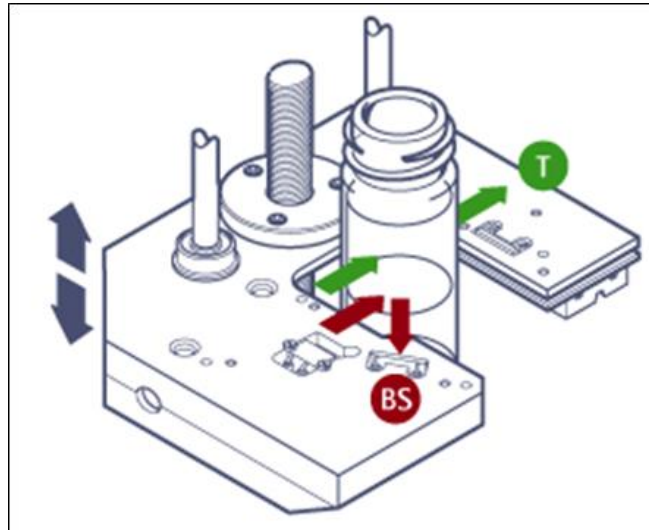


Figura 8. Esquema de análise do Turbiscan.

Quando o processo de desestabilização ocorrer por migração de partículas, por exemplo, através do Turbiscan consegue-se observar no gráfico para o espalhamento, uma região que possuirá espalhamento positivo (corresponde à região com maior concentração de partículas) e outra com espalhamento negativo que corresponde a uma zona clarificada que é formada (PAN et al, 2004).

Matsumiya *et al*, em 2014, estudaram o espalhamento de luz em emulsões para bebidas. Foi observado, de modo geral, que há um aumento na intensidade da luz espalhada devido a aglomeração de gotas de óleo, resultante dos processos de floculação. E quando a intensidade da luz diminuía era devido aos processos de flotação e sedimentação (BLIJDENSTEIN *et al.*, 2003; SILLETTIA *et al.*, 2007).

Yuan *et al*, em 2008, observou que emulsões altamente estáveis não apresentam espectros com variações nas intensidades de luz espalhada. Estes resultados sugerem que as emulsões estáveis alcançam um equilíbrio logo assim que formadas e este é mantido ao longo do tempo.

2.2.5. Balança de Langmuir

As monocamadas de Langmuir são filmes ou películas com espessura monomolecular. Elas são formadas na superfície de uma subfase aquosa por moléculas anfifílicas (Figura 9).

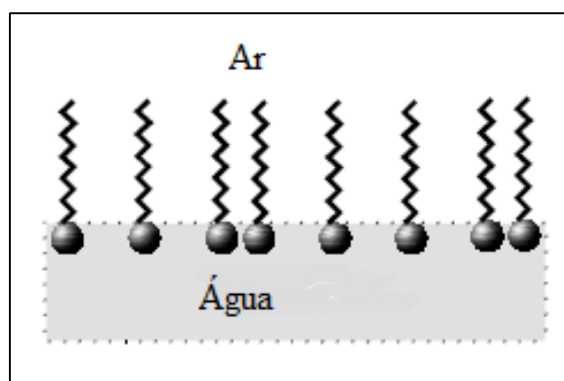


Figura 9. Monocamada de Langmuir.

Essas monocamadas podem ser produzidas numa cuba de Langmuir, que possui um compartimento raso, feito de material hidrofóbico, que contém a subfase aquosa, um sensor de tensão superficial, geralmente uma placa de *Wilhelmy*, e barreiras móveis, utilizadas para comprimir a monocamada formada na superfície. Normalmente essas monocamadas são formadas espalhando-se as moléculas orgânicas sobre uma subfase aquosa.

A pressão de superfície pode ser definida como a diferença entre a tensão superficial de um líquido puro, geralmente água e a tensão superficial deste líquido quando moléculas de carácter anfifílico estão presentes na superfície. (Equação 3)

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

(3)

Em que:

π é a pressão superficial;

γ_0 é a tensão superficial da água pura e

γ é a tensão superficial da água com a monocamada.

Com a cuba de Langmuir, é possível acompanhar a variação da pressão de superfície à medida que ocorre a compressão do filme. Quando a temperatura é mantida constante ao longo do processo, obtém-se uma isoterma de compressão, conforme mostra a Figura 10.

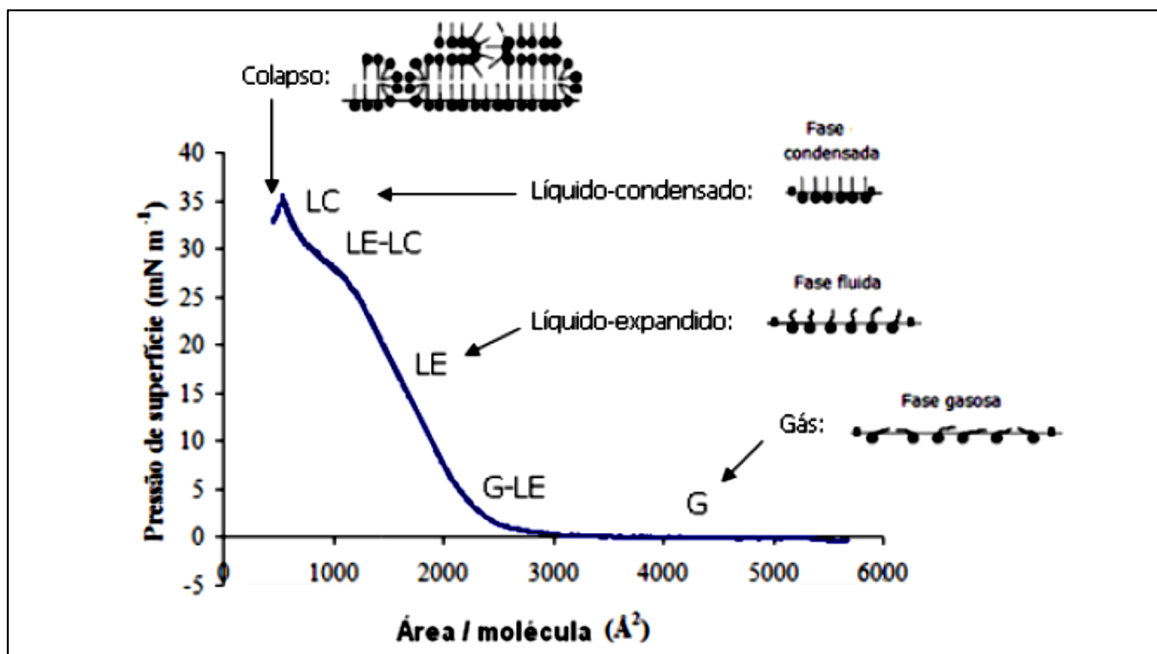


Figura 10. Exemplo de isoterma de compressão de um fosfolipídio. (Adaptado de GIRARD-EGROT *et al*, 2005)

A partir da análise das isotermas de compressão, pode-se obter informações relativas a reorientações das moléculas, a existência de fases de transição e a estabilidade da monocamada na interface ar-água (GIRARD-EGROT et al., 2005).

Quando a compressão ainda não se iniciou, as moléculas se comportam como um gás. Durante a compressão, alguns filmes podem se reorganizar e se comportar como um filme líquido. À medida que se comprime mais, a monocamada pode vir se comportar como um estado sólido até ocorrer o colapso do filme (Figura 11).

Um filme é considerado estável quando, então, mantém suas propriedades ao longo do tempo, sem que apresente colapso ou transição de fase.

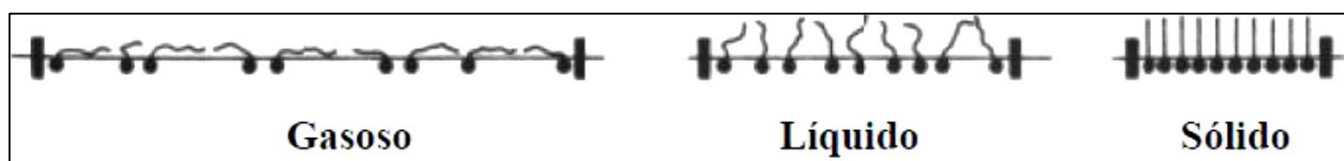


Figura 11. Orientação das moléculas durante as diferentes fases. (Adaptado de ROBERTS, 1990)

Quando as moléculas se comportam como um gás, elas estão muito afastadas umas das outras. Portanto, as forças de interações entre elas são pequenas, isso resulta numa pressão superficial baixa. A área média por molécula na superfície é muito maior que a da molécula. Surfactantes solúveis em água geralmente apresentam esse tipo de comportamento. Em alguns casos é possível observar que, quando ocorre compressão das monocamadas existentes no estado gasoso, há uma transição de fase de primeira ordem para o estado líquido (ALMEIDA, 2012).

Já na fase líquida, há uma interação significativa entre as moléculas. Existem pelo menos dois tipos de fases líquidas: a fase de líquido expandido e a de líquido condensado. Na fase de líquido expandido, as moléculas interagem umas com as outras. Elas são altamente hidratadas, e a equação de estado é frequentemente do tipo de Van der Waals. Já a fase de líquido condensado resulta na condensação do líquido expandido. Nesta fase as moléculas passam a ter uma orientação na superfície. O filme é relativamente mais rígido e as isotermas possuem aspecto próximo ao linear. A fase sólida corresponde ao empacotamento máximo de moléculas, sem que haja o colapso do filme. Nesta fase as isotermas são lineares e a extrapolação para a pressão zero do filme resulta numa superfície que corresponde à área molecular.

Blijdenstein *et al*, em 2013, estudaram as isotermas de compressão para filmes contendo WPI. Foi observado que o filme de WPI apresenta comportamento mais elástico que é devido às mudanças conformacionais que podem ocorrer na interface, como o de desenovelamento.

Capítulo III

Metodologia Experimental

3.1. Planejamento de experimentos

Para a formulação das emulsões foram escolhidas três variáveis para estudo, sendo elas: a razão de óleo de laranja/ água, concentração de goma arábica ou proteína isolada do soro do leite (*whey protein* –WPI) e a concentração do tensoativo dioctil sulfosuccinato de sódio (DSS).

Utilizou-se o óleo essencial de laranja para as formulações das emulsões. Os óleos essenciais são produtos voláteis oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Estes compostos são encontrados em folhas, cascas, flores, sementes, caules e raiz (SANGWAN et al., 2001). De acordo com SIMÕES et al. (2007), óleos essenciais são misturas complexas de compostos que conferem aromas agradáveis e sabores característicos. De uma maneira geral são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais. Muitos óleos essenciais são constituídos de uma variedade de compostos terpenóides, sintetizados a partir da unidade isoprênica.

Várias pesquisas têm demonstrado que óleos essenciais e seus componentes possuem atividades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas (BOZIN et al., 2007). Os antioxidantes podem retardar a velocidade de oxidação através de um mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação com metais. No Brasil o óleo essencial de laranja é bastante utilizado em bebidas. O óleo essencial de laranja utilizado neste estudo foi adquirido na Mapric.

A goma arábica que foi utilizada como estabilizante em um dos planejamentos foi adquirida na Vetec (pureza mínima 85%) Este aditivo já é frequentemente utilizado como espessante, estabilizante para vários alimentos e é muito utilizado na indústria de bebidas há muitos anos, por causa do seu baixo custo e da sua eficiência como estabilizante em emulsões (ACEDO-CARRILLO et al., 2006).

A proteína isolada do soro do leite (pureza 99%) foi gentilmente cedida pela Makeni Chemicals. Seu uso como estabilizante ainda é considerado novo pela indústria de bebidas.

O tensoativo DSS foi obtido da Sigma-Aldrich. Este tensoativo já é amplamente utilizado pela indústria de bebidas (WALSTRA, 2003).

Como agente de peso utilizou-se o diacetato hexaisobutirato de sacarose (SAIB) (Sigma-Aldrich), para igualar a densidade com a fase aquosa.

Neste trabalho, foi elaborado um planejamento experimental completo do tipo $2^3 + 3$ pontos centrais para uma análise exploratória dos efeitos significativos principais sobre a resposta do sistema. A tabela abaixo mostra todos os níveis desse planejamento. O teor de óleo variou entre 30 a 60% em relação ao volume total da emulsão, a concentração de estabilizante variou entre 1 a 15% em relação ao volume de fase aquosa, já a concentração de tensoativo ficou entre 0 a 100 ppm em relação ao volume de fase aquosa.

Tabela 5. Níveis dos planejamentos de experimentos.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
% Óleo de Laranja	30	45	60
% WPI ou % Goma	1	8	15
DSS (ppm)	0	50	100

As análises estatísticas foram realizadas empregando o software Statistica 7.0 para análise dos efeitos de cada variável e suas interações, sendo utilizado 95% como intervalo de confiança. A significância de cada efeito linear e interações foi obtida através do p-valor que, representa a probabilidade de que uma dada variável tenha um efeito não significativo sobre a resposta, dependendo do nível de confiança.

3.2. Preparo das emulsões

Para o preparo de cada emulsão, primeiramente foram preparadas as fases aquosas e oleosas nas composições adequadas para cada experimento. Após preparadas, as emulsões ficaram estocadas à temperatura ambiente (em torno de 24°C) no Laboratório do Grupo Interdisciplinar de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT). Todas as análises posteriores foram realizadas logo que as emulsões haviam sido preparadas, exceto as análises dependentes do tempo.

3.2.1. Preparo das fases aquosas.

Todas as fases aquosas continham concentrações fixas de conservante (1,6% (m/m) de ácido cítrico), antioxidante (0,4% (m/m) de benzoato de sódio) e bactericida (0,4% (m/m) de sorbato de potássio). A quantidade de estabilizante e tensoativo variaram de acordo com o planejamento de experimentos. O preparo da fase aquosa consistiu de uma mistura em um homogeneizador de alta velocidade (Turrax) a 4.000 rpm por aproximadamente três minutos.

3.2.2. Preparo da fase oleosa

O preparo da fase oleosa consistiu na correção de densidade do óleo. Como o óleo de laranja possui densidade menor que da água ($0,867\text{g/cm}^3$), adicionou-se o diacetato hexaisobutirato de sacarose (SAIB) como agente de peso na proporção 1:1 (v/v). O SAIB é um gel, com viscosidade de 100.000 centipoise (cps), densidade de $1,146\text{ g/cm}^3$, temperatura de decomposição de 288°C e alta solubilidade em óleo. Esse composto já possui ampla utilização na indústria de bebidas (BYRD, 2001).

3.2.3. Formação da emulsão

Depois de preparadas as fases aquosa e oleosa, as emulsões foram produzidas utilizando-se um homogeneizador de alta velocidade em uma velocidade de rotação igual a 8000 rpm durante quinze minutos. Normalmente, as partículas produzidas por um homogeneizador de alta velocidade atingem um diâmetro de aproximadamente $2\mu\text{m}$ a $10\mu\text{m}$.

3.3. Caracterização das emulsões.

A estabilidade mecânica dos filmes formados pelos estabilizantes e tensoativo escolhidos, foi avaliada através da balança de Langmuir, com o objetivo de verificar a adequação dos materiais. Com relação às outras análises de caracterização, elas foram realizadas, todas no mesmo dia, logo após o preparo da emulsão.

3.3.1. Balança de Langmuir

A balança de Langmuir é um instrumento que permite manipular a área molecular média por compressão ou expansão do filme, enquanto se mede a pressão do filme. Quando se comprime o filme, a tensão superficial diminui e, conseqüentemente, a pressão de superfície aumenta. O aparato experimental consiste de compartimento raso, com material hidrofóbico, onde fica a subfase aquosa, um sensor de tensão superficial, do tipo placa de *Wilhelmy*, e barreiras móveis utilizadas para comprimir a monocamada formada na superfície (Figura 12) (ROBERTS, 1990).

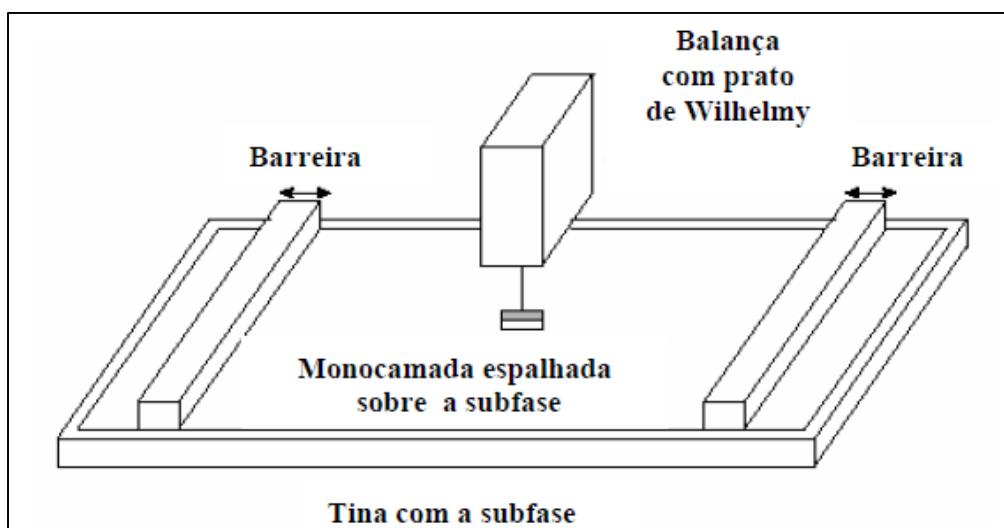


Figura 12. Balança de Langmuir com placa de Wilhelmy e as barreiras. (SANTOS, 2003)

Neste estudo foi utilizado a balança de Langmuir da marca e modelo MicroTrough-S (Kibron Inc.) para avaliar a estabilidade mecânica e resistência à compressão através da medição da pressão superficial dos filmes monomoleculares formados pelo tensoativo DSS, e os estabilizantes goma arábica e proteína isodala do soro do leite (WPI- *whey protein*).

Por se tratar de uma medição muito sensível à presença de contaminantes, a limpeza de todo o aparato experimental foi feita da seguinte forma: primeiro com água ultrapura Mili-Q quente em abundância, depois com água ultrapura Mili-Q a temperatura ambiente e por fim deixou-se a placa e as barreiras em banho de ultrassom por aproximadamente seis horas. Antes de cada experimento, uma isoterma de compressão de água ultrapura era obtida e analisada para confirmar a eficiência da limpeza.

Para esses experimentos foram preparadas soluções 0,5 mg/mL de DSS, 0,5 mg/mL de goma arábica e 0,5 mg/mL de WPI em água. Para a obtenção das isotermas de compressão de DSS e WPI foram aplicadas 100 μ L de cada solução numa subfase de água ultra pura Milli-Q (Millipore) em temperatura ambiente (23 °C). Após a aplicação esperou-se por cinco minutos para a realização da compressão do filme formado. Já para a obtenção da isoterma de compressão da goma arábica, utilizou-se a própria solução como subfase, sendo utilizado aproximadamente 20 mL da solução 0,5 mg/mL de goma arábica.

3.3.2. Índice de emulsificação.

Para avaliar a estabilidade da emulsão, visualmente, foi utilizado o índice de emulsificação (IE). Uma alíquota de 10 mL de emulsão foi vertida para uma proveta para análise. Este índice foi avaliado por até 15 dias aproximadamente, para que se

obtivesse a quantidade máxima de emulsão estável formada. O índice de emulsificação foi obtido através da equação 4, descrita por Cooper e Goldenberg em 1987.

$$\text{IE}(\%) = \frac{CE}{AT} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

CE é a camada emulsionada em unidade de comprimento (cm) e

AT é a altura total em unidade de comprimento (cm)

3.3.3. Tensão superficial

Os métodos mais tradicionais para determinação de tensão superficial são os métodos do anel DuNouy e da Placa Wilhelmy. O princípio de funcionamento se baseia no registro da força (ou do peso) durante a passagem do anel pela superfície. O máximo da força um pouco antes da ruptura do filme de líquido aderido no anel permite o cálculo da tensão superficial.

Neste estudo utilizou-se o tensiômetro Sigma 70 (KSV Instruments Ltd) para a medição das tensões superficiais do óleo com SAIB e das emulsões.

3.3.4. Tamanho de gota

As emulsões foram analisadas, assim que preparadas, quanto ao tamanho das gotas de óleo formadas em um microscópio cuja marca e modelo eram: Microscópio vertical da Carl Zeiss, modelo Axiovert MAT40. As amostras foram diluídas duas vezes em água para que análise pudesse ser realizada. Uma gota da amostra diluída foi colocada numa lamínula (24 mm x 60 mm), e esta foi colocada sobre a lente do microscópio (com o aumento de 100 vezes) e, em seguida, foram feitos ajustes tais como: filtro, luz, lente de aumento e no foco do equipamento, até obter-se uma boa visualização da imagem, para que a foto fosse tirada. Para realizar a medição do tamanho das gotas, usou-se o software AxioVision 4.8. A medição do tamanho de gotas de óleo na emulsão foi quantificada sobre a própria foto obtida. O cálculo obtido foi referente ao diâmetro médio de 100 gotas de óleo, determinado pela média aritmética dos tamanhos das gotas.

3.3.5. Potencial zeta

Para medição do potencial zeta foi utilizado o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation). Para esta medição, as amostras das emulsões recém-preparadas foram previamente diluídas mil vezes, com água ultrapura.

Este equipamento é baseado no princípio da eletroforese, com isso, calcula a velocidade com que as partículas carregadas se movem quando estão sob a ação de um campo elétrico.

As amostras de emulsão eram colocadas em uma cubeta de medição e um campo elétrico é aplicado por um par de eletrodos. Isso faz com que todas as partículas carregadas na emulsão se movam em direção ao eletrodo de carga oposta a uma

velocidade que depende da magnitude de sua carga. O sinal e a magnitude da carga sobre as partículas podem ser deduzidos, a partir da direção e velocidade que eles se movem, e depois convertidos em potencial usando um modelo matemático adequado, programado. Neste estudo, o modelo utilizado foi o de Smoluchowski, com a aproximação de Debye-Huckel.

3.3.6. Análise de estabilidade (Turbiscan)

A estabilidade das emulsões estudadas neste trabalho foi determinada através de análise óptica com o equipamento Turbiscan Lab. Este analisador possui um sistema composto por uma fonte de luz infravermelha e dois detectores sincronizados. O detector de transmissão recebe a luz, a qual passa pela amostra, enquanto o detector de retorno capta o espalhamento da luz por trás da amostra.

O Turbiscan é capaz de identificar mudanças na concentração de emulsões e, em alguns casos, tamanho de gota, ao longo da altura da amostra e em função do tempo. A análise é fundamentada no fato de que a desestabilização de emulsões resultante de coalescência ou efeitos gravitacionais leva à migração das gotas (FRANÇA, 2013).

A propagação da luz através de uma dispersão concentrada pode ser usada para caracterizar a estabilidade físico-química do sistema.

O Turbiscan faz leituras em vários intervalos de tempo pré-programados e sobrepõe as curvas em um gráfico para mostrar a desestabilização da emulsão. Neste trabalho, as varreduras foram programadas para serem feitas com intervalo de vinte minutos durante um dia. O resultado final desta análise é apresentado por dois gráficos distintos. O primeiro gráfico é referente a luz que é transmitida e o segundo a luz que é espalhada. Como as varreduras são feitas no decorrer da amostra (altura do frasco), a

interpretação nas variações das intensidades de luz foram feitas até a altura de 35 mm do frasco, em que fica garantido que estas variações são devidas às emulsões.

3.3.7. Quantificação dos compostos encapsulados

Os compostos com potencial bioativo foram encapsulados foram quantificados por espectrofotometria no UV/Vis no espectrofotômetro Alpha Asw 002 UV-Vis Analyst 1803. Para isso foram necessárias a realização de extração líquido/líquido.

Para o nutriente β -caroteno (93%, Sigma-Aldrich), a quantificação foi feita segundo método descrito por Yuan *et al* em 2008. Uma alíquota de 1 mL de emulsão foi extraída três vezes com 2 mL de etanol e 3 mL de n-hexano. Após as extrações, as fases com hexano foram juntadas e diluídas para a análise espectrofotométrica num comprimento de onda igual a 450 nm. A concentração de β -caroteno foi obtida a partir da construção de uma curva de calibração feita sob as mesmas condições.

Já para o nutriente α -tocoferol (Vitamina E) (96%, Sigma-Aldrich), a quantificação foi feita através da extração de uma alíquota de 1 mL de emulsão com 5 mL de diclorometano. Após duas extrações, as fases orgânicas foram juntadas e diluídas para medição da absorvância em 296 nm. A partir da construção de uma curva de calibração feita sob as mesmas condições foi possível obter a concentração de vitamina E emulsionada.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos emulsionantes

4.1.1. Concentração micelar crítica do dioctil sulfosuccinato de sódio.

A concentração micelar crítica (CMC) de um tensoativo é uma informação importante, pois com ela consegue-se definir qual concentração de tensoativo deve ser utilizada de modo a obter a redução máxima na tensão superficial da água. A Figura 13 mostra a variação da tensão superficial em função da concentração de dioctil sulfosuccinato de sódio (DSS), permitindo calcular a CMC.

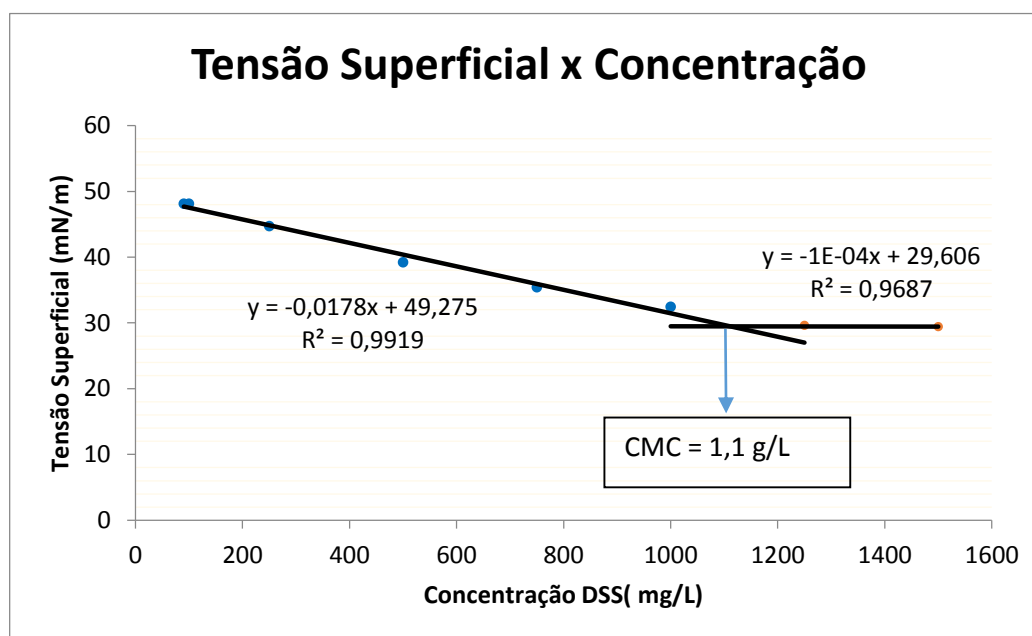


Figura 13. Gráfico de Tensão Superficial x Concentração de DSS

Pelo gráfico observa-se que a CMC obtida foi igual a 1,1 g/L. Este valor encontra-se concordante com o que é apresentado na literatura (STEFFY et al, 2011). Embora o valor da CMC seja alto, o limite máximo permitido para este tensoativo pela legislação brasileira é de 100mg/L.

4.1.2. Balança de Langmuir

A partir da análise das isotermas de Langmuir dos agentes emulsionantes, podem ser obtidas informações quanto à natureza do filme formado. Foram avaliados os filmes do tensoativo DSS e dos estabilizantes goma arábica e proteína isolada do soro do leite (WPI).

Na Figura 14 é mostrada a isoterma de compressão para a goma arábica. Esta isoterma, diferentemente das outras, não foi feita em subfase aquosa, e sim com a própria solução de goma arábica. A curva mostra como a pressão de superfície aumenta em função da área entre as barreiras.

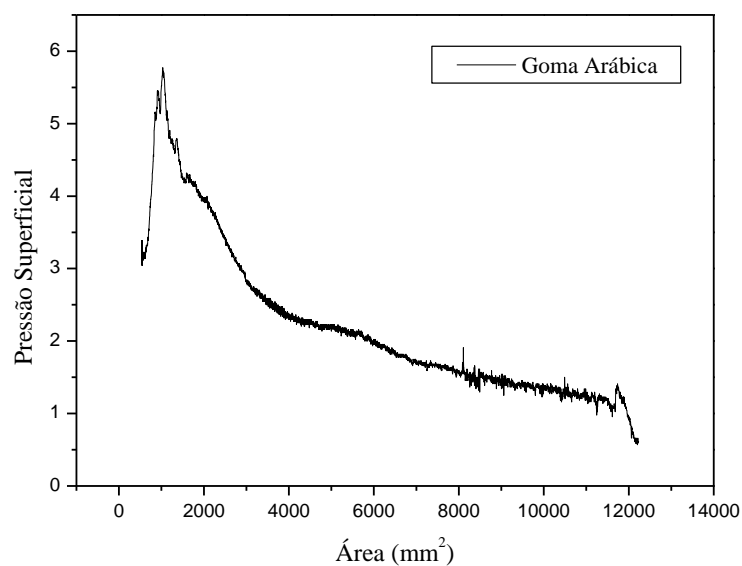


Figura 14. Isoterma de Compressão da goma arábica

Como pode ser observado pela isoterma de compressão da goma arábica, o aumento na pressão superficial foi pequeno, em geral, é desejado que haja uma redução mais significativa na tensão superficial. Este resultado difere daqueles encontrados na literatura. (ALMEIDA,2012). Como a goma arábica é composta por polissacarídeos e glicoproteínas, provavelmente devido a condições de armazenamento, pode ter ocorrido a degradação desta. Como resultado tem-se que neste estudo a goma arábica não foi considerado um bom agente emulsionante.

Já para as isotermas da proteína isolada do soro do leite (WPI) e do tensoativo DSS o resultado mostrou-se mais promissor, como pode ser visto na Figura 15.

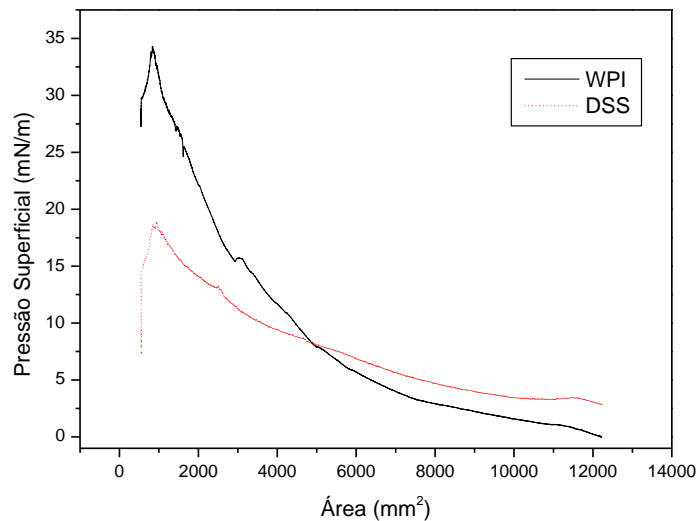


Figura 15. Isothermas de Compressão para o WPI e DSS.

Ambos os filmes foram capazes de reduzir a tensão superficial da água, uma vez que pode-se observar um grande aumento na pressão superficial durante a redução da área disponível entre as barreiras.

O DSS por ser um tensoativo solúvel em água apresenta uma isoterma típica de um estado menos condensado. Então, apesar de ser capaz de reduzir a tensão superficial da água, ele não forma um filme sólido. Além disso, pode-se dizer que o filme de DSS apresenta um caráter mais elástico. Esse resultado é de grande importância, pois filmes elásticos conseguem acompanhar as deformações da gota.

Já analisando a isoterma de compressão do WPI, pode-se notar que a proteína isolada do soro do leite foi capaz de reduzir mais a tensão superficial da água que o DSS. Sendo o filme formado pela proteína considerado mais elástico. Além disso, sabe-se que o WPI adsorve na superfície das gotas e isso resulta numa estabilidade maior para as emulsões. (CHANAMAI, 2002). Esta análise indica preliminarmente que a emulsão preparada com WPI é, provavelmente, mais estável que a preparada apenas com DSS e, certamente, é mais estável que a emulsão preparada com goma arábica.

4.2. Planejamento de Experimentos

A estratégia experimental utilizada para avaliar a estabilidade de emulsões e suas propriedades físico-química foi a realização de um planejamento de experimentos. Nesse estudo optou-se por um planejamento fatorial completo, uma vez que este inclui todas as possíveis combinações entre os níveis dos fatores do experimento. Desta forma foi possível avaliar os efeitos das variáveis do sistema e suas interações.

O planejamento de experimentos encontra-se muito associado ao estudo de estabilidade de emulsões, uma vez que este ainda é muito empírico. (MIRHOSSEIN et al., 2007; NIRLAULA et al., 2004; TESCH et al., 2002; MIRHOSSEIN et al., 2008; TADROS, 2004).

A primeira parte para obtenção de resultados referentes aos planejamentos fatoriais completos foi a realização dos experimentos de preparo da emulsão, empregando WPI ou a goma arábica como estabilizante. As variáveis-resposta foram obtidas a partir de análises de estabilidade e das propriedades físico-químicas. Com esses resultados, pôde-se estabelecer quais variáveis são consideradas significativas nas diferentes propriedades das emulsões e quais contribuem efetivamente para a estabilidade.

Em ambos planejamentos foram analisadas as respostas em relação ao tamanho de gota, à tensão superficial, ao potencial zeta e à estabilidade.

As medidas de tamanho de gota fornecem um indicativo dos possíveis mecanismos de desestabilização. Já a partir das análises do potencial zeta, pode-se prever se as gotas estão carregadas e se são essas cargas as responsáveis pela estabilidade do sistema devido a repulsões eletrostáticas. Com a análise de tensão superficial, pode-se prever também se haverá liberação de óleo e avaliar as interações intermoleculares.

4.2.1. Resultados de experimentos com a goma arábica como estabilizante

Foram feitas as emulsões com as diferentes formulações, seguindo os níveis do planejamento de experimentos. Neste planejamento utilizou-se a goma arábica como estabilizante. A Tabela 6 mostra os resultados em relação a quantidade máxima de emulsão estável formada.

Tabela 6. Resultados do planejamento de experimentos com a goma arábica como estabilizante

Experimento	% Óleo	% Goma	DSS (ppm)	IE (%)
1	-	-	-	44
2	+	-	-	0
3	-	+	-	54
4	+	+	-	100
5	-	-	+	38
6	+	-	+	72
7	-	+	+	98
8	+	+	+	100
9	0	0	0	76
10	0	0	0	75
11	0	0	0	76
Desvio padrão dos pontos centrais				0,0058

Pode-se constatar que, exceto as emulsões dos experimentos 4, 7 e 8 que mantiveram a alta estabilidade, todas as outras emulsões apresentaram resultados não satisfatórios quanto à estabilidade.

Para o experimento 2 pode-se observar que não chegou a haver formação de emulsão. O fato da goma arábica não ter conseguido formar emulsões estáveis, quando presente em baixas quantidades, corrobora a hipótese levantada através da análise da isoterma de compressão, ou seja, devido a condições de armazenamento, a goma arábica está passível de sofrer degradação. Sendo necessário, então, quantidades maiores para que a emulsão atinja certa estabilidade

A partir de uma análise estatística desses resultados, os efeitos de cada variável na estabilidade poderão ser identificados mais facilmente. (Tabela 7)

Tabela 7. Efeito das variáveis sobre a estabilidade das emulsões.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	p¹
a ₀	0,633	0,002	0,000010
(1)% Óleo	0,095	0,004	0,001842
(2)% Goma	0,495	0,004	0,000068
(3)DSS (ppm)	0,275	0,004	0,000220
1 e 2	0,145	0,004	0,000792
1 e 3	0,085	0,004	0,002299
2 e 3	-0,06	0,004	0,005465

1-Valores com p<0,05 indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Estatisticamente, todas as variáveis exercem efeitos na estabilidade das emulsões. A variáveis independentes e as interações das variáveis óleo com goma e óleo com DSS exercem um efeito positivo, portanto, quando aumentadas essas quantidades, as emulsões formadas deverão ser mais estáveis. No entanto, observa-se que a interação das variáveis goma e DSS causa um efeito negativo na estabilidade das emulsões, mesmo que este seja

pequeno. Essa diminuição na estabilidade é devida a alguma interação física ou química entre os compostos goma arábica e DSS.

O modelo para estabilidade após 15 dias foi validado através da comparação dos dados experimentais com os preditos. Na Figura 16 abaixo é apresentada essa comparação sob forma de um gráfico valores estimados *versus* valores observados.

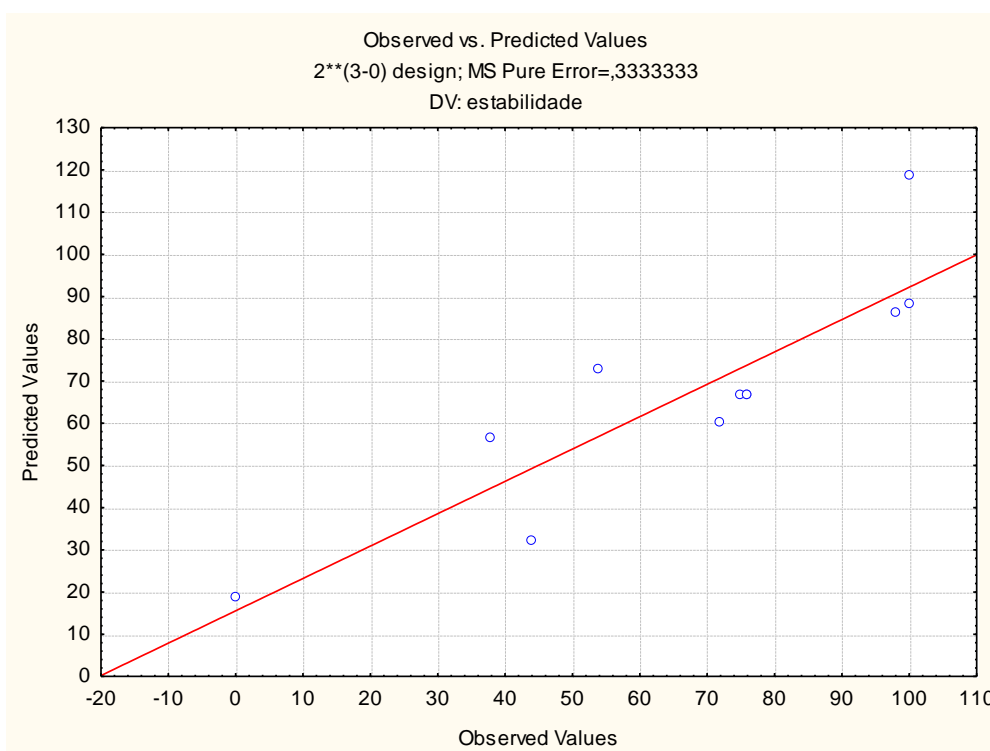


Figura 16. Valores preditos x valores observados para a resposta estabilidade. –

Planejamento Goma

Através do gráfico apresentado acima pode-se notar que o modelo para descrever a estabilidade do sistema apresentou valores estimados satisfatórios. Esses valores em todos os experimentos foram discrepantes daqueles valores observados, porém pode-se dizer que estão dentro do erro associado. Como foi sugerido que a goma arábica estaria

se degradando, pode-se dizer que este fator contribuiu para os erros relativos entre os valores.

4.2.1.1. Análise da tensão superficial

A tabela 8 mostra os resultados em relação tensão superficial das emulsões que foram preparadas segundo o planejamento.

Tabela 8. Resultado da análise da tensão superficial das emulsões

Experimento	% Óleo	% Goma	DSS (ppm)	Tensão Superficial γ (mN/m)	IE(%)
1	-	-	-	31,7	44
2	+	-	-	28,5	0
3	-	+	-	43,0	54
4	+	+	-	45,8	100
5	-	-	+	32,1	38
6	+	-	+	33,4	72
7	-	+	+	41,7	98
8	+	+	+	37,5	100
9	0	0	0	43,0	76
10	0	0	0	42,8	75
11	0	0	0	40,5	76
Desvio padrão dos pontos centrais				1,4	

Pode-se observar que a emulsão referente ao experimento 2 possuiu tensão superficial muito próxima a tensão da fase oleosa pura (27mN/m). Por esta emulsão ser altamente instável, esse valor é devido a liberação de óleo para a superfície.

Já para as outras emulsões não se pode constatar uma certa constância em relação a tensão superficial e sua estabilidade. A análise estatística para esses resultados é apresentada na tabela a seguir (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito das variáveis sobre a tensão superficial das emulsões.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	p¹
a ₀	38,17	0,42	0,000120
(1)% Óleo	-0,82	0,98	0,490048
(2)% Goma	10,58	0,98	0,008485
(3)DSS (ppm)	-1,05	0,98	0,394894
1 e 2	0,09	0,98	0,935984
1 e 3	-0,61	0,98	0,596965
2 e 3	-3,73	0,98	0,062799

1-Valores com $p < 0,05$ indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Para a tensão superficial pode-se observar que somente a variável concentração de estabilizante exerce um efeito positivo na tensão superficial da emulsão. Esse resultado é esperado, pois, quando aumenta-se a quantidade de estabilizante em emulsão, mais estável tende ser a emulsão, acarretando em uma menor quantidade de óleo liberado.

Na Figura 17 é apresentada a comparação entre os valores observados e os estimados pelo modelo para a tensão superficial.

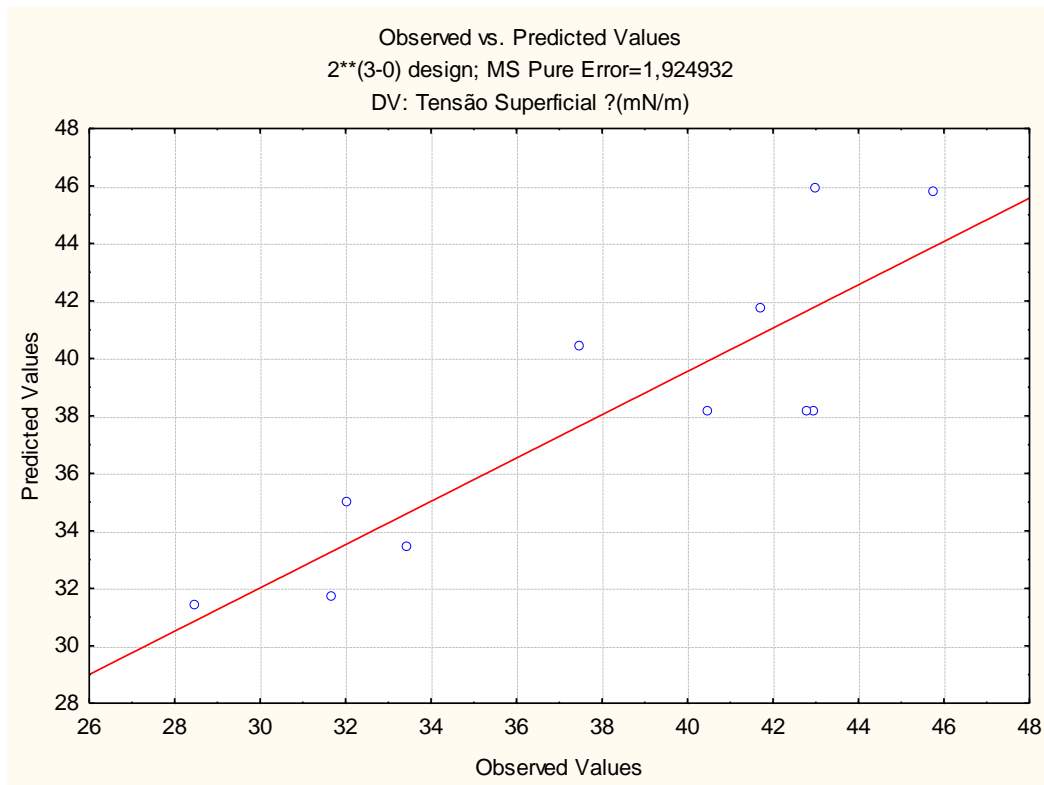


Figura 17. Valores preditos x valores observados para a resposta tensão superficial. – Planejamento Goma

O modelo proposto para a tensão superficial possui discrepâncias em relação os valores observados, e estas são menores quando comparadas com o modelo obtido para estabilidade. No entanto, este modelo só pode ser considerado satisfatório para alguns experimentos, não podendo assim, ser utilizado para representar a resposta da tensão superficial como um todo.

4.2.1.2. Análise do potencial zeta

Os resultados obtidos para a análise do potencial zeta são apresentados na tabela a seguir. (Tabela 10)

Tabela 10. Resultado da análise do potencial zeta das emulsões.

Experimento	% Óleo	% Goma	DSS (ppm)	Potencial ζ (mV)	IE(%)
1	-	-	-	-34	44
2	+	-	-	-39	0
3	-	+	-	-35	54
4	+	+	-	-30	100
5	-	-	+	-34	38
6	+	-	+	-32	72
7	-	+	+	-36	98
8	+	+	+	-37	100
9	0	0	0	-35	76
10	0	0	0	-35	75
11	0	0	0	-36	76
Desvio padrão dos pontos centrais				1	

O potencial zeta não foi capaz de traduzir a estabilidade, uma vez que, apesar do alto valor de potencial zeta na emulsão 2, esta não era estável. Esta propriedade só servirá como um qualitativo se há ou não interações eletrostáticas significativas.

A análise estatística para os resultados de potencial zeta é apresentada na tabela a seguir. (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito das variáveis sobre o potencial zeta das emulsões.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	p¹
a ₀	-34,73	0,26	0,000057
(1)% Óleo	0,44	0,62	0,548973
(2)% Goma	0,61	0,62	0,426211
(3)DSS (ppm)	-0,34	0,62	0,640909
1 e 2	1,70	0,62	0,109948
1 e 3	0,22	0,62	0,760270
2 e 3	-3,38	0,62	0,031703

1-Valores com p<0,05 indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Pela tabela, visualiza-se que nenhuma das variáveis independentes é capaz, neste intervalo em estudo, alterar significativamente o potencial zeta das emulsões. Porém, tem-se que a interação entre a quantidade de estabilizante e tensoativo causa um efeito negativo no potencial zeta. Esse mesmo efeito negativo também já havia sido observado para as respostas de estabilidade e tensão superficial. Isso corrobora a ideia de que ocorre uma interação química entre os compostos, que resulta em uma diminuição da tensão superficial e do potencial zeta, acarretando numa instabilidade do sistema.

A análise do modelo para o potencial zeta é representada através do gráfico apresentado na Figura 18 a seguir.

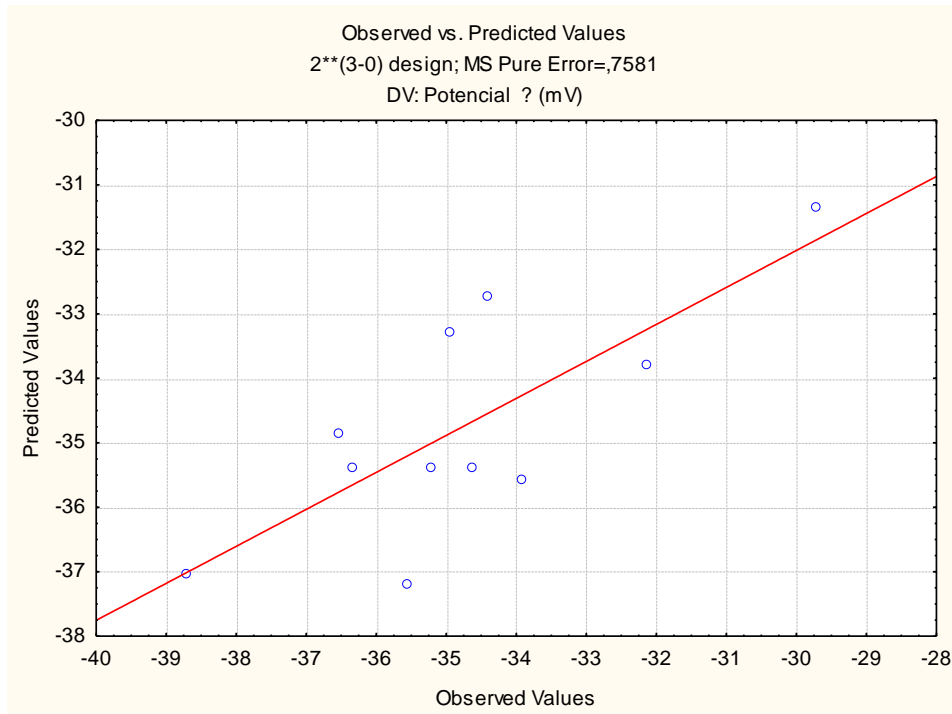


Figura 18. Valores estimados x valores observados para a resposta potencial zeta. – Planejamento Goma

O modelo proposto para o potencial zeta pode ser considerado satisfatório, uma vez que, dentro do erro experimental associados a análise, os valores preditos pouco diferem daqueles observados.

4.2.1.3. Análise do tamanho de partícula

O tamanho de gota foi avaliado por microscopia ótica e algumas imagens são mostradas nas figuras a seguir. (Figuras 19, 20, 21.)

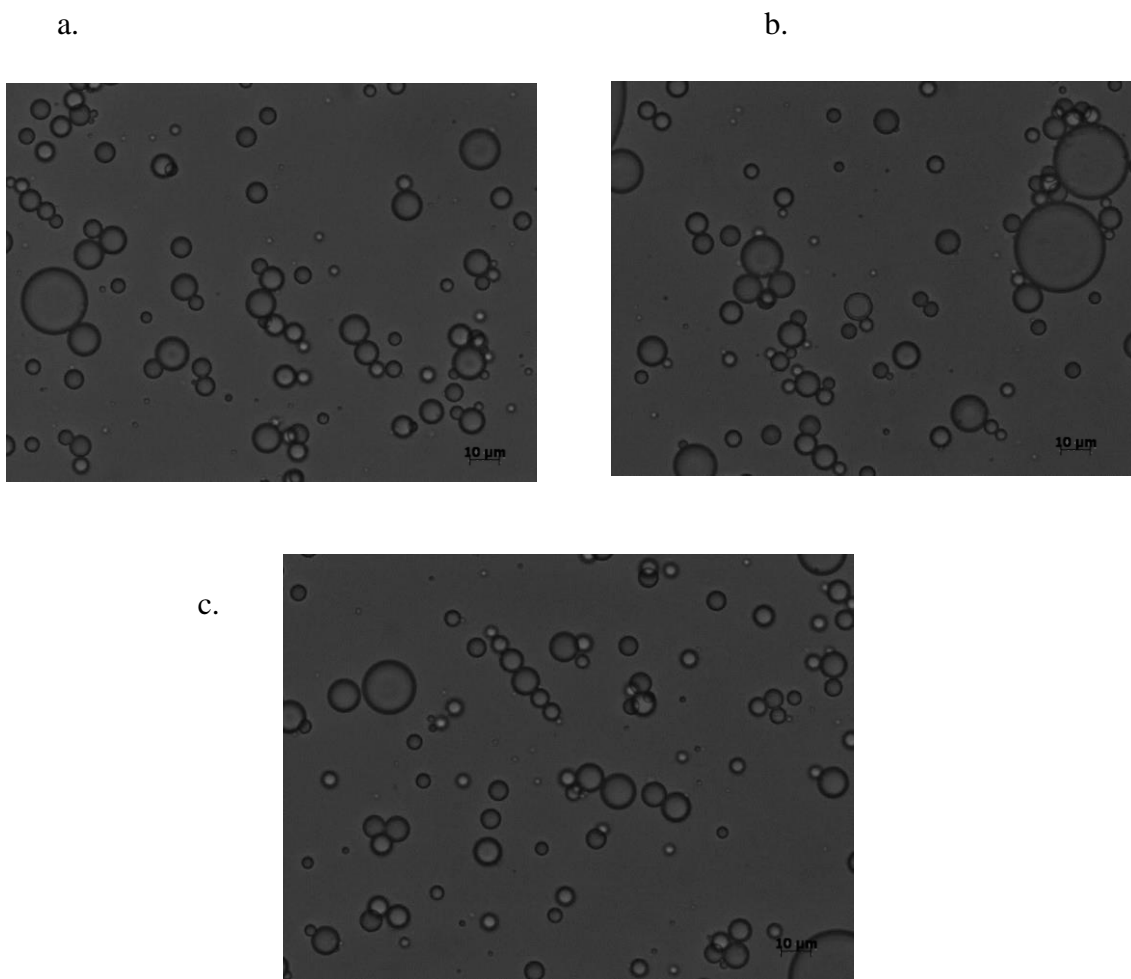
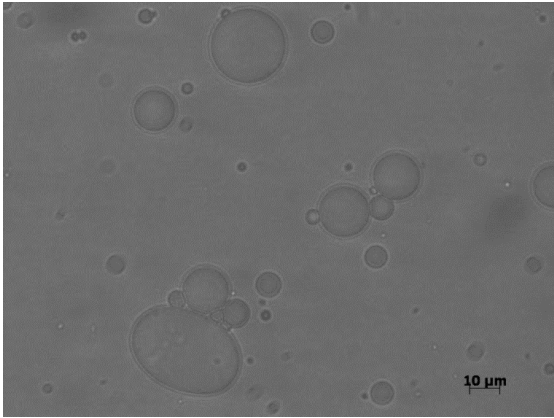


Figura 19. Microscopia ótica das emulsões referentes aos pontos centrais. a) ponto central 1; b) ponto central 2 e c) ponto central 3.

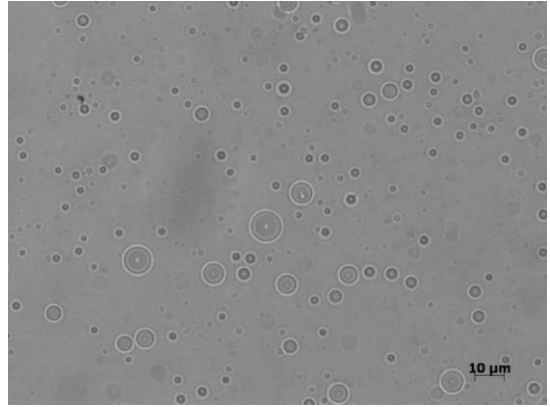
Comparando-se os pontos centrais pode-se notar que a distribuição é bastante semelhante, isso indica a reprodutibilidade dos experimentos. Observa-se também, a presença de formação de conglomerados de gotas menores em torno de gotas maiores, indicando o processo de floculação e coalescência.

Para as amostras com menos estabilidade (experimentos 1,2,3,5 e 6) algumas imagens são apresentadas na figura a seguir. (Figura 20)

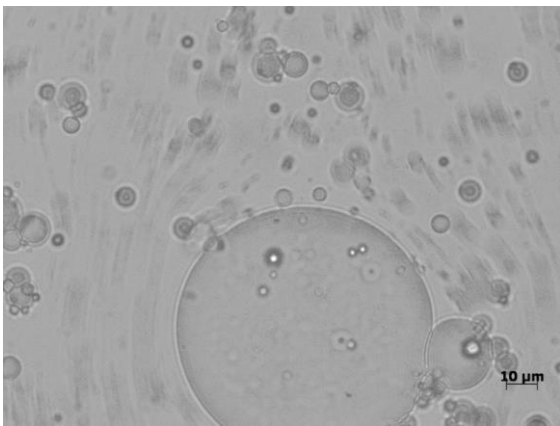
a. b.



c.



d.



e.

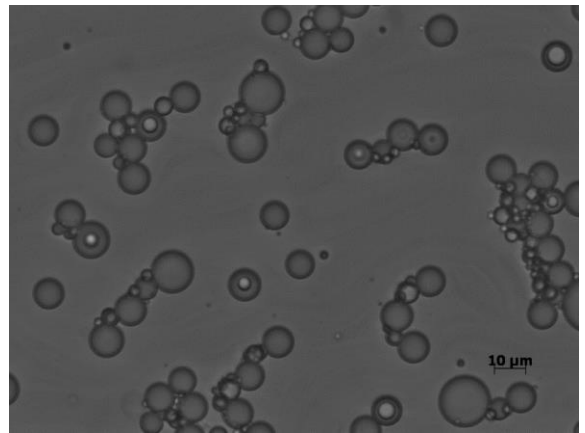


Figura 20. Microscopia ótica das emulsões mais instáveis. a) experimento 1; b) experimento 2; c) experimento 3; d) experimento 5; e) experimento 6.

É possível observar a formação de emulsões múltiplas e que os fenômenos de coalescência e floculação ocorrem em todas essas emulsões instáveis. Pela Figura 20,

nota-se que o meio contínuo favorece a movimentação das gotas por ser fluido. Pode-se perceber também que a emulsão do experimento 2, aquela que rapidamente se desestabiliza, apresenta uma imagem de microscopia ótica semelhante a de uma fase contínua totalmente separada.

Algumas imagens referentes às emulsões mais estáveis são apresentadas na Figura 21.

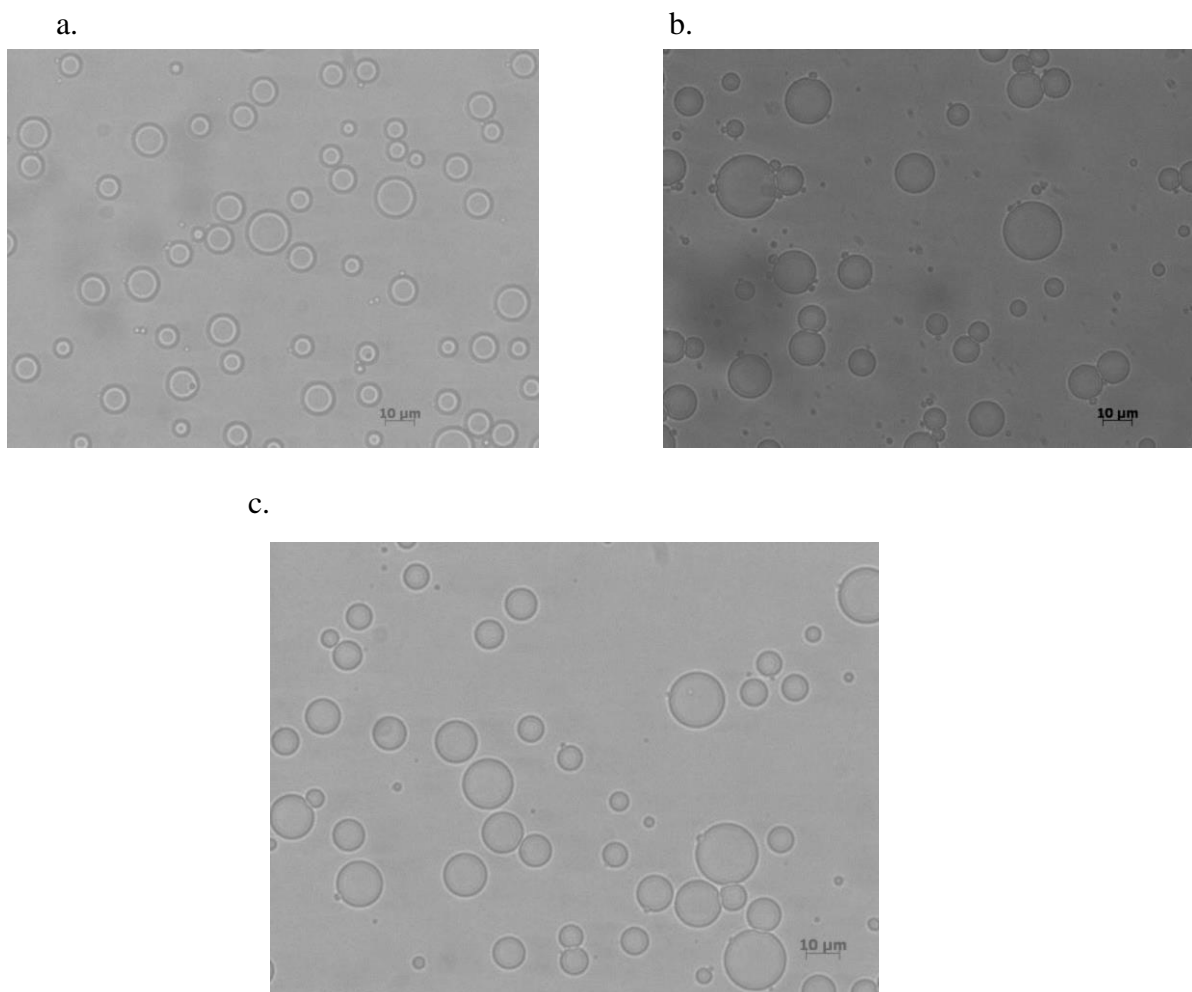


Figura 21. Microscopia ótica das emulsões mais estáveis. a) experimento 4; b) experimento 7; c) experimento 8.

As emulsões mais estáveis apresentaram imagens de microscopia ótica muito semelhantes. Nelas podem ser observadas a distribuição de gotas de forma contínua e o

processo de floculação, que não afeta a estabilidade destas emulsões devido a presença do agente de peso na fase dispersa, que é capaz de conter a separação de fase, pois este iguala as densidades entre as fases.

A partir das imagens de microscopia ótica foram calculadas o diâmetro das gotas e esses resultados são apresentados na tabela abaixo. (Tabela 12)

Tabela 12. Resultado da análise do tamanho de gota das emulsões.

Experimento	% Óleo	% Goma	DSS (ppm)	Tamanho (µm)	% Emulsão
1	-	-	-	12,0	44%
2	+	-	-	5,8	0%
3	-	+	-	6,0	54%
4	+	+	-	9,8	100%
5	-	-	+	9,6	38%
6	+	-	+	5,3	72%
7	-	+	+	6,4	98%
8	+	+	+	9,0	100%
9	0	0	0	7,0	76%
10	0	0	0	7,1	75%
11	0	0	0	7,1	76%
Desvio padrão dos pontos centrais				0,1	

Em uma primeira análise, pode-se perceber que um aumento na concentração de estabilizante provocou uma diminuição no tamanho das gotas formadas. De maneira geral, não se consegue relacionar os efeitos das outras variáveis sobre a resposta. Com uma análise estatística, essa atribuição torna-se mais fácil. Na Tabela 13 são apresentados os efeitos das variáveis no tamanho de gota da emulsão.

Tabela 13. Efeito das variáveis sobre o tamanho de gota.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	p¹
a0	7,75	0,02	0,000008
(1)% Óleo	-1,05	0,05	0,002417
(2)% Goma	-0,39	0,05	0,017347
(3)DSS (ppm)	-0,83	0,05	0,00391
1 e 2	4,22	0,05	0,000151
1 e 3	0,18	0,05	0,075271
2 e 3	0,59	0,05	0,007624

1-Valores com $p < 0,05$ indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Observa-se que todas as variáveis independentes exercem um efeito negativo no tamanho de gota, ou seja, quando as concentrações de estabilizante, óleo e tensoativo são aumentadas, ocorre uma diminuição do tamanho de gota. Esse resultado é importante, pois com a diminuição do tamanho de gota, as propriedades óticas das emulsões podem mudar e com isso elas podem se tornar translúcidas, que pode ser desejável para determinados segmento de bebidas. Já a interação entre as variáveis exercem um efeito positivo, ou seja, tendem a aumentar o tamanho de gota. Esse resultado indica que a interação entre as variáveis acarreta num aumento da instabilidade do sistema, uma vez que com o aumento do tamanho de gota, as emulsões tendem a ser mais instáveis (SOLEIMANPOUR, 2013).

A análise do modelo para a resposta do tamanho de partícula é apresentado na figura a seguir. (Figura 22)

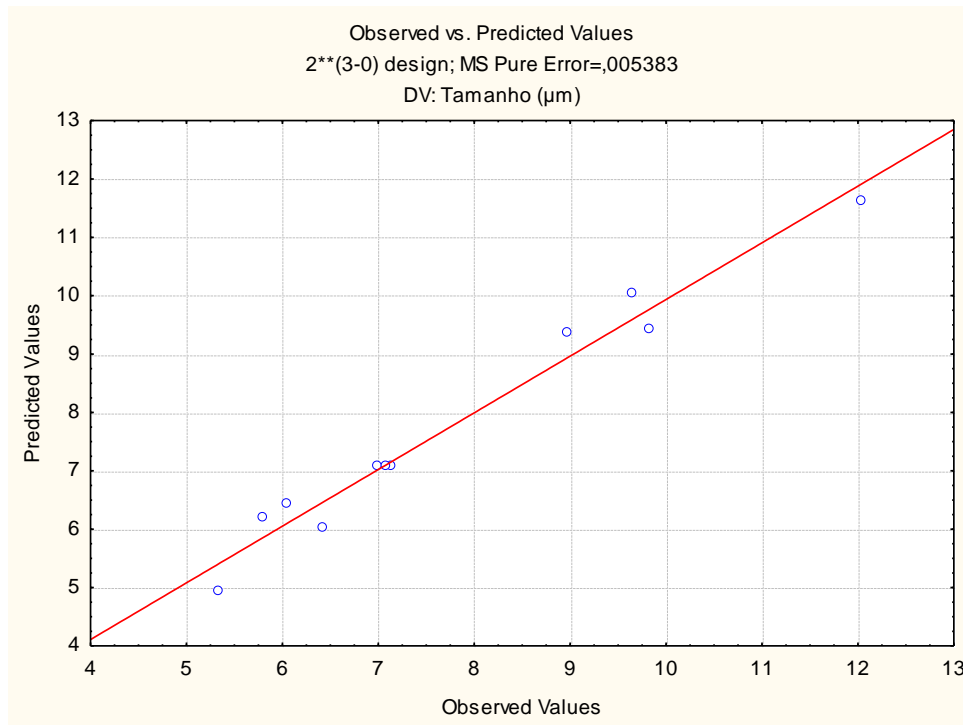


Figura 22. Valores preditos x valores observados para a resposta tamanho de partícula. – Planejamento Goma

O modelo obtido para o tamanho de partícula dentre os outros modelos apresentou um resultado mais satisfatório. As diferenças entre os valores preditos e os observados foram menores. Com isso, pode-se dizer que este modelo é capaz de representar os dados experimentais.

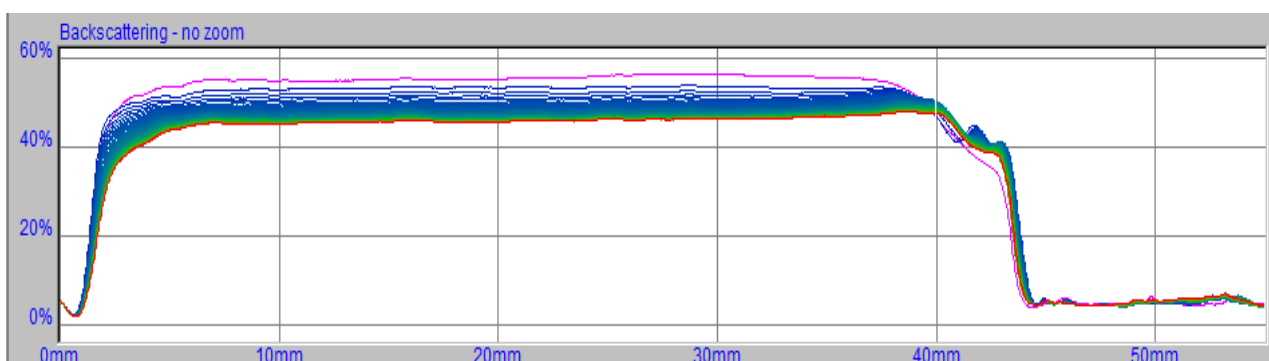
4.2.1.4. Análise de estabilidade (Turbiscan)

Esta análise também será dividida em três blocos. O primeiro para as emulsões mais estáveis (Figura 19), o segundo para as mais instáveis (Figura 23) e por último serão analisados experimentos correspondentes aos pontos centrais do planejamento.

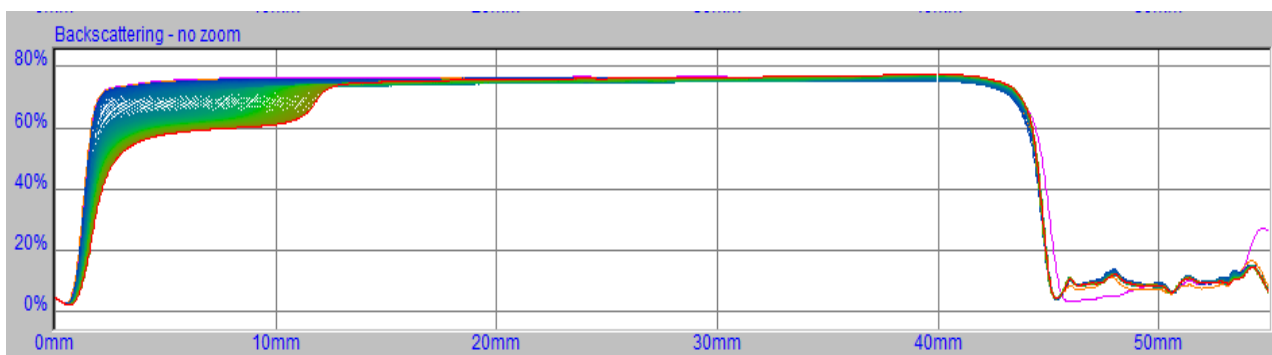
Os gráficos apresentados para a análise de turbidez são apresentados a seguir, em que o eixo y representa a intensidade de luz espalhada e o eixo x a altura do frasco.

A primeira varredura do sistema corresponde a linha em cor rosa e a última (após 24 horas) em cor vermelha. As varreduras intermediárias são representadas em cor azul e verde.

a.



b.



c.

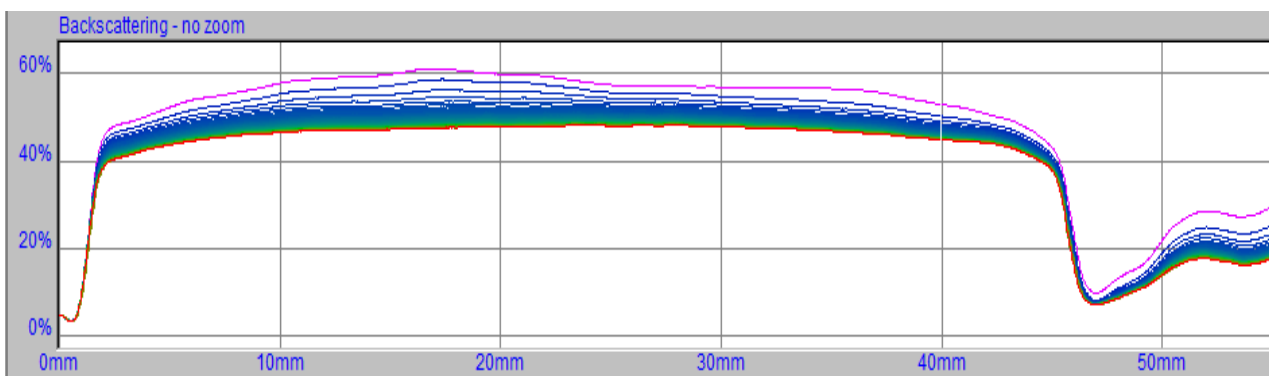


Figura 23. Análise pelo Turbiscan para os experimentos: a) 4; b) 7; c) 8

As emulsões mais estáveis obtidas com a goma arábica possuem espectros de espalhamento de luz diferentes. As emulsões 4 e 8, por terem formulações parecidas, só diferindo na presença e ausência de tensoativo, possuem espectro muito parecidos. Nestes espectros não podem ser observadas zonas clarificadas, porém observa-se a migração de gotas para cima. Porém esse fenômeno de flotação não desestabiliza a emulsão.

Já para o experimento 7 pode-se observar somente a formação de uma pequena zona clarificada, que a olho nu não conseguiria ser notada.

Os espectros referentes às emulsões instáveis são mostrados nas figuras a seguir. (Figura 24, 26)

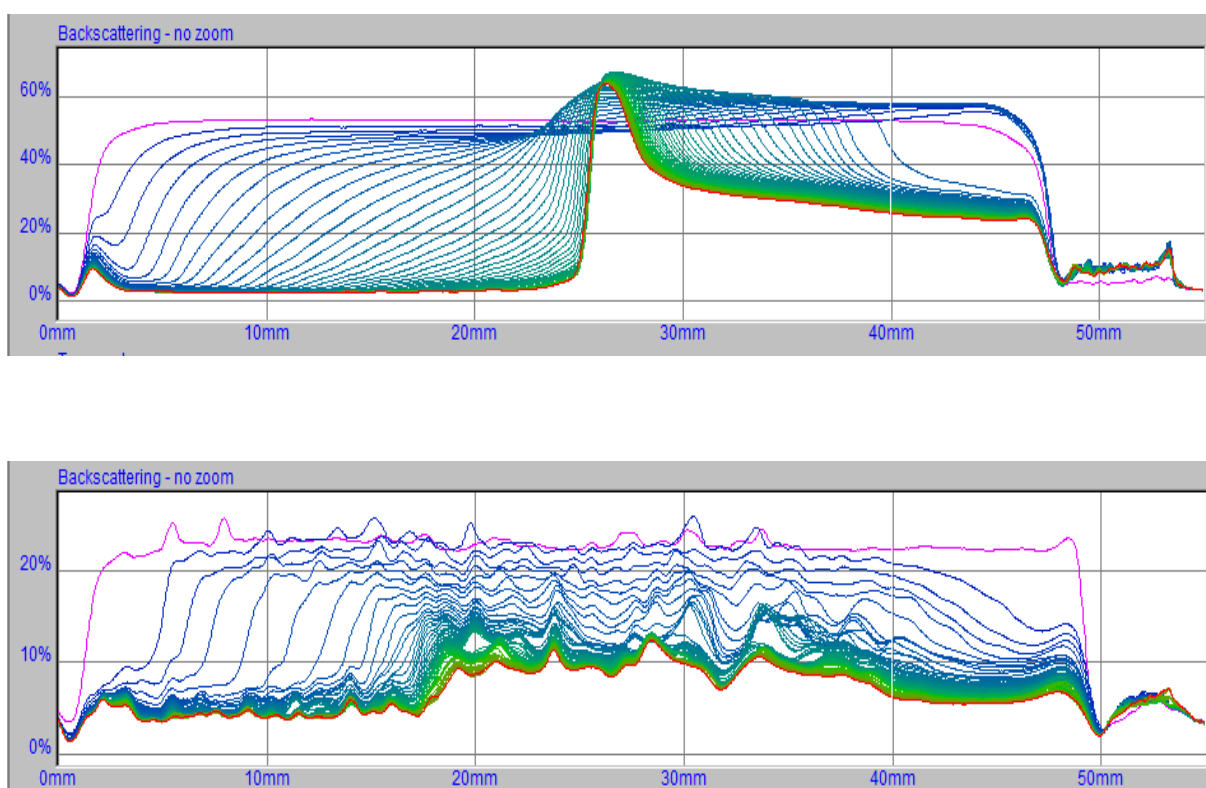


Figura 24. Análise pelo Turbiscan para os experimentos: a) 1 e b) 2.

Observa-se que os espectros obtidos para estas duas emulsões instáveis são bem diferentes. Para o experimento 1 tem-se a formação de uma zona clarificada ao fundo do frasco e na parte superior também. Nota-se também a formação de uma zona concentrada, que se traduz sobre a forma de um máximo de espalhamento no espectro.

Já para o experimento 2 pode ser observada a desemulsificação quase que instantânea da emulsão. Na figura abaixo (Figura 25) são mostradas as emulsões após 24 horas do seu preparo.

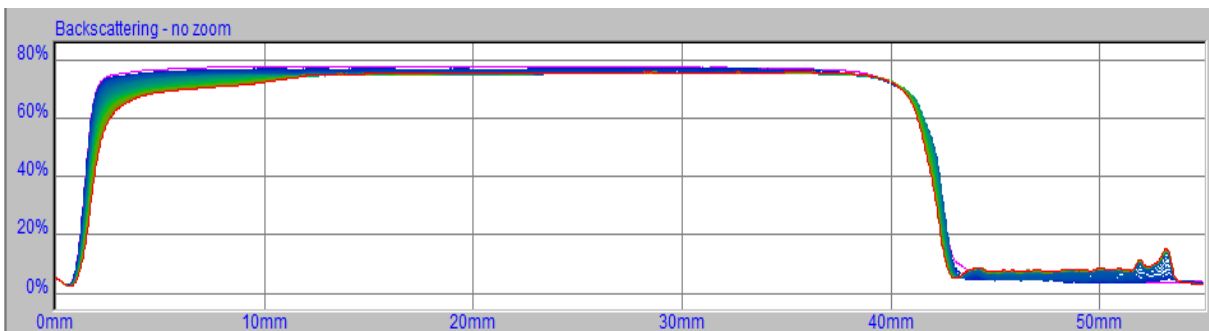


Figura 25. Experimento 1 (à esquerda) e experimento 2 (à direita) após 24 horas.

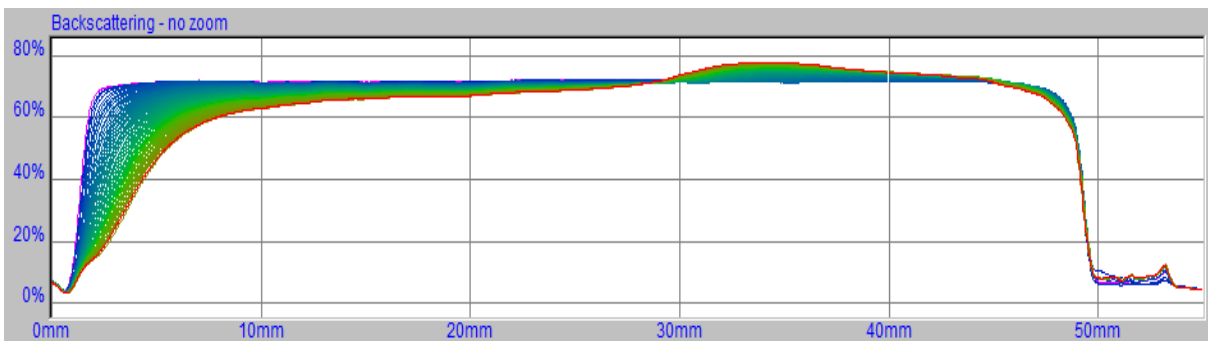
Pela figura 25 pode-se observar a formação da zona concentrada de emulsão e duas zonas menos concentradas em relação a esta. Para o experimento 2 observa-se a formação de macro gotas de óleo, o que justifica o aspecto do espectro de espalhamento de luz, que para este experimento foi composto por linhas irregulares.

As outras emulsões instáveis são mostradas na figura a seguir (Figura 26)

a.



b.



c.

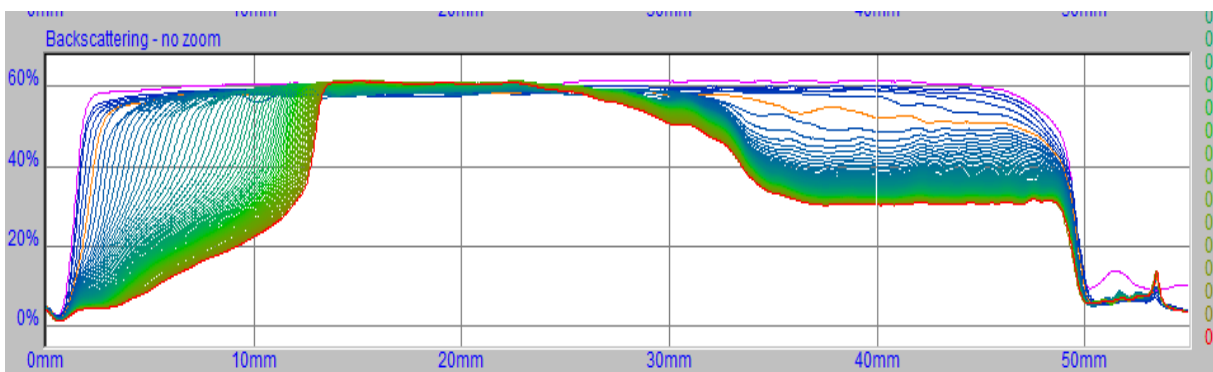
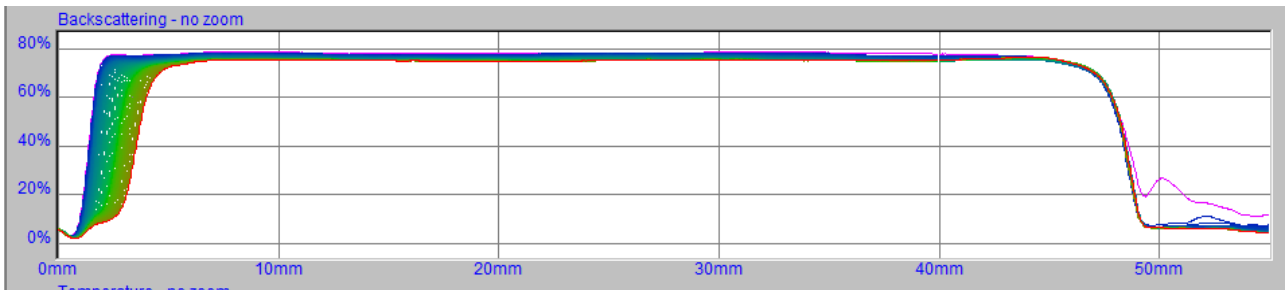


Figura 26. Análise pelo Turbiscan para os experimentos: a) 3, b) 5 e c) 6.

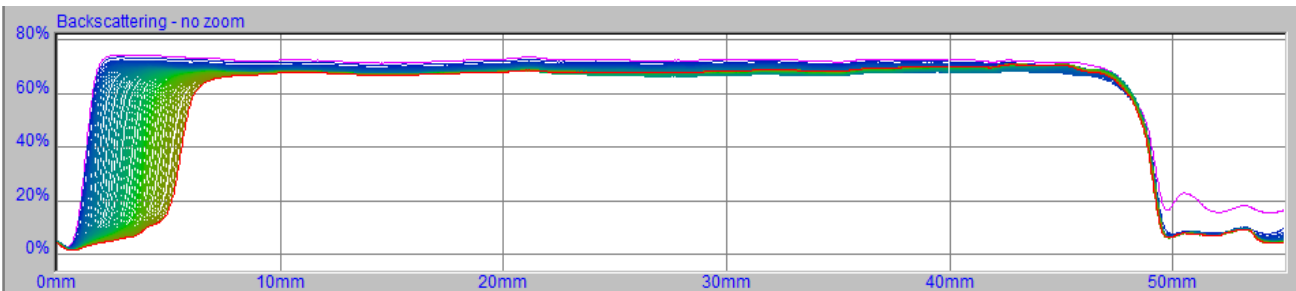
Observa-se que para o experimento 3, as 24 horas de análise não foram suficientes para expressar a instabilidade do sistema. Isso indica que o processo de desestabilização desta amostra é mais lento até que o equilíbrio é alcançado. Já para as emulsões 5 e 6 os espectros já exprimem a instabilidade dos sistemas. Em ambos é possível observar a formação de zonas clarificadas, devido a processos de floculação e flotação.

Os espectros dos experimentos referentes aos pontos centrais são apresentados abaixo. (Figura 27)

a.



b.



c.

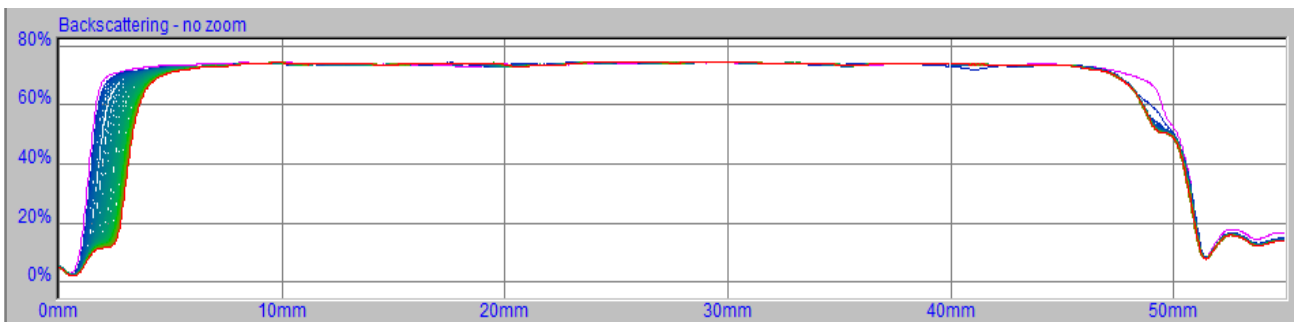


Figura 27. Análise pelo Turbiscan para os experimentos: a) ponto central 1; b) ponto central 2 e c) ponto central 3.

Pode-se observar que os espectros dos pontos centrais são praticamente iguais, indicando uma ótima reprodutibilidade dos experimentos. Nota-se também a formação de zonas clarificadas, devido a processos de flotação e floculação, que caracteriza a instabilidade de tais experimentos.

4.2.2. Planejamento de experimentos com o WPI como estabilizante.

Foram preparadas as emulsões com as diferentes formulações, seguindo os níveis do planejamento de experimentos. A Tabela 14 mostra os resultados em relação a quantidade máxima de emulsão estável formada.

Tabela 14. Resultados do planejamento de experimentos com o WPI como estabilizante.

Experimento	% Óleo	% WPI	DSS (ppm)	IE (%)
1	-	-	-	50
2	+	-	-	88
3	-	+	-	90
4	+	+	-	100
5	-	-	+	56
6	+	-	+	82
7	-	+	+	100
8	+	+	+	100
9	0	0	0	82
10	0	0	0	84
11	0	0	0	82
Desvio padrão dos pontos centrais				1,2

IE: índice de emulsificação, definido na equação 4

Em uma primeira análise, pode-se notar que as emulsões que foram mais estáveis, ou seja, para as quais não foi observada liberação de óleo e/ou não houve separação da fase aquosa, foram aquelas que continham a maior concentração de WPI. Dentre as que tinham menos quantidade de estabilizante, nota-se que a estabilidade não foi aumentada quando adicionado o tensoativo DSS. Outro resultado interessante é que em todas as formulações quando houve um aumento na quantidade de óleo, a estabilidade aumentou. Isso pode ser explicado, pois, quanto maior a quantidade de óleo, menor a velocidade de sedimentação, ocasionando uma redução na possibilidade de haver sedimentação ou flotação (TADROS, 2004).

A partir de uma análise estatística desses resultados, os efeitos de cada variável na estabilidade poderão ser identificados mais facilmente (Tabela 15).

Tabela 15. Efeito das variáveis sobre a estabilidade das emulsões.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	p¹
ao	0,832	0,004	0,000024
(1)% Óleo	0,185	0,008	0,001942
(2)% WPI	0,285	0,008	0,000820
(3)DSS (ppm)	0,025	0,008	0,092159
1 e 2	-0,135	0,008	0,003638
1 e 3	-0,055	0,008	0,021336
2 e 3	0,025	0,008	0,092159

1-Valores com p<0,05 indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Estatisticamente, as variáveis quantidade de óleo e de WPI exercem um efeito positivo na estabilidade das emulsões. Portanto, quando aumentadas essas quantidades, as emulsões formadas serão mais estáveis. Já a presença do tensoativo não acarreta em nenhuma melhoria no resultado, podendo então ser facultativo seu uso. Este mesmo resultado já havia sido observado por Almeida (2012). Pode-se observar também as interações entre as variáveis. Existe um efeito resultante da interação das variáveis quantidade de óleo e WPI na estabilidade e também um resultante da interação entre a quantidade de óleo e a concentração de DSS, ainda que este seja pequeno.

Na Figura 28 abaixo é apresentado o gráfico para análise do modelo para a resposta da estabilidade das emulsões, quando se utiliza a proteína isolada do soro do leite como estabilizante.

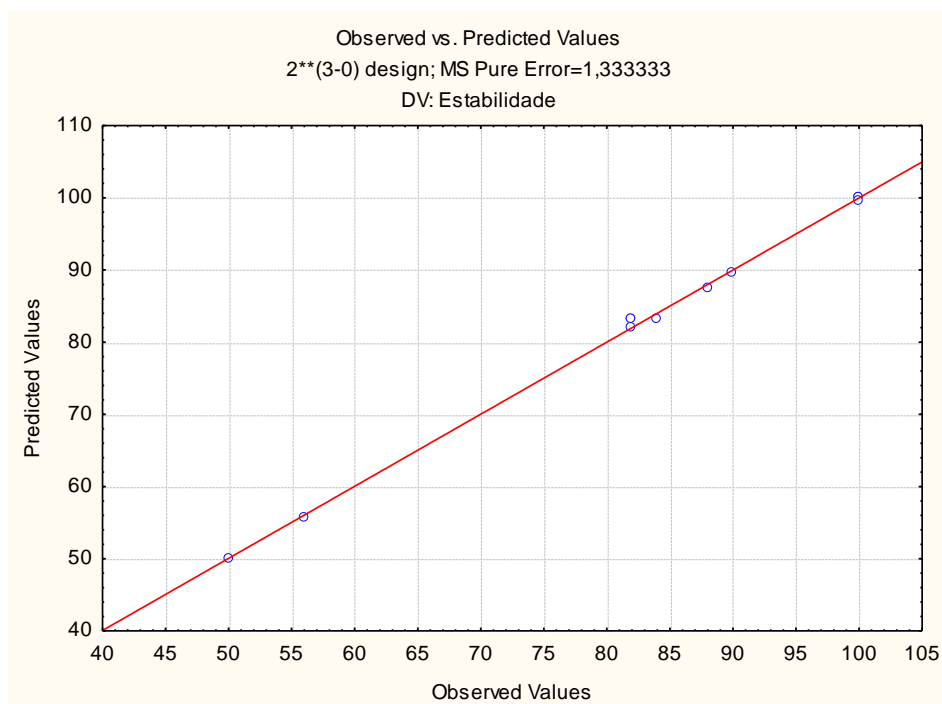


Figura 28. Valores preditos x valores observados para a resposta estabilidade. –

Planejamento WPI

O modelo obtido para a estabilidade das emulsões contendo WPI apresenta pouca discrepância entre os valores observados e os preditos. Deste modo é possível constatar que este modelo é capaz de representar os dados experimentais.

4.2.1.5. Análise da tensão superficial

Primeiro foi medido a tensão superficial da fase oleosa pura, sendo obtido o valor de aproximadamente 27mN/m. Com este resultado pôde-se avaliar melhor as tensões superficiais das emulsões que foram preparadas. A Tabela 16 mostra os resultados em relação tensão superficial das emulsões que foram preparadas segundo o planejamento.

Tabela 16. Resultado da análise da tensão superficial das emulsões.

Experimento	% Óleo	% WPI	DSS (ppm)	Tensão Superficial γ (mN/m)	IE (%)
1	-	-	-	33,4	50
2	+	-	-	36,6	88
3	-	+	-	38,5	90
4	+	+	-	38,7	100
5	-	-	+	34,3	56
6	+	-	+	31,7	82
7	-	+	+	36,7	100
8	+	+	+	39,8	100
9	0	0	0	37,9	82
10	0	0	0	37,7	84
11	0	0	0	37,6	82
Desvio padrão dos pontos centrais				0,1	

Pode-se dizer que todas as emulsões possuem tensão superficial superior à da fase oleosa, o que é esperado já que, de fato, a tensão superficial sentida pelo anel é a da fase aquosa. No entanto, as menos estáveis apresentaram valores de tensão um pouco menores. Essa diminuição pode ser devido a uma pequena liberação de óleo para a superfície, tornando a tensão superficial mais próxima da tensão do óleo, observação esta que também corrobora os resultados de Almeida (2012).

A análise estatística dos dados é apresentada na Tabela 17 abaixo.

Tabela 17. Efeito das variáveis sobre a tensão superficial das emulsões.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	p¹
a ₀	36,63	0,03	1E-06
(1)% Óleo	0,97	0,07	0,00588
(2)% WPI	4,42	0,07	0,00029
(3)DSS (ppm)	-1,17	0,07	0,00405
1 e 2	0,65	0,07	0,01278
1 e 3	-0,74	0,07	0,01013
2 e 3	0,79	0,07	0,0089

1-Valores com p<0,05 indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Para a tensão superficial pode-se observar que todas as variáveis interferem na tensão superficial das emulsões. A variável porcentagem de óleo apresentou um efeito positivo, isso indica que o aumento do teor de óleo resultou em um aumento da tensão superficial da emulsão, ou seja, houve um aumento da estabilidade. O mesmo foi observado em relação a concentração de estabilizante WPI. Para a concentração de DSS

o comportamento observado foi o contrário, ou seja, com um aumento na concentração de tensoativo, houve uma redução na tensão interfacial. Esse resultado era esperado, uma vez que a função do tensoativo é de reduzir a tensão superficial e este concentra-se preferencialmente na fase aquosa. No entanto, esta diminuição não interfere na estabilidade das emulsões. Também pode-se constatar que todas as interações entre as variáveis interferem na tensão superficial.

A análise do modelo obtido para a resposta da tensão superficial é apresentado na figura abaixo. (Figura 29)

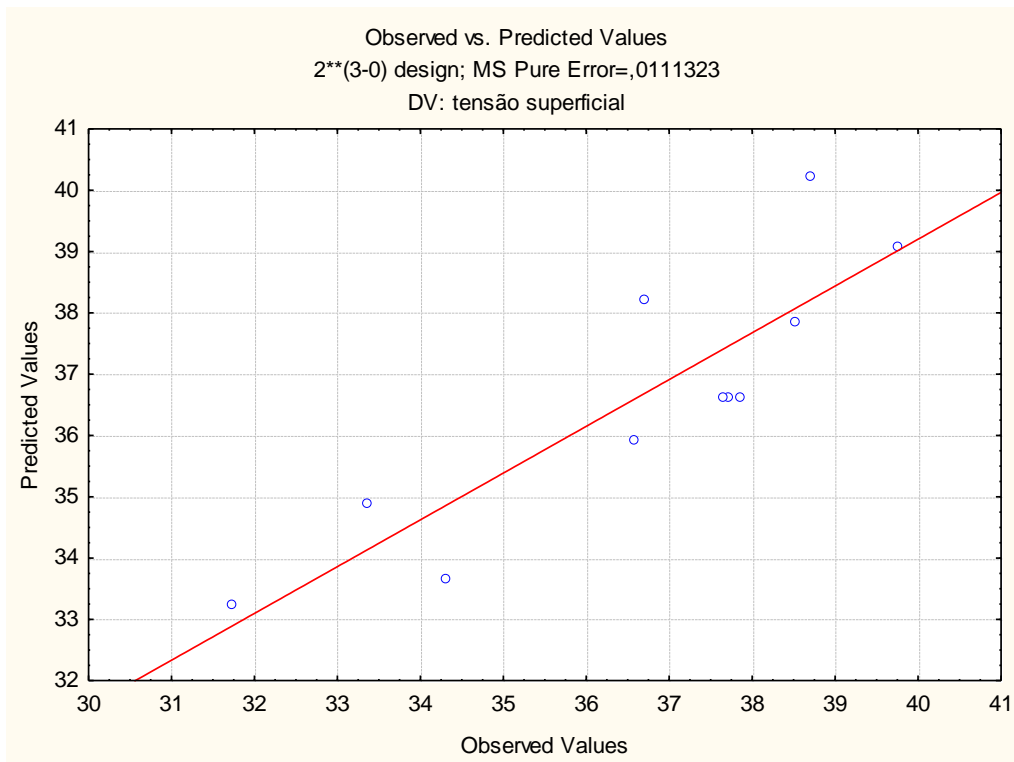


Figura 29. Valores preditos x valores observados para a resposta tensão superficial. – Planejamento WPI

O modelo proposto para a tensão superficial apesar de possuir valores preditos diferentes daqueles observados, essa discrepância não é considerada muito significativa,

pois todos os valores preditos estão bem próximos aos valores observados. Esse modelo, então, consegue descrever os dados experimentais.

4.2.1.6. Análise do potencial zeta.

Os resultados obtidos para a análise do potencial zeta são apresentados na tabela a seguir. (Tabela 18)

Tabela 18. Resultado da análise do potencial zeta das emulsões.

Experimento	% Óleo	% WPI	DSS (ppm)	Potencial ζ (mV)	IE (%)
1	-	-	-	-5	50
2	+	-	-	-14	88
3	-	+	-	-11	90
4	+	+	-	-18	100
5	-	-	+	-3	56
6	+	-	+	-11	82
7	-	+	+	-7	100
8	+	+	+	-13	100
9	0	0	0	-7	82
10	0	0	0	-6	84
11	0	0	0	-7	82
Desvio padrão dos pontos centrais				0,3	

O potencial zeta observado para todas as emulsões foi relativamente baixo. Portanto, mesmo que haja uma interação eletrostática, essa pode ser considerada pequena. Tem-se então que a estabilização é provavelmente devido ao impedimento estérico pela adsorção de WPI na superfície da gota (TAHERIAN, 2011).

A Tabela 19 mostra os resultados da análise estatística do potencial zeta.

Tabela 19. Efeito das variáveis sobre o potencial zeta das emulsões.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	P¹
a ₀	-9,28	0,09	0,00011
(1)% Óleo	-7,49	0,23	0,00091
(2)% WPI	-4,05	0,23	0,0031
(3)DSS			
(ppm)	3,52	0,23	0,0041
1 e 2	0,73	0,23	0,08315
1 e 3	0,10	0,23	0,68828
2 e 3	1,2	0,23	0,03378

1-Valores com p<0,05 indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Pode-se perceber que a quantidade de óleo e de WPI exercem um efeito negativo no potencial zeta. Isso significa que com o aumento destas, o potencial zeta tende a ficar menor, como os potenciais zeta medidos para as emulsões são negativos, torná-los menores corresponde a deixá-los mais negativos. Para efeitos de estabilização, independe a carga do potencial zeta, pois quanto maior o seu módulo, significa que maior será a repulsão eletrostática e mais estável será a emulsão (TAHERIAN, 2011). Essa análise indica que ao aumentar essas variáveis, a estabilização eletrostática será mais eficiente.

A análise do modelo obtido para o potencial zeta é apresentado na Figura 30.

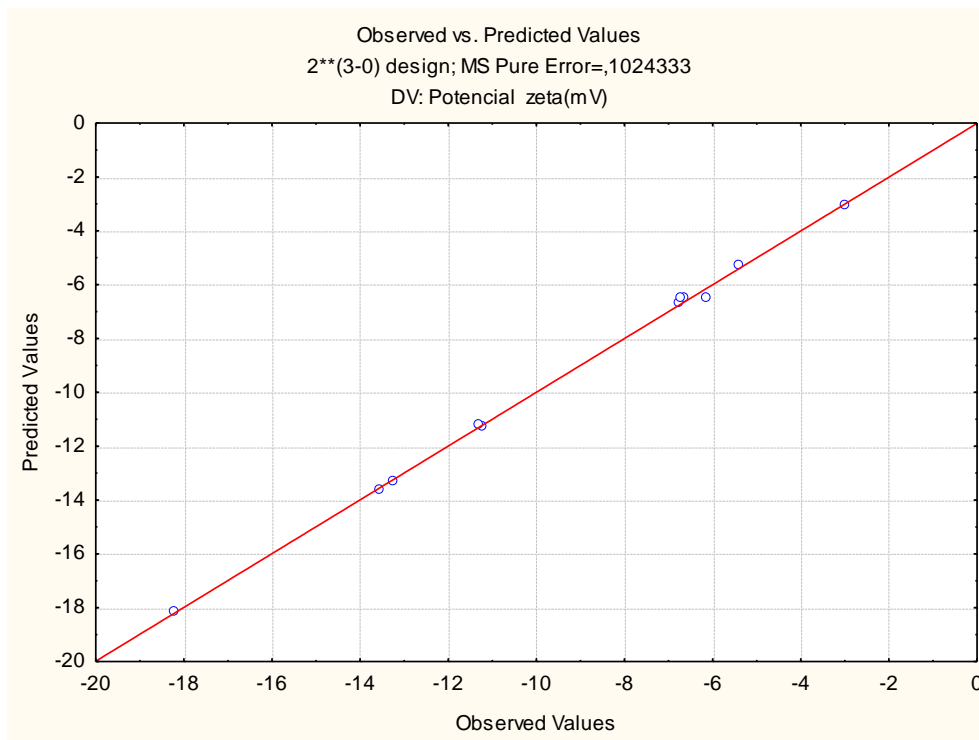


Figura 30. Valores preditos x valores observados para a resposta potencial zeta.

– Planejamento WPI

Pode-se observar que o modelo proposto é capaz de representar os dados experimentais de forma que o erro relativo entre os valores é praticamente nulo.

4.2.1.7. Análise do tamanho de gota

O tamanho de gota foi avaliado através do microscópio ótico. Algumas imagens são mostradas a seguir (Figuras 31, 32, 33).

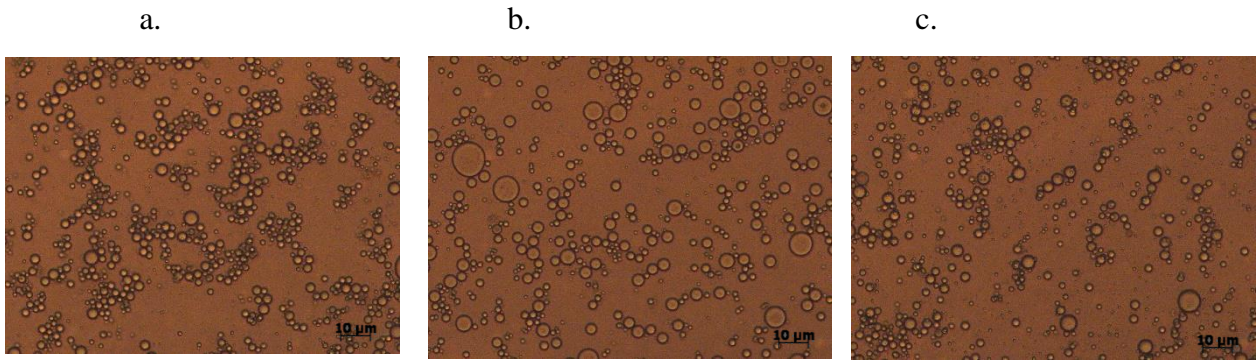


Figura 31. Imagens do tamanho de gota. a) ponto central 1, b) ponto central 2 e c) ponto central 3

A Figura 31 mostra a distribuição de gotas de óleo nas emulsões obtidas nas condições dos pontos centrais 1, 2 e 3. Pode-se notar que a distribuição é bastante semelhante, indicando uma boa reprodutibilidade dos experimentos. Observa-se também, a presença de formação de conglomerados de gotas, indicando o processo de floculação. No entanto este não afeta a estabilidade destas emulsões.

A Figura 32 abaixo mostra algumas imagens de microscopia referente às emulsões mais instáveis.

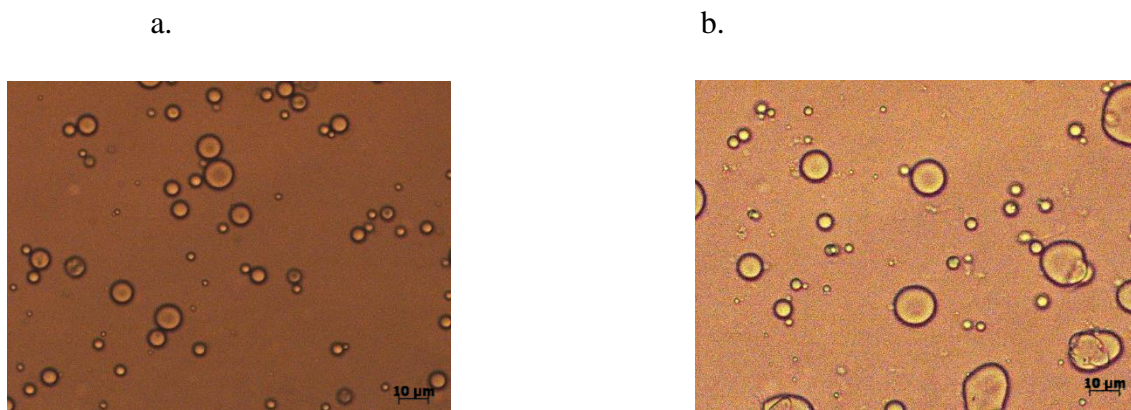


Figura 32. Microscopia ótica das emulsões mais instáveis. a) experimento 1, b) experimento 5.

Para os experimentos 1 e 5 pôde-se perceber no momento da captura das imagens de microscopia ótica, que a fase continua era mais fluida, facilitando assim a movimentação das gotas. Através das imagens, podem ser observados os fenômenos de coalescência e floculação. Estes fenômenos contribuíram para o processo de desestabilização destas emulsões.

A Figura 33 abaixo mostras algumas imagens obtidas de microscopia ótica para as emulsões mais estáveis.

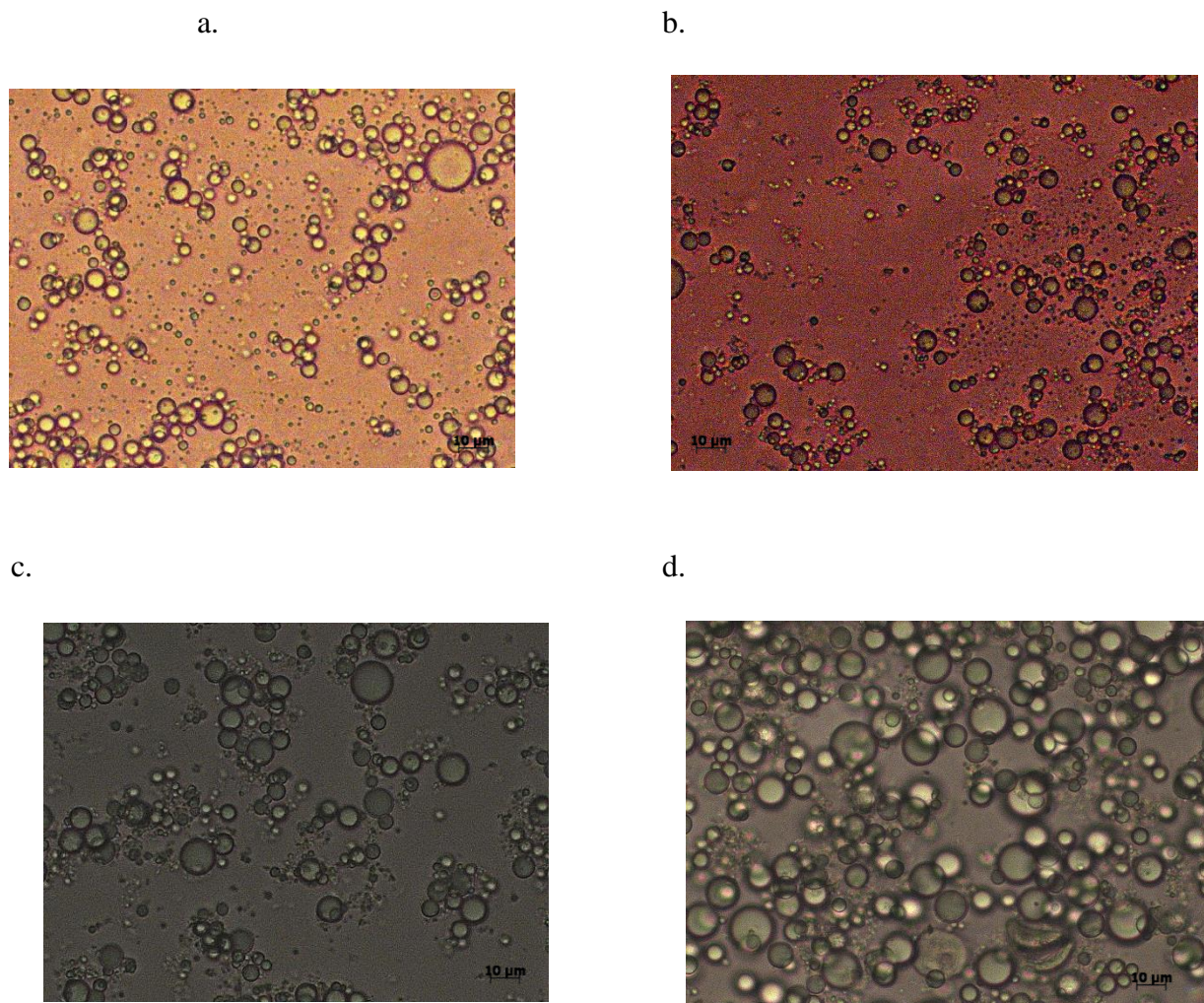


Figura 33. Microscopia ótica das emulsões mais estáveis. a) experimento 3, b) experimento 4, c) experimento 7, d) experimento 8.

Já para as emulsões mais estáveis, pôde-se perceber que o meio contínuo era menos denso que nas emulsões mais instáveis. A partir da análise das imagens, pode-se perceber que em todas as emulsões houve a formação de aglomerados de gotas, que não resultou em uma separação de fases devido à presença do agente de peso na fase dispersa. Essas imagens sugerem que mesmo em emulsões estáveis estão suscetíveis a mecanismos de desestabilização.

A Tabela 20 mostra os resultados obtidos para o tamanho de gota para todas as emulsões do planejamento de experimentos.

Tabela 20. Resultado da análise do tamanho de gota das emulsões.

Experimento	% Óleo	% WPI	DSS (ppm)	Tamanho (μm)
1	-	-	-	15,9
2	+	-	-	15,2
3	-	+	-	15,2
4	+	+	-	6,8
5	-	-	+	6,4
6	+	-	+	14,2
7	-	+	+	8,7
8	+	+	+	13,7
9	0	0	0	10,7
10	0	0	0	12,9
11	0	0	0	13,9
Desvio padrão dos pontos centrais				1,6

Em uma primeira análise, pode-se dizer que o tamanho de gota obtido para as emulsões testadas ficou em torno de $10\mu\text{m}$. Não é possível observar efeitos para que haja

variação no tamanho. A análise estatística dos resultados é mostrada na tabela a seguir (Tabela 21).

Tabela 21. Efeito das variáveis sobre o tamanho de gota.

<i>Intervalo de confiança 95%</i>			
	Efeito	Erro padrão	p¹
a ₀	12,16	0,49	0,00165
(1)% Óleo	0,91	1,16	0,51624
(2)% WPI	-1,82	1,16	0,25748
(3)DSS (ppm)	-2,54	1,16	0,15981
1 e 2	-2,61	1,16	0,15278
1 e 3	5,50	1,16	0,04165
2 e 3	2,71	1,16	0,14396

1-Valores com p<0,05 indicam que a variável é estatisticamente significativa. (Valores destacados)

Pode-se observar que a interação das variáveis proporção de óleo e tensoativo gera um efeito positivo significativo. É importante ressaltar também que o tamanho de gota é muito influenciado pela metodologia de preparo nesse caso, homogeneizador de alta velocidade a 8000 rpm por 15 minutos. Por isso nesta análise não foi possível observar efeitos das variáveis independentes.

Na Figura 34 é apresentada a análise do modelo para esta resposta.

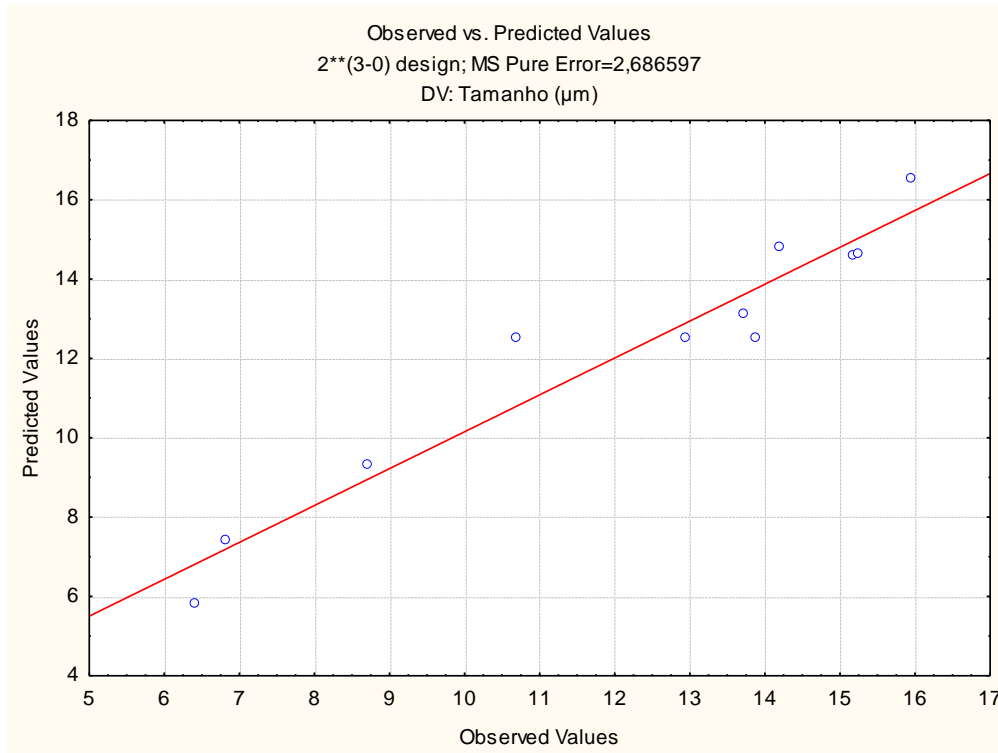


Figura 34. Valores preditos x valores observados para a resposta tamanho de gota. – Planejamento WPI

O modelo proposto para o tamanho de gota é considerado satisfatório, uma vez que os valores preditos diferem daqueles observados, dentro do erro experimental associado.

4.2.1.8. Análise de estabilidade (Turbiscan)

Os resultados referentes análise da estabilidade das emulsões através de suas propriedades óticas são mostrados nas figuras a seguir. (Figuras 35, 37, 38)

Para estas emulsões, a primeira varredura do sistema corresponde a linha em cor rosa e a última (após 24 horas) em cor vermelha. As varreduras intermediárias são representadas em cor azul e verde.

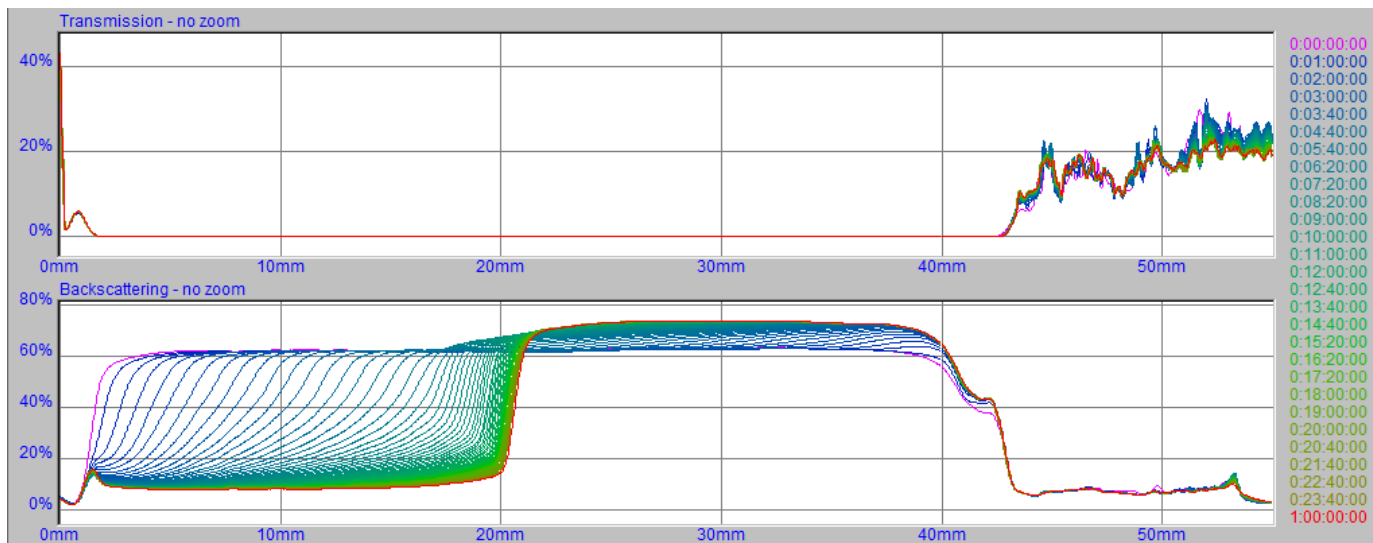


Figura 35. Análise pelo Turbiscan para o experimento 1.

Em uma primeira análise, observa-se que no espectro de transmissão (gráfico na parte superior da figura) não é possível observar variações ao longo da análise. Como as emulsões formadas são turvas, a luz não consegue ser transmitida através delas. Com isso, não serão feitas análises do espectro de transmissão, somente os de espalhamento de luz serão analisados.

Observa-se que ao longo das 24 horas houve uma diminuição no espalhamento de luz até a altura de 20 mm do frasco. Isso quer dizer que a luz passou com mais facilidade pela amostra, indicando a formação de uma zona clarificada. Na Figura 36, pode-se ver a formação desta zona clarificada após 24 horas.

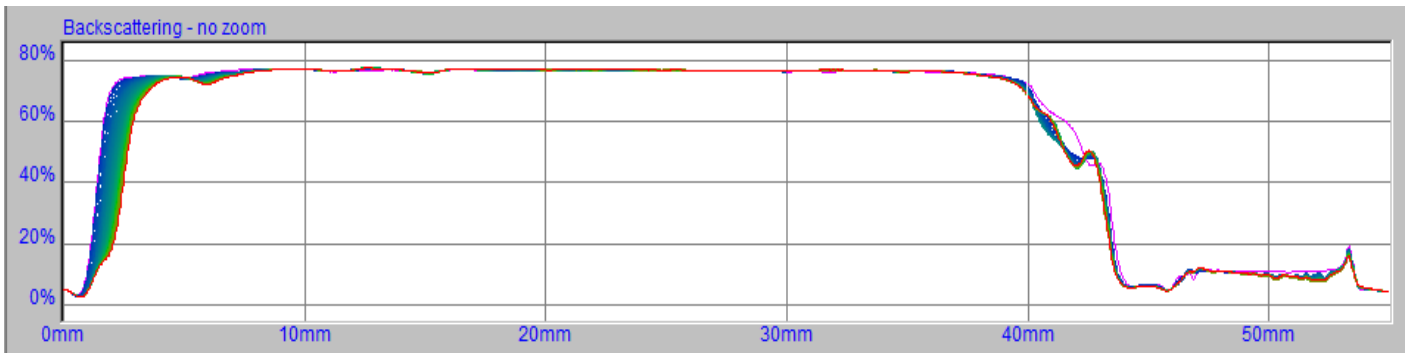


Figura 36. Emulsão 1 após 24 horas.

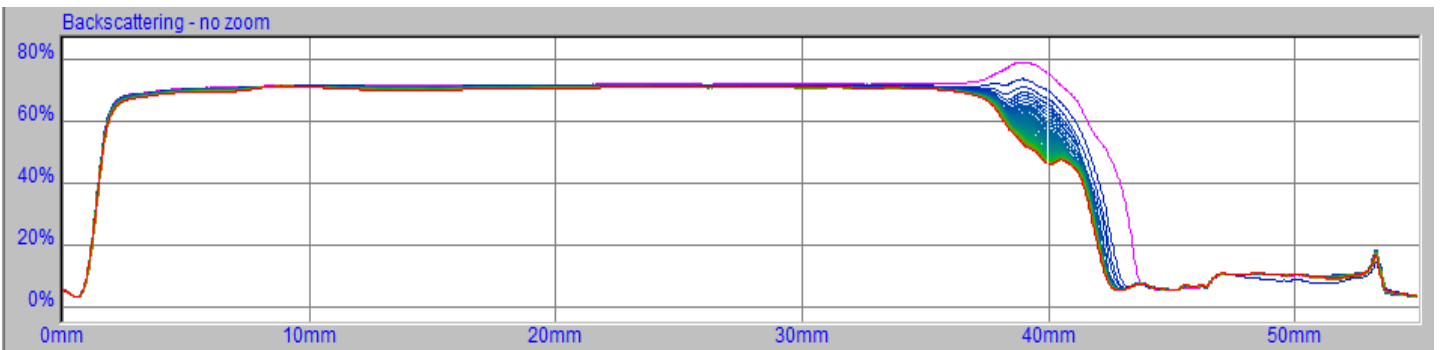
Com as Figuras 35 e 36 acima, pode-se constatar a formação de uma zona clarificada e de uma zona mais concentrada da emulsão. Na Figura 35 isso é representado como um aumento no espalhamento de luz. Esse aumento reflete que houve um aumento no tamanho de gota da emulsão, resultado do processo de floculação. Esse resultado foi confirmado através da análise do tamanho de gota por microscopia ótica, já discutido anteriormente. Houve também a flotação desses flocos para cima do frasco.

Para os outros experimentos a análise será dividida em três blocos. O primeiro para as emulsões mais estáveis (Figura 37), o segundo para as mais instáveis (Figura 30) e por último serão analisados experimentos correspondentes aos pontos centrais do planejamento.

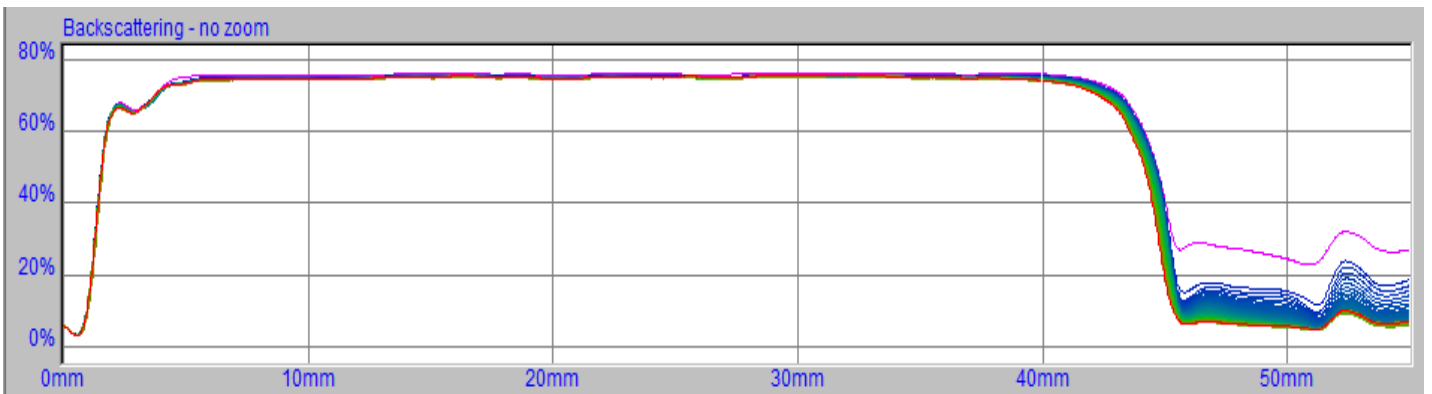
a.



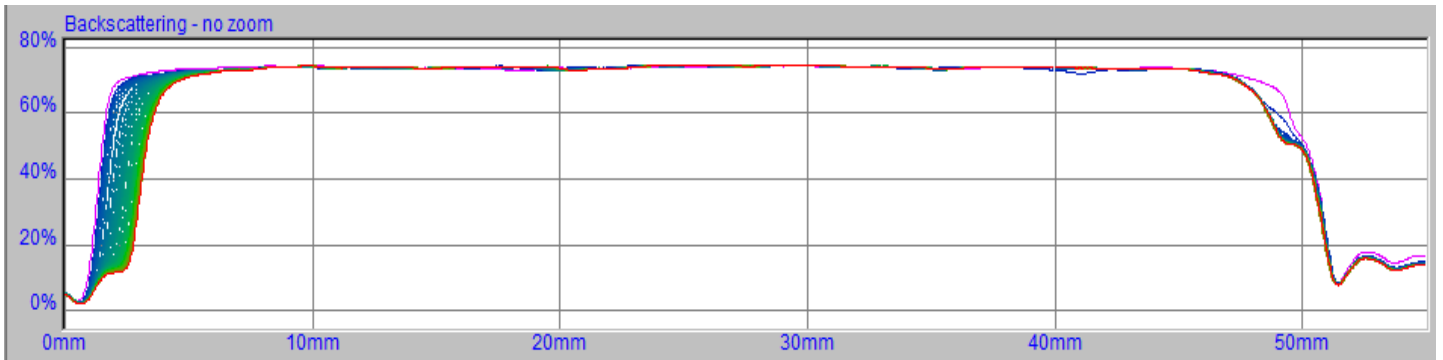
b.



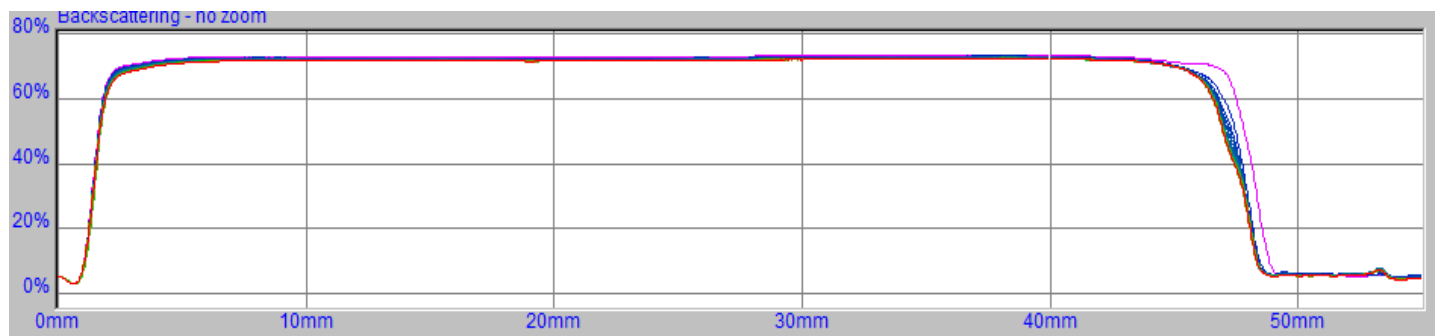
c.



d.



e.



f.

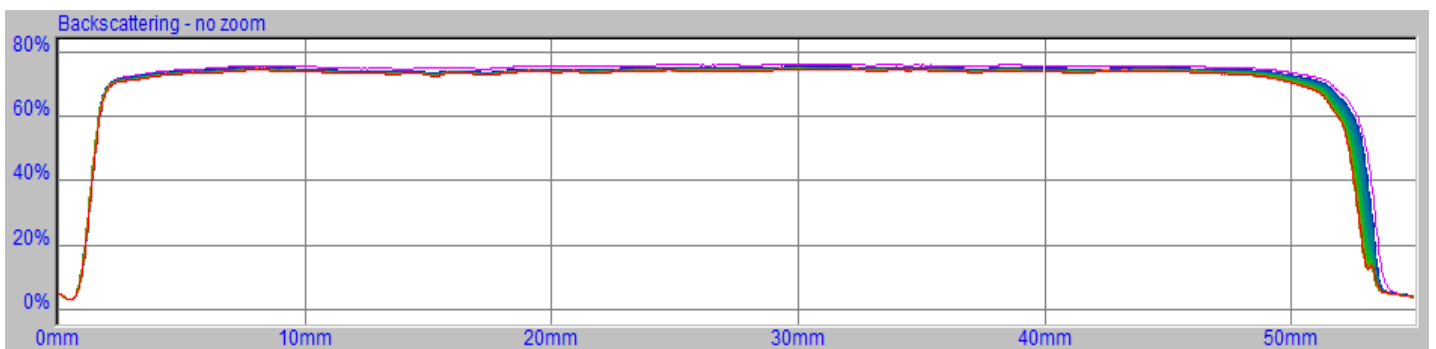


Figura 37. Análise pelo Turbiscan para os experimentos: a) 2; b) 3; c) 4; d) 6; e) 7 e f) 8.

Pode-se observar que para os experimentos 3, 4, 7 e 8 os espectros obtidos permaneceram constantes durante as 24 horas de análise. Não se pode atribuir nenhum

mecanismo de desestabilização. Embora as imagens de microscopia ótica para essas emulsões indiquem a formação de aglomerados de gotas, estes devem ocorrer logo assim que a emulsão é formada e não contribuem para algum processo de desestabilização.

Para os experimentos 2 e 6, observa-se que mesmo eles possuindo estabilidades altas, houve variações no espectro. Pode-se observar uma diminuição no espalhamento de luz, resultante da formação de uma zona clarificada ao fundo do frasco. No entanto essa separação é muito pequena e essas emulsões ainda podem ser consideradas estáveis.

Na Figura 38 é mostrado o espectro para o experimento 5 que, juntamente com o experimento 1, compõe o grupo de emulsões instáveis.

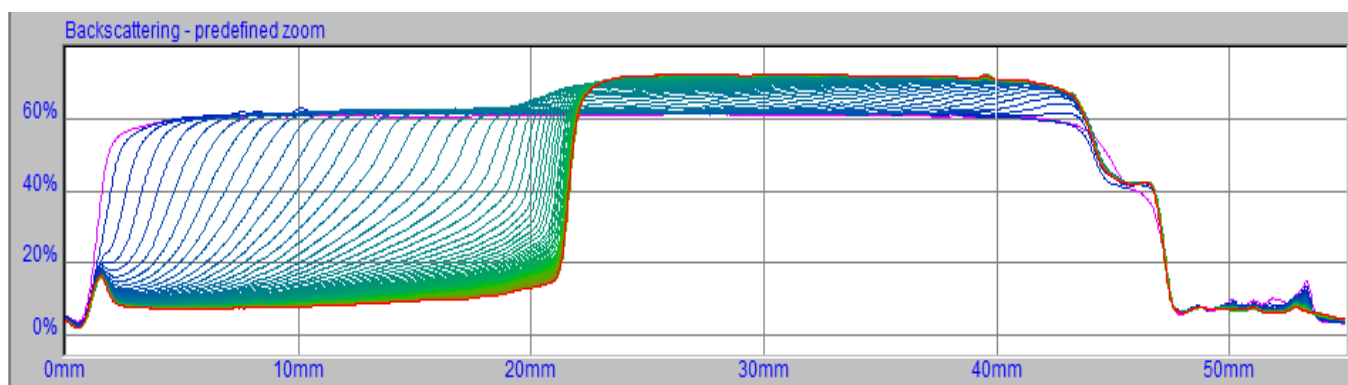


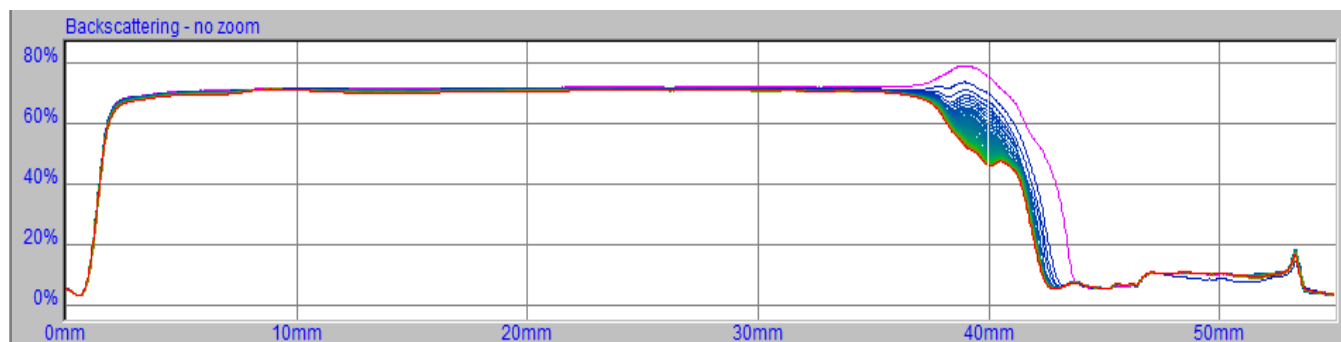
Figura 38 Análise pelo Turbiscan para o experimento 5.

Para o experimento 5 é possível notar um comportamento muito similar ao experimento 1. Também ocorre a formação de uma zona clarificada (diminuição na intensidade do espalhamento), seguida de uma flotação de gotas maiores para a superfície (aumento na intensidade do espalhamento a partir da altura de 20 mm no frasco). Essa semelhança nos espectros e nas imagens de microscopia ótica sugerem que

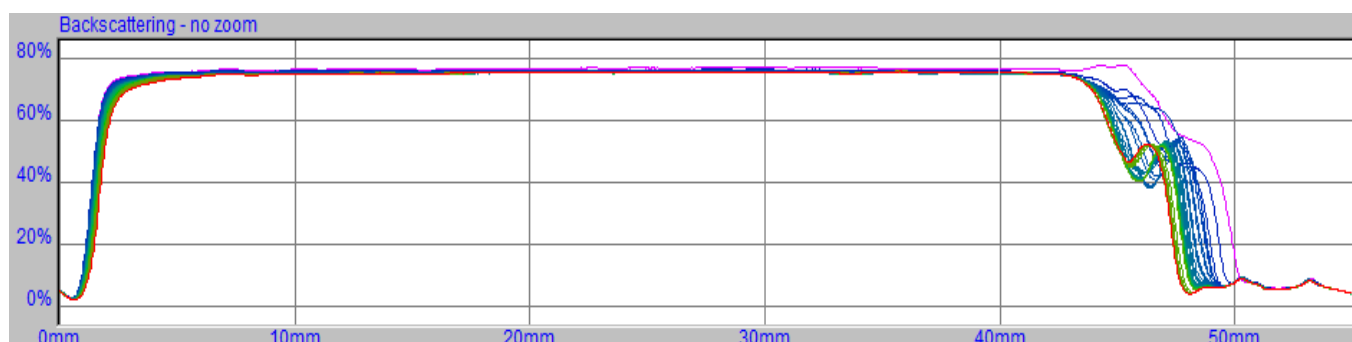
essas emulsões sofrem os mesmos mecanismos de desestabilização, e estes ocorrem desde a formação da emulsão até que um certo equilíbrio seja atingido.

A Figura 39 mostra os espectros referentes às emulsões obtidas nos pontos centrais do planejamento experimental.

a.



b.



c.

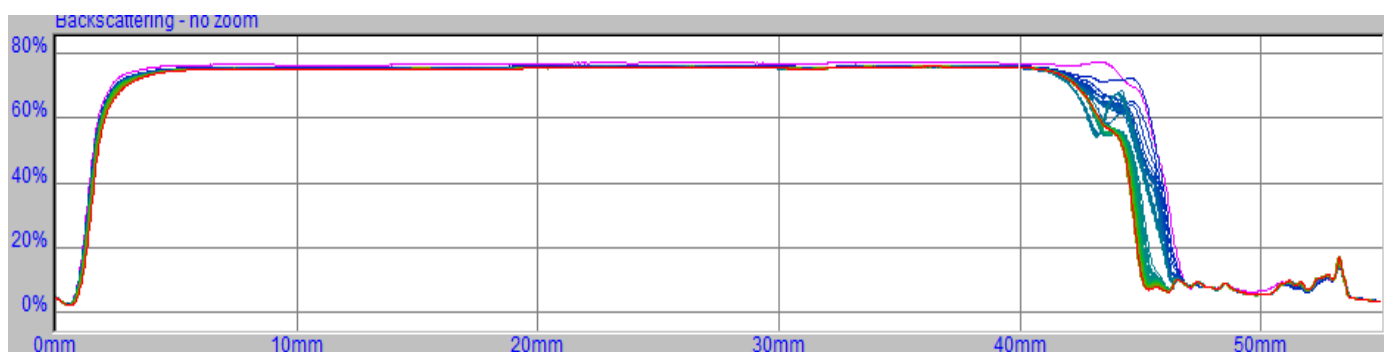


Figura 39. Análise pelo Turbiscan para os experimentos: a) ponto central 1; b) ponto central 2; c) ponto central 3.

Pode-se observar que os espectros dos pontos centrais são praticamente iguais, indicando uma ótima reprodutibilidade dos experimentos, e que eles permaneceram constantes durante as 24 horas de análise. As emulsões formadas com essas formulações apresentaram alta estabilidade, por isso não são percebidas grandes variações nos espectros.

4.3. Encapsulamento de nutrientes

4.3.1. Estabilidade

A próxima etapa deste trabalho consistiu no encapsulamento dos nutrientes β -caroteno e α -tocoferol nas emulsões. A partir dos resultados apresentados acima, foi escolhida a melhor composição, dentre as que continha o *whey protein* como estabilizante, para estudar o encapsulamento. Também foi feita uma comparação desta formulação, que não continha tensoativo, com uma formulação com DSS.

Como a concentração do encapsulado não deve ser muito elevada, pois isso pode acarretar uma desestabilização da emulsão, a concentração para ambos os nutrientes foi igual a 0,5% (m/v). As Tabelas 22 e 23 apresentam os resultados do índice de emulsificação na presença dos nutrientes β -caroteno e α -tocoferol, respectivamente.

Tabela 22. Resposta do encapsulamento do β -caroteno.

Experimento	% Óleo	% WPI	DSS (ppm)	Potencial ζ (mV)	Tensão Superficial γ (mN/m)	IE (%)
1	60	15	0	-60	47	100
2	60	15	100	-53	45	100
Desvio padrão da triplicata				2	1	

Tabela 23. Resposta do encapsulamento do α -tocoferol

Percebe-se que a adição de nutrientes não resultou em qualquer instabilidade para os sistemas. Os valores de tensão superficial continuaram elevados, indicando que não houve liberação de óleo. Já o potencial zeta apresentou magnitude mais elevada em relação aquelas emulsões que não contêm β -caroteno ou α -tocoferol. Uma hipótese para tal é que as moléculas dos nutrientes provavelmente estão interagindo com as moléculas de proteínas presentes na superfície das gotas. Esta interação faz com que o módulo do potencial zeta aumente, e este ajuda a conferir uma estabilidade adicional através das

Experimento	% Óleo	% WPI	DSS (ppm)	Potencial ζ (mV)	Tensão Superficial γ (mN/m)	IE (%)
3	60	15	0	-61	49	100
4	60	15	100	-58	46	100
Desvio padrão da triplicata				2	1,2	

repulsões eletrostáticas. Nota-se também que a presença de tensoativo não resulta em grandes mudanças nas propriedades físico-químicas, podendo seu uso ser facultado.

4.3.2. Quantidade encapsulada

Para avaliar a quantidade encapsulada ao fim do preparo da emulsão e a estabilidade do nutriente, primeiro fez-se as curvas de absorção e calibração, nos respectivos comprimentos de onda, para os nutrientes. Esses gráficos são apresentados no anexo 1.

As quantidades encapsuladas nas emulsões são apresentadas na tabela a seguir (Tabela 24)

Tabela 24. Quantidade de nutriente encapsulado.

Quantidade encapsulada			
α-tocoferol		β-caroteno	
1	95,8%	3	94,6%
2	96,4%	4	96,0%
Desvio padrão das triplicatas		1,5	1,7

As quantidades encapsuladas em todas as emulsões foram bastante elevadas. Levando-se em consideração as possíveis perdas em decorrência de erros experimentais, pode-se dizer que houve um encapsulamento total dos nutrientes. Nota-se também que a presença de DSS não resultou em uma quantidade encapsulada maior. A estabilidade do nutriente foi constatada pois após 10 dias de encapsulados, não foi observada variação significativa na quantidade de nutriente encapsulado. Pode-se dizer, então, que o estabilizante foi capaz de proteger as propriedades químicas dos nutrientes.

Capítulo V

Conclusões

5.1. Conclusão

O estudo das propriedades físico-químicas e dos fenômenos de superfície presentes nas emulsões são essenciais para avaliar a estabilidade destas emulsões e consequentemente a qualidade final do produto.

Com as análises das isotermas de compressão para os agentes emulsionantes pôde-se constatar que a goma arábica está passível de sofrer degradação em sua composição. E que a proteína isolada do soro do leite pode ser considerada um bom estabilizante para emulsões uma vez que esta forma um filme elástico junto à superfície e é capaz de acompanhar as deformações da gota. No caso do tensoativo DSS, apesar deste também formar um filme elástico, neste trabalho constata-se que seu uso é dispensável, pois sua adição não acarreta em melhoria significativa na estabilidade das emulsões.

As respostas obtidas através do planejamento de experimentos revelaram que A proteína isolado do soro de leite é capaz de formar emulsões com estabilidades elevadas quando comparadas àquelas com goma arábica. Na análise da tensão superficial, foi possível observar que quanto mais instável uma emulsão é, menor será sua tensão superficial.

O potencial zeta, apesar de ser uma resposta útil para caracterização dos efeitos eletrostáticos no sistema, não se mostrou uma resposta sensível para traduzir a estabilidade de todas as emulsões contendo goma arábica. Já para as emulsões contendo a proteína isolada do soro do leite os potenciais obtidos são considerados baixos. Isso

sugere que os efeitos eletrostáticos para a estabilização destas emulsões podem ser considerados pequenos.

Na análise do tamanho de gota observado nas emulsões contendo goma arábica pôde-se constatar que um aumento na concentração das variáveis estudadas ocorre uma diminuição no tamanho de gota. Já para as emulsões contendo WPI, nenhuma variação no tamanho de gota foi estatisticamente significativas.

A análise de turbidez das emulsões, através do equipamento Turbiscan, é considerada uma excelente ferramenta para o estudo da estabilidade de emulsões, uma vez que é capaz de retratar a evolução do processo de desestabilização, que neste estudo foram os de floculação e flotação, principalmente.

Em relação os modelos propostos para cada resposta em cada planejamento de experimentos, conclui-se que devido degradação da goma arábica, o que acarreta em emulsões mais instáveis, praticamente todos os modelos foram considerados insatisfatórios para descrever os dados experimentais, exceto para a modelo do tamanho de gota. Já para o planejamento cujo emulsões continham a proteína isolada do soro do leite todos os modelos propostos foram capazes de predizer os dados experimentais.

Para o encapsulamento de nutrientes, notou-se que o processo de encapsulamento por emulsão é bastante promissor, uma vez que foram obtidas emulsões altamente estáveis e a estabilidade química dos nutrientes foi mantida durante o período de tempo em estudo.

5.2. Sugestões

Como sugestões para trabalhos futuros propõem-se:

- ✓ Estender esse estudo com outros tipos de óleos essenciais, para avaliar o efeito desses na estabilidade;
- ✓ Testar o uso antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos;
- ✓ Avaliar o encapsulamento de outros nutrientes, assim como sua quantificação;
- ✓ Desenvolver um método para análise para quantificar a quantidade de nutriente que possa ser liberada com o decorrer do tempo;
- ✓ Realizar análises sensoriais.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

ABIR, 2011. *Relatório ABIR - Consumo de todas as bebidas comerciais 2005-2010*

ADAMSON, A., 1976. *Physical Chemistry of Surfaces*. New York: Wiley & Sons.

ALMEIDA, T. C., 2012, *Avaliação da Estabilidade de Emulsões Concentradas em Bebidas*, Dissertação MSc., UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro, Brasil.

ANDERSON, D.M.W. *et al*, 1985. “The amino acid composition of the proteinaceous of Acacia senegal gum”. *Carbohydr Res*, 2,104-114.

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

BLIJDENSTEIN, T. B.J. *et al*, 2013. “On the link between surface rheology and foam disproportionation in mixed hydrophobic HFBII and whey protein systems”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 438, 13-20.

BOUYER, E. *et al*, 2012. “Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field”, *International Journal of Pharmaceutics*, 436, 359– 378.

BYRD, S. J., 2001. *SAIB - the oldest new ingredient for the beverage Market*. Kingsport: Eastman Chemical Company.

DICKINSON, E., 1992. *An Introduction to Food Colloids*. Oxford: Oxford Science Publishers.

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

DONSI *et al*, 2011. “Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods”. *Food Science and Technology*, 44, 1908-1914.

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

FRANÇA, B. B., 2013. *Levantamento Experimental e Modelagem Termodinâmica do Equilíbrio Líquido-Líquido na Produção de Biodiesel de Soja*, Tese DSc., UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro, Brasil.

FRIBERG, S., LARSSON, K., & SJOBLÖM, J., 2004. *Food Emulsions*. New York: Marcel Dekker.

GLICKSMAN, M. 1983. “Gum arabic”. *Food hydrocolloids*. CRC Press, 7-30.

HATANAKA *et al*, 2010. “Physicochemical and pharmacological characterization of α -tocopherol-loaded nano-emulsion system”. *International Journal of Pharmaceutics*, 396, 188-193.

HOU, Z. *et al*, 2014. “Investigation into the in vitro release properties of β -carotene in emulsions stabilized by different emulsifiers”. *Food Science and Technology*, 59, 867-873.

JAYME M.L. *et al*, 1999. “Zeta potential of gum arabic stabilized oil-in-water emulsions”. *Food hydrocolloids*, 13, 459-465.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F., 2013. “Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales”, *Nutrición Hospitalaria*, 28, 1413-1421.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F., 2013. “Potencial applicatons of multiple emulsions in the developmet of healthy and functional foods”, *Food Research International*, 52, 64-74.

KIM, H.J. *et al*, 2002. “Role of postadsorption conformation changes of beta-lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH”. *Langmuir* 18, 7577–7583.

LIANG *et al*, 2013. “Stability and Bioaccessibility of β Carotene in Nanoemulsions”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1249-1257.

- MATSUMIYA, K. *et al.*, 2014. “Evaluation of long-term stability of milk beverages by a novel method for rapid determination of aggregation forces between colloidal particles”, *Food hydrocolloids*, 34, 177-183.
- MCCLEMENTS, D.J., 2011. “Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance”, *The Royal Society of Chemistry*, 7,2297-2316.
- MCCLEMENTS, D., 2007. “Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 611–649.
- MCCLEMENTS, D., 1999. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. Boca Raton: CRC Press.
- MULLER, R.H. *et al.*, 2011. “State of the art of nanocrystals-special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78,1-9.
- MUSCHIOLIK, G., 2007. “Multiple emulsions for food use”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*,12,.213-220.
- PAN, L.G. *et al*, 2004. “Oil-in-Water Emulsions Formulated with Sunflower Lecithins: Vesicle Formation and Stability”, *JAACS* 81, 241–244.
- PHILLIPS, G. O. *et al*, 1995.” Interaction of hydrocolloids in food systems”. *Ingredient interactions: Effect on food quality*, 131-170.
- PIORKOWSKI, D. T, McCLEMENTS, D. J., 2013. “Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications”. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- MENGUAL, O. *et al*, 1999. “TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis”, *Talanta*, 50, 445–456.
- MIRHOSSEIN, H., PING TAN, C., HAMIDB, N., & YUSOF, S., 2008. “Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential”. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* , 315, 47–56.

MIRHOSSEIN, H., PING TAN, C., HAMIDB, N., & YUSOF, S., 2007. “Modeling the Relationship between the Main Emulsion Components and Stability, Viscosity, Fluid Behavior, zeta Potential, and Electrophoretic Mobility of Orange Beverage Emulsion Using Response Surface Methodology”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 55, 7659-7666.

MYERS, D., 1999. *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications* (2^a Edição). John Wiley & Sons, Inc.

PETTY, M., 1996. *Langmuir Blodgett films: An Introduction*. Durham: Cambridge University Press.

ROBERTS, G., 1990. *Langmuir-Blodgett Films*. New York: Plenum Press.

SHAW, D., 1980. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. London: Butterworth & Co.

SOLEIMANPOUR, M. *et al*, 2013. “Influence of main emulsion components on the physical properties of corn oil in water emulsion: Effect of oil volume fraction, whey protein concentrate and Lepidium perfoliatum seed gum”. *Food Research International*, 30, 292-301.

TADROS, T., 2004. “Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions”. *Advances in Colloid and Interface Science* , 227-258.

TADROS, T., 2009. *Emulsion Science and Technology*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.

TAHERIAN *et al*, 2011. “Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion”. *Food Hydrocolloids*, 25, 868-878.

TRENTIN, A., *et al*, 2011. “Protein-stabilized emulsions containing beta-carotene produced by premix membrane emulsification”, *Journal of Food Engineering*, 106, 267–274.

WALSTRA, P., 2003. *Physical Chemistry of Foods*. New York: Marcel.

YANG, D. *et al*, 2015. “Effects of flavonoid glycosides obtained from a Ginkgo biloba extract fraction on the physical and oxidative stabilities of oil-in-water emulsions prepared from a stripped structured lipid with a low omega-6 to omega-3 ratio”, *Food Chemistry*, 174, 124–131.

YANG, D. *et al*, 2013. “Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactante”. *Food Hydrocolloids*, 174, 124-131.

YUAN, F. *et al*, 2014. “Influence of whey protein–beet pectin conjugate on the properties and digestibility of b-carotene emulsion during in vitro digestion”, *Food Chemistry*, 156, 374–379.

YUAN, Y., *et al*, 2008. “Characterization and stability evaluation of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions”, *Food Research International*, 41, 61–68.

ANEXO 1

Curvas de Calibração

