



ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES CONCENTRADAS DE ÓLEO DE LARANJA COM ISOLADO PROTEICO DE ERVILHA

Thiago Monteiro Machado

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.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz
Márcio Nele de Souza

Rio de Janeiro
Setembro de 2019

ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES CONCENTRADAS DE ÓLEO DE LARANJA COM
ISOLADO PROTEICO DE ERVILHA

Thiago Monteiro Machado

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.

Prof^a. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, D.Sc.

Prof^a. Luciana Spinelli Ferreira, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
SETEMBRO DE 2019

Machado, Thiago Monteiro

Estabilização de emulsões concentradas de óleo de laranja com isolado proteico de ervilha / Thiago Monteiro Machado. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XXVII, 135 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Márcio Nele de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ COPPE/Programa de Engenharia Química, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 111-118.

1. Emulsões concentradas. 2. Isolado proteico de ervilha 3. Óleo de Laranja. 4. Reologia. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*“Quando eu era jovem, tinha liberdade mas não a via.
Tinha tempo, mas não sabia. E tinha amor, mas não o sentia.
Muitas décadas passariam até que compreendesse o seu significado.
E agora, no crepúsculo da minha vida,
esta compreensão transformou-se em contentamento.
Amor, liberdade e tempo... outrora tão descartáveis,
são o combustível que me conduz para a frente.”*

(Ezio Auditore)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me dar a força necessária para cumprir esse desafio e por colocar pessoas incríveis no meu caminho.

Aos meus pais, Ana Beatriz e Sérgio Augusto, por sempre fazerem tudo ao seu alcance para me dar as melhores condições possíveis de trilhar meu caminho. Por todo o amor, suporte e apoio incondicionais necessários para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis. Vocês são os maiores exemplos que eu poderia ter.

À minha irmã Larissa e meu cunhado James, por todo o carinho e por mesmo de longe estarem sempre me motivando e desejando o melhor para mim.

A todos meus familiares, por sempre torcerem pelo meu sucesso. Em especial aos primos Livia e Henrique, tia Flávia e primo Jone, por todo o apoio e companhia durante essa passagem pelo Rio de Janeiro.

Aos meus orientadores, Helen e Márcio pela disponibilidade, paciência e generosidade, pelas palavras de incentivo ou tirando as dúvidas sempre que necessário durante esse projeto.

Aos companheiros do LABEFIT, em especial ao João, à Lys e ao Eduardo por se colocarem à disposição de me ensinar a mexer nos equipamentos e me ajudarem com as análises sempre que necessário.

Aos colegas do LADEQ, Alessandro, Ângela, Gizele, Gustavo e Thamyres, por todo o auxílio dado para que as análises realizadas durante todo o trabalho fossem possíveis.

Aos amigos de BH, pelos momentos de respiro proporcionados por nossos encontros repletos de piadas (“Não existe piada ruim, ruim é não fazer piadas”). Aos amigos do LECC pelos momentos de descontração durante os almoços. Aos amigos que dividiram todos esses momentos de PEQ, e tornaram a caminhada mais leve. Aos amigos Ana Carolina e Mateus, pelo companheirismo desde os tempos de Unb, com muitos desabafos, conversas e risadas.

Aos professores do Programa de Engenharia Química/PEQ da COPPE por todo o conhecimento adquirido e à CAPES pelo apoio financeiro.

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

ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES CONCENTRADAS DE ÓLEO DE LARANJA COM ISOLADO PROTEICO DE ERVILHA

Thiago Monteiro Machado

Setembro/2019

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Márcio Nele de Souza

Programa: Engenharia Química

O estudo de emulsões (O/A) concentradas para bebidas, correlacionando estabilidade com propriedades físico-químicas, é de suma importância para reduzir o caráter empírico predominante na indústria. O objetivo dessa pesquisa é o estudo de diversas formulações de emulsões, testando dois agentes emulsificantes de origem vegetal, o isolado proteico de ervilha (PPI) e a nanocelulose, relacionando suas propriedades com a estabilidade alcançada, assim como realizar o encapsulamento de um nutriente (α -tocoferol), tornando o produto uma bebida funcional. A nanocelulose não apresentou boas características emulsificantes e foi posteriormente descartada do estudo. Foram realizadas análises de formação de filmes interfaciais, tensão superficial e interfacial, potencial eletrocinético, diâmetro de gotas, propriedades reológicas e reologia interfacial. Elaborou-se um planejamento de experimentos fatorial completo do tipo 2^3+3 pontos centrais no qual se variaram a concentração de PPI na emulsão (5% a 10%), a fração de óleo de laranja na emulsão (20% a 40%) e o pH do sistema (2,5 a 7). Foram obtidas emulsões estáveis por mais de 60 dias com níveis altos de proteína e de óleo. Foi observada formação de uma microestrutura com propriedades viscoelásticas em emulsões com alta viscosidade e uma alta correlação da estabilidade com o valor absoluto de potencial zeta das emulsões. O encapsulamento do nutriente foi alcançado com sucesso (>95%), sem alterar a estabilidade da emulsão.

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

ESTABILIZATION OF A CONCENTRATE SWEET ORANGE OIL BEVERAGE
EMULSION WITH PEA PROTEIN ISOLATE.

Thiago Monteiro Machado

September/2019

Advisors: Helen Conceição Ferraz
Márcio Nele de Souza

Department: Chemical Engineering

The study of concentrated beverage emulsions (O/W) correlating their stability with their physicochemical properties is of great importance to reduce the empiric aspect that runs in the industry. The aim of this study is to evaluate several emulsion formulations analyzing two natural emulsifying agents, a pea protein isolate (PPI) and a nanocelulose, relating their properties with the achieved stabilities, as well as to perform the encapsulation of a vitamin (α -tocopherol), making the product a functional beverage. The nanocelulose showed poor emulsifying properties, being discarded later on the project. Analyses of interfacial film formation, surface and interfacial tension, electrokinetic potential, droplets diameter, rheological bulk properties and interfacial rheology were performed. A 2^3 full factorial design with 3 central points was carried out, in which the concentration of PPI in the emulsion (5% to 10%), the concentration of orange oil in the emulsion (20% to 40%) and the pH of the system (2.5 to 7) were varied. Emulsions with stability superior to 60 days were obtained with high levels of protein and oil. It was observed the formation of a viscoelastic tridimensional network in high viscosity emulsions and a high correlation between the stability and the zeta potential module. The encapsulation was successfully performed (>95%), without loss of the emulsion stability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Introdução.....	1
1.2	Objetivos.....	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Emulsões	4
2.1.1	Formação de Emulsões	5
2.1.2	Emulsões de Bebidas.....	13
2.2	Agentes Emulsificantes.....	15
2.2.1	Goma Arábica	15
2.2.2	Nanocelulose	16
2.2.3	Isolado Proteico de Ervilha.....	20
2.3	Estabilidade e Mecanismos de Desestabilização de Emulsões.....	24
2.3.1	Separação Gravitacional: Cremeação e Sedimentação	25
2.3.2	Floculação.....	27
2.3.3	Coalescência	27
2.3.4	Amadurecimento de Ostwald	28
2.3.5	Estabilidade Química	29
2.4	Encapsulamento	30
2.5	Propriedades que afetam a estabilidade das emulsões	32
2.5.1	Tensão Superficial e Ângulo de Contato	32
2.5.2	Natureza do filme estabilizando a interface	35
2.5.3	Tamanhos de Gotas.....	37
2.5.4	Potencial Zeta	39
2.5.5	Índice de Estabilidade	41
2.5.6	Reologia.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49

3.1 Materiais	49
3.2 Caracterização da nanocelulose	50
3.2.1 Potencial Zeta	50
3.2.2 Difração de Raios-X (DRX)	50
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	51
3.2.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	51
3.2.5 Tensão Superficial e Ângulo de Contato	52
3.3 Caracterização do Óleo de Laranja.....	52
3.4 Caracterização do Isolado Proteico de Ervilha	52
3.4.1 Isoterma de Compressão	53
3.4.2 Razão Vn/Lg	53
3.4.3 Tensão Interfacial PPI-Óleo	54
3.5 Emulsões Testes	54
3.6 Planejamento Experimental	55
3.7 Preparo das Emulsões.....	56
3.7.1 Fases aquosas.....	56
3.7.2 Fase oleosa	57
3.7.3 Formação da emulsão.....	57
3.8 Caracterização das Emulsões.....	58
3.8.1 Índice de estabilidade.....	58
3.8.2 Tensão Superficial	58
3.8.3 Diâmetro de gotas.....	59
3.8.4 Potencial zeta.....	59
3.8.5 Reologia.....	59
3.9 Reologia Dilatacional Interfacial	60
3.10 Encapsulamento de Vitamina E	61
3.10.1 Preparo	61
3.10.2 Quantificação de compostos encapsulados	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	63

4.1 Nanocelulose	63
4.1.1 Potencial Zeta	63
4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	64
4.1.3 Difração de Raios-X (DRX)	66
4.1.4 Tensão superficial	67
4.1.5 Ângulo de Contato	68
4.1.6 Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	69
4.1.7 Emulsões Teste	70
4.2 Caracterização do Isolado Proteico de Ervilha e Mucilagens	71
4.2.1 Razão Vn/Lg	71
4.2.2 Isoterma de Compressão	73
4.3 Tensão Superficial e Interfacial do Óleo de Laranja	75
4.3.1 Tensão superficial	75
4.3.2 Tensão interfacial do óleo com a água.....	75
4.3.3 Tensão interfacial do óleo com as mucilagens	75
4.4 Caracterização das Mucilagens	76
4.5 Resultados do Planejamento de Experimentos	79
4.5.1 Estabilidade	81
4.5.2 Tensão Superficial	85
4.5.3 Potencial Zeta	86
4.5.4 Diâmetro de gotas	89
4.5.5 Reologia.....	93
4.5 Reologia Interfacial	102
4.6 Aditivos	103
4.7 Encapsulamento de α -tocoferol.....	105
4.7.1 Estabilidade	105
4.7.1 Quantidade encapsulada	106
4.8 Considerações Finais.....	106

5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	109
5.1	Conclusões.....	109
5.2	Sugestões para trabalhos futuros	109
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
	ANEXO A – Técnicas de Caracterização	119
	ANEXO B – Imagens das Emulsões.....	123
	ANEXO C – Histogramas dos diâmetros de gotas das emulsões	126
	ANEXO D – Matriz Correlação.....	130
	ANEXO E – Gráficos dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular 131	
	ANEXO F – Curva de calibração do encapsulamento.....	135

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1 – Tipos de emulsões: (a) O/A; (b) A/O; (c) A₂/O/A₁; (d) O₂/A/O₁.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2.2 – Tipos de emulsificantes tensoativos em interfaces (Adaptado de MCCLEMENTS, 2016).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2.3 – Estrutura da celulose (NASCIMENTO et al., 2014)</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2.4 – Estrutura das proteínas: (a) vicilina de pinho coreano; (b) prolegumina de ervilha (JIN; WANG; ZHANG, 2013; TANDANG-SILVAS et al., 2009)</i>	<i>22</i>
<i>Figura 2.5 – Principais mecanismos de desestabilização de emulsões.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.6 – Forças atrativas entre moléculas na superfície e no bulk</i>	<i>33</i>
<i>Figura 2.7 – Representação do ângulo de contato observado pelo método de gota séssil.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 2.8 – Orientação das moléculas nas fases: (a) gás, (b) líquido, (c) sólido. (Adaptado de HANN, 1990)</i>	<i>36</i>
<i>Figura 2.9 – Isoterma de compressão de um fosfolípido. (Adaptado de GIRARD-EGROT; GODOY; BLUM, 2005)</i>	<i>36</i>
<i>Figura 2.10 – Distribuição de tamanho de partículas de uma emulsão - (a) - representada como percentual numérico ou volumétrico versus diâmetro de partícula (b). (Adaptado de MCCLEMENTS, 2007)</i>	<i>38</i>
<i>Figura 2.11 - Representação esquemática do potencial zeta.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 2.12 – Possíveis comportamentos de fluidos: (1) Newtoniano, (2) Pseudoplástico, (3) Dilatante, (4) Bingham (Adaptado de SCHRAMM, 2000).....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 2.13 – Representação do ordenamento de um líquido submetido a cisalhamento (Adaptado de SCHRAMM, 2000)</i>	<i>44</i>
<i>Figura 3.1 – Homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax T 25 digital (IKA, 2019)</i>	<i>56</i>
<i>Figura 4.1 – Comportamento do potencial zeta (em mV) em função do pH de uma suspensão 0,1% m/m nanocelulose em solução 0,01M KCl.....</i>	<i>63</i>

<i>Figura 4.2 – Micrografias da nanocelulose obtidas por microscopia eletrônica de varredura</i>	<i>65</i>
<i>Figura 4.3 – Histogramas da distribuição de tamanhos dos comprimentos e diâmetros das nanofibras de celulose</i>	<i>66</i>
<i>Figura 4.4 – Difratoograma da nanocelulose</i>	<i>67</i>
<i>Figura 4.5 – FTIR-ATR da nanocelulose.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 4.6 – Fotografias das amostras do teste de emulsificação com nanocelulose: a) 1% NFC e 30% óleo; b) 0.1% NFC e 30% óleo; c) 0,5% NFC, 40% óleo e 5% PPI....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 4.7 – SDS-PAGE preliminar.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 4.8 – SDS-PAGE do PPI em triplicata.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 4.9 – Isoterma de Compressão do PPI</i>	<i>74</i>
<i>Figura 4.10 – Gráfico de viscosidades em função das taxas de cisalhamento das mucilagens</i>	<i>77</i>
<i>Figura 4.11 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para a viscosidade das mucilagens.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 4.12 – Provetas com amostras de emulsões após 15 dias: amostras 1 a 11, da esquerda para a direita.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 4.13 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para a estabilidade</i>	<i>85</i>
<i>Figura 4.14 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o módulo do potencial zeta</i>	<i>89</i>
<i>Figura 4.15 – Imagens de microscopia de amostras do ponto central (aumento 50x). 90</i>	
<i>Figura 4.16 – Imagens de microscopia das amostras 1 a 8 do planejamento de experimentos (aumentos de 50x).....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 4.17 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o diâmetro médio de gotas</i>	<i>93</i>
<i>Figura 4.18 – Gráfico de viscosidades versus taxa de cisalhamento das emulsões....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 4.19 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para a viscosidade das emulsões a $0,1\text{ s}^{-1}$.....</i>	<i>96</i>

<i>Figura 4.20 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 8</i>	97
<i>Figura 4.21 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 6</i>	98
<i>Figura 4.22 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 2</i>	99
<i>Figura 4.23 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 1</i>	100
<i>Figura 4.24 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o módulo elástico a 1 rad/s</i>	101
<i>Figura 4.25 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o módulo viscoso a 1 rad/s</i>	102
<i>Figura 4.26 – Emulsões com aditivos após 15 dias: amostras 4, 6 e 8 (da esquerda para a direita)</i>	104
<i>Figura A.1 - Difração de raios-X por um cristal (NICOLINI, 2013)</i>	119
<i>Figura B.1 – Imagens de emulsões após 15 dias: amostras em pH neutro 1 a 4 (de cima para baixo, da esquerda para a direita)</i>	123
<i>Figura B.2 – Imagens de emulsões após 15 dias: amostras em pH ácido 5 a 8 (de cima para baixo, da esquerda para a direita)</i>	124
<i>Figura B.3 – Imagens de emulsões após 15 dias: amostras do ponto central 9 a 11 (de cima para baixo, da esquerda para a direita)</i>	125
<i>Figura C.1 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 1</i>	126
<i>Figura C.2 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 2</i>	126
<i>Figura C.3 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 3</i>	127
<i>Figura C.4 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 4</i>	127
<i>Figura C.5 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 5</i>	127
<i>Figura C.6 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 6</i>	128
<i>Figura C.7 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 7</i>	128

<i>Figura C.8 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 8</i>	128
<i>Figura C.9 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 9</i>	129
<i>Figura C.10 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 10</i>	129
<i>Figura C.11 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 11</i>	129
<i>Figura E.1 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 1</i>	131
<i>Figura E.2 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 2</i>	131
<i>Figura E.3 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 3</i>	132
<i>Figura E.4 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 4</i>	132
<i>Figura E.5 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 5</i>	132
<i>Figura E.6 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 6</i>	133
<i>Figura E.7 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 7</i>	133
<i>Figura E.8 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 8</i>	133
<i>Figura E.9 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 9</i>	134
<i>Figura E.10 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 10</i>	134
<i>Figura E.11 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 11</i>	134
<i>Figura F.1 – Curva de calibração do encapsulamento</i>	135

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 2.1 – Exemplos de estudos de emulsões</i>	9
<i>Tabela 2.2 – Benefícios do Encapsulamento (SHARIF et al., 2018)</i>	32
<i>Tabela 3.1 – Relação de reagentes utilizados</i>	49
<i>Tabela 3.2 – Níveis do planejamento de experimentos</i>	55
<i>Tabela 4.1 – Medidas de tensão superficial das amostras de nanocelulose em diferentes concentrações</i>	68
<i>Tabela 4.2 – Média e desvio padrão do ângulo de contato do filme de nanocelulose preparado a partir da secagem da suspensão 3%</i>	68
<i>Tabela 4.3 – Massas moleculares das frações proteicas do PPI</i>	71
<i>Tabela 4.4 – Resultados das propriedades das mucilagens</i>	76
<i>Tabela 4.5 – Efeitos das variáveis sobre a viscosidade das mucilagens</i>	78
<i>Tabela 4.6 – Resultados do planejamento experimental</i>	80
<i>Tabela 4.7 – Resultados da estabilidade das emulsões com PPI</i>	81
<i>Tabela 4.8 – Efeito das variáveis sobre a estabilidade das emulsões</i>	83
<i>Tabela 4.9 – Resultados de tensão superficial das emulsões com PPI</i>	85
<i>Tabela 4.10 – Resultados de potencial zeta das emulsões com PPI</i>	87
<i>Tabela 4.11 – Efeito das variáveis sobre o valor absoluto do potencial zeta das emulsões</i>	88
<i>Tabela 4.12 – Resultados diâmetro médio de gotas das emulsões com PPI</i>	89
<i>Tabela 4.13 – Efeito das variáveis sobre o diâmetro médio de gotas das emulsões</i> ...	92
<i>Tabela 4.14 – Resultados de viscosidade das emulsões com PPI</i>	94
<i>Tabela 4.15 – Efeito das variáveis sobre a viscosidade das emulsões</i>	95
<i>Tabela 4.16 – Resultados dos testes dinâmicos das emulsões com PPI</i>	96

<i>Tabela 4.17 – Efeito das variáveis sobre os módulos elástico e viscoso das emulsões</i>	101
<i>Tabela 4.18 – Resultados da reologia interfacial PPI/óleo de laranja</i>	102
<i>Tabela 4.19 – Estabilidade e potencial zeta de emulsões com aditivos</i>	104
<i>Tabela 4.20 – Estabilidade das emulsões com α-tocoferol</i>	105
<i>Tabela 4.21 – Quantidade encapsulada de α-tocoferol</i>	106
<i>Tabela D.1 – Matriz correlação das variáveis do planejamento de experimentos</i>	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

As indústrias de alimentos e bebidas são setores com grande participação no Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil, representando cerca de 10% do total, com receita anual superior a 614 bilhões de reais em 2016, sendo cerca de 19% relativo à indústria de bebidas. (ABIA, 2017; FLAVORS & BOTANICALS, 2018)

Devido ao momento de crise econômica vivido no país, nos anos de 2015, 2016 e 2017 o mercado de bebidas não alcóolicas exibiu quedas de 1,6%, 4,5% e 13%, respectivamente, na sua produção. Essa tendência também é forte na indústria de refrigerantes, com quedas de 6,1%, 6,0% e 11% no mesmo período. No entanto, a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) demonstra otimismo na retomada do crescimento de produção e faturamento para os próximos anos. (ABIA, 2017; ABIR, 2019; FLAVORS&BOTANICALS, 2018)

Devido a esses desafios, aumenta-se a necessidade das empresas de se manter na vanguarda do desenvolvimento de novos produtos e atender as exigências dos consumidores por produtos com maior valor agregado de nutrientes, além da contínua otimização de processos, qualidade e custos.

De modo geral, as bebidas industrializadas são emulsões altamente diluídas do tipo óleo em água, que para serem consideradas de qualidade comercial devem permanecer estáveis por no mínimo 6 meses. No caso de refrigerantes, é produzida inicialmente uma emulsão base concentrada, que é transportada para instalações de envase e distribuição, onde é diluída e carbonatada, devendo manter a estabilidade por todo esse processo.

A qualidade final do produto é indicada por suas propriedades nutricionais e organolépticas; e depende de um certo entendimento da influência de suas propriedades físico-químicas e dos fenômenos interfaciais envolvidos. Algumas das variáveis determinantes para a qualidade e o tempo de vida útil de uma emulsão são: a

fração de óleo, a natureza e concentração de agentes emulsificantes e estabilizantes, e a diferença de densidade entre as fases. (ALMEIDA, 2012; GASPAR, 2015)

Recentemente, tem sido bastante estudado o uso de agentes emulsificantes naturais, como polissacarídeos e proteínas, como forma de agregar valor nutritivo aos produtos além de conferir estabilidade. Uma forma adicional de se aumentar o valor nutricional consiste no encapsulamento de nutrientes pelo próprio agente emulsificante.

Este trabalho dá continuidade à linha de pesquisa sobre estabilidade de emulsões no Laboratório de Engenharia de Fenômenos Interfaciais (LABEFIT) do Programa de Engenharia Química. Almeida (ALMEIDA, 2012) avaliou o uso dos estabilizantes goma arábica, amido e amido modificado. Gaspar (GASPAR, 2015) avaliou o uso de proteína isolada do soro do leite como emulsificante, assim como o encapsulamento de dois compostos bioativos.

Esta Dissertação de Mestrado tem como objetivo principal avaliar o uso de novos agentes emulsificantes naturais para a estabilização de emulsões concentradas de óleo de laranja em água como base para o preparo de bebidas. Como estabilizantes, serão investigados dois agentes, um que estabiliza pela combinação de forças eletrostáticas e estéricas e outro pelo fenômeno de "Pickering". No primeiro caso, foi selecionada o isolado proteico de ervilha, um material de origem vegetal, composto por uma mistura de proteínas. O outro agente escolhido foi a nanocelulose, um rejeito em várias indústrias e cujo aproveitamento pode trazer vantagens econômicas e técnicas. Ambos os agentes são alternativas interessantes aos estabilizantes convencionais pela alta disponibilidade e preço relativamente baixo, além de resultados promissores relatados na literatura.

Proteínas de leguminosas, como o isolado proteico de ervilha, adicionam valor nutricional ao produto sem as restrições resultantes da utilização de proteínas animais, além de possuírem boas propriedades funcionais e antioxidantes. (SHARIF et al., 2018)

Nanocelulose é um nanomaterial resultante da clivagem de paredes celulares, sendo portanto uma fonte de fibras. É um material com características interessantes para a estabilização de emulsões, como grande área específica e razão de aspecto. (GÓMEZ H. et al., 2016)

O encapsulamento de nutrientes em emulsões pode ser utilizado para evitar degradação de ingredientes ativos, fazer sua liberação controlada, ou melhorar propriedades sensoriais de um produto. Nas indústrias de alimentos e bebidas, as vitaminas (por exemplo: ácido ascórbico e α -tocoferol) e corantes naturais (carotenoides) são bastante utilizadas sob encapsulamento por serem compostos que degradam com facilidade. (SHARIF et al., 2018)

De modo a monitorar as propriedades importantes para a manutenção da estabilidade de uma emulsão, algumas técnicas serão utilizadas: inspeção visual, determinação do potencial zeta (ou potencial eletrocinético), análise do tamanho de gotas, medidas de tensão superficial e interfacial e análises da reologia interfacial e das emulsões.

1.2 Objetivos

Este estudo tem como objetivo principal determinar a viabilidade técnica de dois agentes emulsificantes naturais, a nanocelulose e o isolado proteico de ervilha, para a estabilização de emulsões concentradas do tipo óleo em água (o/a) como base para o preparo de bebidas.

Para avaliar o uso desses agentes, serão utilizadas técnicas de planejamento experimental e monitoramento de propriedades físico-químicas.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Obter emulsões estáveis produzidas pelo uso de nanocelulose e/ou isolado proteico de ervilha;
- Investigar a correlação entre propriedades físico-químicas e a estabilidade de emulsões;
- Realizar o encapsulamento de um nutriente utilizando o sistema que apresentar melhor estabilidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Emulsões

Coloides são misturas heterogêneas compostas de ao menos duas fases imiscíveis entre si, com uma delas se encontrando finamente dividida, chamada de fase dispersa, distribuída na fase contínua. Emulsão é o nome dado ao coloide resultante da mistura entre duas fases líquidas imiscíveis, geralmente constituídas por uma fase aquosa (polar) e outra fase oleosa ou orgânica (apolar). (MCCLEMENTS, 2016)

A ciência de emulsões integra conhecimentos de física, química, biologia e engenharia e tem aplicação em diversos setores industriais importantes para a sociedade, como alimentos, cosméticos, petróleo, farmacêuticos, tintas, entre outros. (TADROS, 2009)

Os estudos recentes nessa área, em especial para a indústria de alimentos, tem se dividido em duas frentes principais: o desenvolvimento de novas técnicas analíticas de caracterização de propriedades e a utilização de uma abordagem científica mais rigorosa para melhor entendimento das propriedades de emulsões. (MCCLEMENTS, 2016)

Os tipos de emulsão são normalmente classificados como: óleo em água (O/A), quando gotas de óleo se encontram dispersas na fase aquosa; e água em óleo (A/O), quando a fase contínua é a fase oleosa. Existem também as emulsões múltiplas de água em óleo em água ($A_2/O/A_1$) e de óleo em água em óleo ($O_2/A/O_1$), que consistem em duas etapas de emulsificação. Para emulsões $A_2/O/A_1$, por exemplo, uma fase aquosa (A_2) está dispersa na fase oleosa (O), e essa emulsão (A_2/O), por sua vez, está dispersa na outra fase aquosa (A_1), como se pode observar na *Figura 2.1*. (TADROS, 2009)

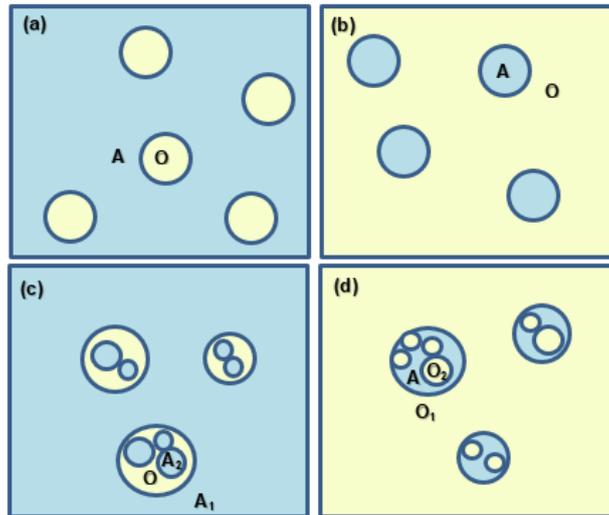


Figura 2.1 – Tipos de emulsões: (a) O/A; (b) A/O; (c) A₂/O/A₁; (d) O₂/A/O₁

Em alimentos, as emulsões costumam apresentar gotas com diâmetro entre 100nm e 100µm. Recentemente tem-se aumentado o interesse em nanoemulsões, emulsões com gotas muito pequenas ($d < 100 \text{ nm}$), e em emulsões múltiplas, devido às suas propriedades particulares. (MCCLEMENTS, 2016)

2.1.1 Formação de Emulsões

O processo de formar uma emulsão a partir de dois líquidos imiscíveis ou de reduzir a tamanhos das gotas existentes em uma emulsão já existente é chamado de homogeneização. Por definição, a diferença de energia livre de superfície entre os estados das fases separadas e em uma emulsão é equivalente ao produto do aumento da área de contato entre essas duas fases e a tensão interfacial entre elas. Dessa forma, pode-se dizer que a diferença de energia livre de Gibbs para a formação de uma emulsão é descrita pela Eq. 1: (MCCLEMENTS, 2016)

$$\Delta G_{\text{formação}} = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad \text{Eq. 1}$$

Em que $\Delta G_{\text{formação}}$ é a diferença na energia livre para formação de uma emulsão, γ é a tensão interfacial entre as duas fases, ΔA é o aumento na área interfacial, T é a temperatura absoluta do sistema e ΔS é a diferença na entropia das gotas no sistema e do estado inicial.

Apesar do termo relacionado à entropia ser sempre negativo, favorecendo a formação da emulsão – o número de configurações possíveis para as moléculas no sistema é muito maior na forma de emulsão – ele é, em geral, muito menor do que o termo referente à energia livre de superfície. Logo, pode-se dizer que emulsões são sistemas inerentemente instáveis. (MCCLEMENTS, 2016)

O processo de homogeneização geralmente envolve o uso de métodos mecânicos com alto consumo de energia, pois consiste em um grande aumento na área interfacial entre as duas fases. A quantidade mínima de energia necessária para se aumentar essa área interfacial, normalmente fornecida na forma de trabalho, pode ser calculado pelo próprio conceito de energia livre de superfície. Esse cálculo é dado pela Eq. 2: (ALMEIDA, 2012; HARTLAND, 2004)

$$W = \gamma * \Delta A \qquad \text{Eq. 2}$$

Em que W é o trabalho mínimo a ser adicionado ao sistema para que se forme a emulsão.

Com base nisso, pode-se perceber a importância de se adicionar estabilizantes, para reduzir a tensão interfacial, ajudando a promover a formação e favorecer a estabilidade dessas emulsões. Dependendo da forma como atuam, esses estabilizantes podem ser chamados de: agentes emulsificantes, espessantes, gelificantes ou agentes de peso. Além disso, outros fatores que podem afetar os atributos de uma emulsão são o tipo de óleo e a presença de aditivos. (MCCLEMENTS, 2016)

Emulsificantes são moléculas, geralmente com propriedades tensoativas, que se concentram na superfície das gotas formadas. Esses compostos podem ajudar na formação das emulsões pela redução da tensão interfacial entre as duas fases, assim como ajudam a estabilizar o sistema formado, podendo formar uma camada física que impede a coalescência das gotas por impedimento estérico; ou pela presença de cargas nessas moléculas, formando uma camada de impedimento eletrostático. (MCCLEMENTS, 2016)

Existem diversos tipos de emulsificantes (*Figura 2.2*), os mais comuns sendo: surfactantes (ex: Tween 80); proteínas (ex: *whey*, uma mistura de proteínas do soro do leite); hidrocoloides (ex: goma arábica); polissacarídeos (ex: amido) e fosfolípidios (ex:

lecitinas). Dependendo do tipo de agente emulsificante utilizado, a emulsão pode ser estabilizada por diferentes mecanismos. Com proteínas, por exemplo, além do caráter tensoativo, é comum haver uma contribuição de impedimentos estérico (devido ao tamanho das moléculas) e eletrostático (por conta da carga efetiva das moléculas, que depende do pH do meio).

Uma grande quantidade das pesquisas sobre matérias-primas para emulsões se concentram no estudo de novos emulsificantes, como por exemplo: hidrolisados de glúten (JOYE; MCCLEMENTS, 2014), *quillaja saponina* (WEIGEL et al., 2018), albumina bovina (MATSUMIYA et al., 2014), goma de *A. homolocarpum* (KOOCHKEI et al., 2009), entre outros.

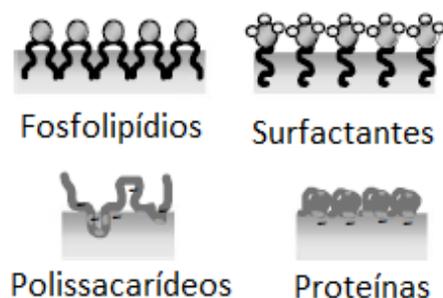


Figura 2.2 – Tipos de emulsificantes tensoativos em interfaces (Adaptado de MCCLEMENTS, 2016)

Espessantes são utilizados para aumentar a viscosidade da fase contínua, enquanto gelificantes a transformam em gel, em ambos os casos retardando o movimento das gotas. (MCCLEMENTS, 2016)

O aumento da viscosidade resulta em uma emulsão mais estável, como mostrado, por exemplo, no estudo de Taherian, Fustier e Ramaswamy, 2006. Os principais espessantes e gelificantes são proteínas, polissacarídeos ou cristais de gordura. (TAHERIAN; FUSTIER; RAMASWAMY, 2006)

Agentes de peso são normalmente adicionados à fase dispersa com o intuito de se reduzir a diferença de densidade entre as gotas e a fase contínua, principal responsável pela separação gravitacional de uma emulsão. (MCCLEMENTS, 2016)

Para fazer este ajuste, costuma-se utilizar a Regra de Pearson, Eq. 3, em que P é a fração mássica de agente de peso na fase oleosa, G é a densidade do agente de

peso, E é a densidade do óleo e A é a densidade desejada (usualmente 1,02). (TAHERIAN et al., 2008)

$$P = \frac{G}{A} \left(\frac{A-E}{G-E} \right) \quad \text{Eq. 3}$$

O tipo de óleo utilizado depende muito da finalidade da emulsão, podendo variar de óleos relativamente simples, como decano, até misturas de moléculas, como em óleos essenciais. Uma imensa variedade de óleos já foram utilizados na literatura em estudos sobre emulsões, por exemplo: óleos de diversas sementes (NIU et al., 2018; SZTERK; ROSZKO; GÓRNICKA, 2013); triglicerídeos de cadeia mediana, MCT (KHARAT; ZHANG; MCCLEMENTS, 2018); óleo de milho (SOLEIMANPOUR; KOOCHKEKI; KADKHODAEI, 2013), óleos de frutas cítricas (BUFFO; REINECCIUS; OEHLERT, 2001; ZHAO et al., 2018), entre outros.

Além dos fatores citados até aqui, como o tipo de emulsão e os ingredientes utilizados, outros fatores, como as condições de processamento, também podem afetar as características de uma emulsão. Diversos estudos já foram feitos de modo a tentar compreender melhor como cada variável influencia no processo e no resultado final de uma emulsão. Para ilustrar a grande diversidade de agentes emulsificantes, óleos e aditivos sendo analisados para formação e estabilização de emulsões do tipo óleo em água, alguns estudos estão resumidos na *Tabela 2.1*.

Tabela 2.1 – Exemplos de estudos de emulsões

Referência	Tipo de Emulsão	Emulsificantes	Fase Oleosa	Aditivos	Comentários
(CHEN et al., 2018a)	O/A	PPI ¹ (1-30mg/mL)	Óleo de Soja (10%)	Azido de sódio (0,02%)	- Aumento da concentração de PPI: i) aumentou capacidade emulsificante, estabilidade das emulsões e concentração interfacial de proteínas adsorvidas ii) Reduziu porcentagem de proteínas adsorvidas - Ponto de saturação da adsorção interfacial em PPI = 10 mg/mL - Na adsorção saturada: vicilina > legumina > agregados > convicilina
(KHARAT; ZHANG; MCCLEMENTS, 2018)	O/A	i) Goma arábica (10%) ii) <i>Quillaja Saponina</i> (0,8%) iii) Tween 80 (0,6%) iv) Caseinato de sódio (0,5%)	Óleo MCT ² (9%) + Cúrcuma (1mg/g)	Azido de sódio (0,02%)	- Carga superficial: (i) >>> (ii) > (iii) > (iv) - Degradação do cúrcuma maior em pH 7 que em pH 3 e a 55°C que a 37°C - Degradação após 15 dias: (ii) >> (i) ~ (iii) ~ (iv)
(MENDES et al., 2018)	O/A	PPI (0,3-1g/L)	50% i) n-heptano ii) tolueno iii) óleo de linhaça	-	- PPI é um biosurfactante termicamente estável (4-80°C) - Emulsões estáveis com (i) e (ii) - Sem redução de tensão interfacial com (iii) e (iv)

Referência	Tipo de Emulsão	Emulsificantes	Fase Oleosa	Aditivos	Comentários
			iv) óleo de ricino		
(WEIGEL et al., 2018)	O/A	i) <i>Quillaja Saponina</i> ii) Tween 80 iii) <i>Whey</i> iv) Caseinato de sódio	5%: Óleo de milho + Luteína (250mg/L)	Antioxidantes: - EDTA - Ácido Ascórbico - Catequina - α -tocoferol - Palmitato Ácido Ascórbico	- (i) Maior estabilidade após 10 dias a 45°C - Estabilidade física independe do antioxidante - Estabilidade química: ácido ascórbico foi o único que não promoveu degradação da luteína
(ZHAO et al., 2018)	Emulsão espontânea (O/A)	Tween 80 (4%)	Óleos cítricos 5%: i) Mandarina ii) Bergamota iii) Laranja	-	- (i) Menos estável - (ii) Mais estável: mais hidrofóbico e gotas menores
(LAM et al., 2017)	O/A	PPI – 6 culturas diferentes (0,5%)	Óleo de canola (50%)	-	- Cultivos apresentaram: i) razão Lg/Vn^3 , solubilidade e capacidade de formação de espuma significativamente diferentes entre si ii) sem grandes diferenças de estabilidade de emulsões, estabilidade de espumas, carga superficial e capacidade de retenção de óleo

Referência	Tipo de Emulsão	Emulsificantes	Fase Oleosa	Aditivos	Comentários
(RAIKOS; DUTHIE; RANAWANA, 2017)	O/A	i) Tween 80 (1%) ii) Caseinato de Sódio (10%) iii) Goma Arábica (10%)	Óleo de laranja	-	- Melhor efeito de redução no tamanho de gotas: (i) > (ii) > (iii) - Maior estabilidade após 4 semanas: (i) > (iii) > (ii) - (ii) tem maior capacidade de controlar processos oxidativos
(CARRILLO; NYPELÖ; ROJAS, 2015)	A/O/A	NFC ⁴ a) 0,5-3,0% b) e c) 1,0%	a) Óleo de Soja (25-75%) b) Limoneno (50%) c) Octano (50%)	Mistura 1:1:1 de 2 surfactantes + n-pentanol (3%)	- NFC aumentou viscosidade e reduziu tamanho de gotas - (b) e (c) produziram gotas menores que (a)
(GARREC et al., 2012)	a) Nanoemulsão O/A b) A ₁ /O/A ₂	a) - Tween 80 - Fosfatodiglicerol b) Sílica (1%) Amido (2%)	a) (i) Decano (ii) Myrtilol 318 (iii) Óleo de soja b) Óleo de girassol	b) Azido de sódio (0,1%)	a) - Controlar liberação de nutrientes no trato intestinal - Aumento na estabilidade - Mais susceptível a Ostwald: utilizar óleos de baixa solubilidade em água b) - Partículas na 2 ^a interface: filme mais espesso e rígido - Estabilização por Pickering - Proteção contra coalescência
(REINER; REINECCIUS; PEPPARD, 2010)	O/A	a) 3 Gomas acácias (7-16%) b) Goma acácia modificada (16%)	i) Terpenes de laranja ii) Miglyol 812 – triglicérides de cadeia média	Bebidas: - Sacarose (10%) - Ácido cítrico (0,3%)	- Desestabilização mais rápida a 35°C que a 25°C - Bebidas com (i) geram gotas menores que com (ii) - Estabilidade com (b) aumenta ao usar acima do indicado

Referência	Tipo de Emulsão	Emulsificantes	Fase Oleosa	Aditivos	Comentários
		c) 3 Amidos modificados (12%)	- Goma éster em 1:1 com óleos (Goma + óleo: 10%)	- Benzoato de sódio (0,1%) - Emulsão (0,5-2%)	- Bebidas com (b) e (a) mais estáveis que com (c)

Legenda:

¹PPI – Isolado proteico de ervilha (em inglês, *Pea Protein Isolate*)

²MCT – Triglicerídeos de cadeia média (em inglês, *Medium-Chain Triglyceride*)

³Razão Lg/Vn – razão entre Legumina e Vicilina, principais proteínas presentes no PPI

⁴NFC – Nanofibras de Celulose

2.1.2 Emulsões de Bebidas

A indústria de bebidas tem a necessidade de aumentar seu entendimento dos fatores determinantes para as propriedades de seus produtos, de modo a conseguir lançar novos produtos com características atraentes para o público, como bebidas com novos sabores e bebidas funcionais, fortificadas com vitaminas, minerais e outros compostos benéficos para a saúde. (MCCLEMENTS, 2016)

Emulsões de bebidas são quaisquer emulsões O/A consumidas na fase líquida, contudo, nesse trabalho, o termo será utilizado para se referir principalmente a bebidas de frutas e refrigerantes, devido às suas similaridades físico-químicas.

O produto final normalmente consiste em uma emulsão altamente diluída, abaixo de 0,5% em massa de óleo. Entretanto, essas bebidas costumam ser previamente preparadas em instalações separadas em uma forma muito mais concentrada, na faixa de 10 a 30% m/m de óleo, reduzindo custos de transporte e estocagem. Devido à alta concentração de hidrocoloides na emulsão concentrada, esta costuma apresentar uma viscosidade elevada, sendo portanto mais fácil de se manter estável do que na forma diluída. (MCCLEMENTS, 2016; TAHERIAN et al., 2008)

Por conta disso, é de grande interesse que se obtenham formas de se produzir emulsões cada vez mais concentradas, mas que permaneçam estáveis tanto na forma concentrada quanto na forma diluída.

Em bebidas, existem dois tipos diferentes de emulsões, para os quais são utilizados óleos diferentes. As emulsões de sabor utilizam principalmente óleo essenciais de frutas cítricas (como limão, laranja e bergamota), que são óleos que misturam diversas moléculas diferentes. Por vezes, esses óleos contêm alguns componentes com alguma solubilidade em água, tornando-os mais susceptíveis ao amadurecimento de Ostwald do que óleos convencionais. O outro tipo de emulsão são as emulsões de “nuvem”, utilizadas para tornar a bebida mais turva, com maior aparência de um suco natural, e para isso são utilizados óleo vegetais sem sabor. (AMEH; OBODOZIE-OFOEGBU, 2016; MCCLEMENTS, 2016; REINER; REINECCIUS; PEPPARD, 2010; TAHERIAN; FUSTIER; RAMASWAMY, 2006)

Óleo essenciais são misturas de substâncias lipofílicas obtidas a partir de partes de plantas, como folhas, flores, casca ou sumo de frutas. Devido à presença de compostos voláteis, esses óleos apresentam sabores e odores característicos da planta da qual foram extraídos. De maneira geral, são instáveis na presença de luz, calor, umidade, oxigênio e metais. São muito utilizados em emulsões para dar sabor ao produto final, principalmente óleos de frutas cítricas. Alguns estudos já analisaram o efeito de diferentes óleos cítricos na estabilidade de uma emulsão, como o trabalho de Zhao *et al*, 2018, que concluiu que, em emulsões com Tween 80, o óleo de bergamota produz emulsões mais estáveis e com menores gotas que os óleos de mandarina e laranja doce, devido à maior presença de componentes relativamente polares (ex.: acetato de linalila), favorecendo a adsorção do surfactante; e de compostos insolúveis em água (ex.: γ -terpineno), reduzindo os efeitos do amadurecimento de Ostwald. (AMEH; OBODOZIE-OFOEGBU, 2016; GASPAR, 2015; ZHAO *et al.*, 2018)

Agentes de peso são muito utilizados nas emulsões de bebidas para aumentar a densidade dos óleos essenciais, reduzindo sua cremeação. Os agentes mais utilizados nessa indústria são o óleo vegetal bromado (BVA) e o isobutirato acetato de sacarose (SAIB), com densidades de $1240-1330\text{kg.m}^{-3}$ e 1150 kg.m^{-3} respectivamente. No entanto, devido a riscos de saúde, em alguns países seu uso é altamente controlado, sendo permitido o uso de no máximo 300 ppm de SAIB e 15 ppm de BVA nos produtos finais, sendo de grande importância para a indústria de bebidas que se encontrem mecanismos de estabilização sem a necessidade da utilização destes agentes. Além disso, principalmente em emulsões mais concentradas, essas quantidades são relativamente pequenas, podendo não ser suficientes para igualar as densidades das duas fases, apenas para aproximá-las (TAHERIAN *et al.*, 2008; TAHERIAN; FUSTIER; RAMASWAMY, 2006).

A formulação padrão de uma emulsão de bebida costuma envolver, além dos componentes básicos já citados (água, óleos, emulsificante e agentes de peso), alguns outros aditivos. De modo geral, é desejável que as bebidas sejam relativamente ácidas (pH 2,5-4,5), por conta disso é necessária a adição de acidulantes para levar a fase aquosa ao pH desejado, sendo que o mais utilizado é o ácido cítrico. Esses acidulantes auxiliam também a retardar a oxidação e o crescimento microbiano. Corantes e adoçantes (naturais ou artificiais) são utilizados para se obter a aparência e sabor desejados. Outros aditivos utilizados como antioxidantes e/ou bactericidas são o

benzoato de sódio, sorbato de potássio (0,1-0,4%), ácido benzoico e até mesmo EDTA. (AMEH; OBODOZIE-OFOEGBU, 2016; BUFFO; REINECCIUS, 2001; GASPAR; NELE; FERRAZ, 2017; MCCLEMENTS, 2016; REZVANI; SCHLEINING; TAHERIAN, 2012)

2.2 Agentes Emulsificantes

Como já foi dito, existem diversos agentes emulsificantes já utilizados pela indústria, além de incontáveis opções sendo estudadas a todo momento. Esta seção expandirá um pouco sobre o emulsificante mais utilizado pela indústria de bebidas na atualidade, a goma arábica; assim como sobre outros dois potenciais emulsificantes, os objetos de estudo deste trabalho, a nanocelulose e o isolado proteico de ervilha.

2.2.1 Goma Arábica

A goma arábica, também chamada de goma acácia, é o agente emulsificante mais utilizado nas indústrias de alimentos e bebidas na atualidade. Ele consiste de três frações biopoliméricas: complexo de proteínas arabinogalactanas de alta massa molecular (AGP); glicoproteína (GI); e polissacarídeo arabinogalactana de baixa massa molecular (AG). (RAIKOS; DUTHIE; RANAWANA, 2017)

Hidrocoloides como a goma arábica, devido à presença de domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, agem como gomas tensoativas em emulsões com capacidade de formar um filme ao redor das gotas promovendo um impedimento estérico, com alguma contribuição de repulsão eletrostática. De modo geral, as gomas acácias conseguem formar emulsões concentradas estáveis, pouco afetadas pela temperatura e com distribuição estreita de tamanho de gotas. (RAIKOS; DUTHIE; RANAWANA, 2017; REINER; REINECCIUS; PEPPARD, 2010; TAHERIAN; FUSTIER; RAMASWAMY, 2007)

No entanto, esse tipo de composto geralmente necessita de grandes quantidades para recobrimento de gotas e estabilização de emulsões (por volta de 10-20%), como demonstrado por Kharat, Zhang e McClements, em 2018, pela análise do carregamento superficial (massa de emulsificante por área interfacial) de emulsões com diversos

emulsificantes. Nesse estudo, foi observado que a carga de goma arábica (55,3mg/m²) necessária para estabilizar uma emulsão de óleo MCT é até 30 vezes maior que de outros emulsificantes, como Tween 80 (1,6 mg/m²) ou caseinato de sódio (1,5mg/m²). (KHARAT; ZHANG; MCCLEMENTS, 2018; RAIKOS; DUTHIE; RANAWANA, 2017)

Outro desafio relacionado ao uso da goma arábica é sua variabilidade de capacidade emulsificante devido a fatores como localização geográfica, estação de cultivo e processamento, além de apresentar diferença significativa entre as duas espécies plantas de onde é extraída, a *Acacia Senegal* (maior capacidade emulsificante) e *Acacia seyal*. (BUFFO; REINECCIUS; OEHLERT, 2001; REINER; REINECCIUS; PEPPARD, 2010)

Além disso, por conta do grande aumento em sua demanda, em especial da *A. Senegal*, junto ao fato de grandes quantidades serem necessárias, o custo relacionado ao uso da goma acácia tem aumentado nos últimos anos, explicando o grande interesse das indústrias em se obter alternativas a essa matéria prima. (REINER; REINECCIUS; PEPPARD, 2010)

2.2.2 Nanocelulose

Nanocelulose é um nanomaterial resultante da clivagem de fibras de paredes celulares, podendo ser extraída de madeira, algodão, fibras naturais e materiais lignocelulósicos. (GÓMEZ H. et al., 2016; SALAS et al., 2014)

A nanocelulose demonstra um grande potencial para desenvolvimento de aplicações, principalmente no campo de alimentos e fármacos (devido a sua estabilidade e biocompatibilidade), mas também na área de cosméticos, tintas, embalagens de alimentos e biomedicina. (FUJISAWA; TOGAWA; KURODA, 2017)

Dependendo da sua composição química superficial, razão de aspecto (razão entre o comprimento e o diâmetro) e cristalinidade as nanoceluloses podem controlar a reologia e a estabilidade de dispersões, assim como melhorar as propriedades mecânicas de compósitos. A química de superfície das nanoceluloses depende do método utilizado para seu isolamento, sendo que a maioria destes geram cargas negativas na superfície. (TARDY et al., 2017)

As nanoceluloses possuem grandes áreas e razões de aspecto, com propriedades que as tornam um material versátil com várias possíveis aplicações como aditivo alimentar. Algumas propriedades interessantes são: dimensões em escala nanométrica, baixa densidade, biodegradabilidade, anfifilicidade, estabilidade química e biocompatibilidade. (FUJISAWA; TOGAWA; KURODA, 2017; GÓMEZ H. et al., 2016)

Além disso, comparado a outras partículas utilizadas na estabilização de emulsões, nanoceluloses são abundantes, sustentáveis e fáceis de fazer modificações na superfície. (CAPRON; ROJAS; BORDES, 2017)

Em geral, as nanoceluloses apresentam abundância de grupos hidroxila na superfície, devido à estrutura da celulose (*Figura 2.3*), favorecendo a adesão dessas partículas através de ligações de hidrogênio. (SALAS et al., 2014)

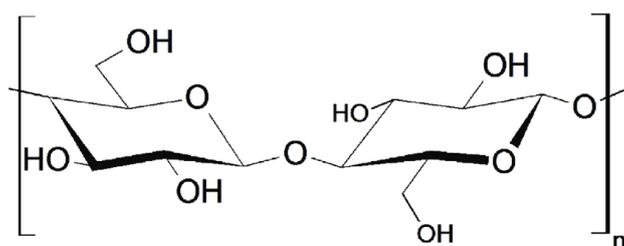


Figura 2.3 – Estrutura da celulose (NASCIMENTO et al., 2014)

Um dos métodos para realizar a clivagem das fibras é a hidrólise ácida. As propriedades do material resultante são funções do tempo que se deixa a reação ocorrendo, de modo que, com o aumento desse tempo de hidrólise, tem-se: mais nanopartículas adsorvidas por área interfacial de óleo, maior ângulo de molhamento das gotículas de água ligadas a filmes de celulose, menores diâmetros médios de partículas, camada interfacial mais grossa (redução no amadurecimento de Ostwald), potencial zeta mais negativo e maior estabilidade ao armazenamento. (NIU et al., 2018)

Existem dois tipos principais de nanoceluloses: nanofibras (NFC) e nanocristais (NCC). NFC são mais longas e semicristalinas, podendo ter vários micrômetros de comprimento e espessura na escala nanométrica, e quando dispersas em água tendem a formar uma rede de nanofibras entrelaçadas. NCC são apenas o domínio cristalino, menor “bloco” isolado da estrutura das fibras de celulose, com comprimento entre 70nm e alguns micrômetros. NCC normalmente é carregado negativamente, devido à

introdução de grupos carboxila ou éster sulfato nos processos de extração. (CAPRON; ROJAS; BORDES, 2017; CARRILLO; NYPELÖ; ROJAS, 2015)

As nanoceluloses estabilizam emulsões pelo mecanismo conhecido como Pickering. Esse mecanismo consiste em partículas sólidas finas, que adsorvem irreversivelmente na interface líquido/líquido, reduzindo a tensão interfacial e/ou formando impedimento estérico, evitando a coalescência e, conseqüentemente, estabilizando a emulsão. (FUJISAWA; TOGAWA; KURODA, 2017; GÓMEZ H. et al., 2016)

Essas partículas seriam eficientes na estabilização de emulsões devido à alta energia requerida para dessorver uma partícula nanométrica, sendo superior até mesmo àquela necessária para dessorver uma molécula de surfactante, sendo a forma da partícula de grande importância para isto acontecer. Em alguns casos, para partículas anisotrópicas (não-esféricas), a camada de partículas adsorvidas na gota chega a ser mais densa que para partículas esféricas. (CAPRON; ROJAS; BORDES, 2017)

As expressões utilizadas para calcular a energia de adsorção dessas partículas, diretamente relacionada à área coberta por elas, são a Eq. 4, para esferas, e Eq. 5, para partículas em forma de bastão: (CAPRON; ROJAS; BORDES, 2017)

$$\Delta G_{esfera} = -\pi R^2 \gamma (1 - |\cos \theta|)^2 \quad \text{Eq. 4}$$

Em que R é o raio, γ é a tensão interfacial e θ é o ângulo de contato.

$$\Delta G_{bastão} = -lb\gamma (1 - |\cos \theta|) \quad \text{Eq. 5}$$

Em que l é o comprimento e b a largura dos bastões.

Como a energia livre para bastões é muito maior do que para esferas, são necessárias menos partículas anisotrópicas do que esféricas para estabilizar a interface. (CAPRON; ROJAS; BORDES, 2017)

A revisão de Gómez *et al.*, 2016, comenta sobre diversos trabalhos, como a patente de Turbak, Snyder e Sandberg, 1982, que estabilizaram emulsões com até 71.5% óleo de soja com 0.94% nanocelulose; Strom, Öhgren e Ankerfors, 2013, que obtiveram emulsões muito firmes utilizando 1% nanocelulose, devido à incorporação do

óleo em uma rede de fibras de nanocelulose; e Winuprasith e Suphantharika, 2013 e 2015, que obtiveram comportamento similar na estabilização de 10% óleo de soja com 0.05 a 0.7% de microcelulose. (GÓMEZ H. et al., 2016; STRÖM; ÖHGREN; ANKERFORS, 2013; TURBAK; SNYDER; SANDBERG, 1982; WINUPRASITH; SUPHANTHARIKA, 2013, 2015)

Além disso, Kalashnikova *et al.*, 2011, 2012 e 2013 demonstraram a estabilização de emulsões O/A de hexadecano, com nanocristais de celulose bacteriana, por vários meses, com manutenção da estabilidade sob aquecimento numa ampla faixa de temperatura e de força iônica do meio. Utilizando celulose microcristalina carregada negativamente (obtida por hidrólise ácida), Kargar *et al.*, 2012, estudaram o efeito do pH na estabilidade de emulsões O/A com óleo de girassol, obtendo uma grande estabilidade em pH acima de 4. Com o aumento na concentração do emulsificante, foi observado também um aumento na resistência à cremeação devido à densa rede formada. (KALASHNIKOVA et al., 2011, 2012, 2013; KARGAR et al., 2012)

NFC já foi utilizado por Salas *et al.*, 2014, como estabilizante de emulsões na forma de fibras dispersas ou formando agregados na interface O/A, reduzindo o colapso das emulsões em pH baixos e com alta concentração de sais. Carrilo *et al.*, 2015, estudaram a utilização de diferentes concentrações de NFC (variando de 0.5 a 3%) formando emulsões O/A ou A/O/A com óleo de soja (50%) e 3% de solução surfactante (mistura 1:1 de Span 80 e Triton X-100), observando dependência da razão entre água, óleo e surfactante (SOW) e da concentração de NFC na fase aquosa. Obteve-se formação de emulsão dupla com óleo de soja, mas não com outros tipos de óleo (octano e limoneno). Nesse estudo também se propõe a adição de n-pentanol como cossurfactante para prevenir a formação de gel. (CARRILLO; NYPELÖ; ROJAS, 2015; SALAS et al., 2014)

A aplicação de NCC, como estabilizante de emulsão O/A, pode levar a uma cobertura de 60% das gotas, obtendo emulsões com comportamento de gel. Ao controlar a densidade de cargas na superfície de nanocristais de celulose por processos de sulfatação/dessulfatação, Kalashnikova *et al.*, 2012, concluíram que essa densidade deve ser abaixo de 0.03 e/nm^2 , para obtenção de emulsões estáveis. (KALASHNIKOVA et al., 2011, 2012; SALAS et al., 2014)

Poucos estudos foram feitos sobre segurança e regulamentação do uso de nanocelulose como componente de produtos alimentício e farmacológicos. Alguns desses foram reunidos por Gómez *et al.*, 2016:

- *in vitro*: testes toxicológicos não indicaram propriedades cito/genotóxicas. (PITKÄNEN *et al.*, 2010)
- *in vitro*: estudo de toxicidade sem efeito citotóxico ou inflamatório em macrófagos. (VARTIAINEN *et al.*, 2011)
- *in vivo*: dieta com até 21% de nanocelulose sem efeitos danosos no metabolismo do animal (rato). (ANDRADE *et al.*, 2015)

2.2.3 Isolado Proteico de Ervilha

Por conta das suas propriedades tensoativas, diversas proteínas são utilizadas para a formação e estabilização de emulsões de bebidas. Na adsorção, proteínas passam por mudança estrutural de modo a maximizar a interação entre seus segmentos hidrofóbicos e a fase hidrofóbica, formando uma fina membrana eletricamente carregada na interface das gotas, que estabiliza as emulsões principalmente por repulsão eletrostática entre as partículas. Por conta disso, essas emulsões são particularmente sensíveis a alterações no pH e força iônica do meio, tendendo à desestabilizar em pH próximo ao ponto isoelétrico (pI) da proteína e em altas concentrações de sal. Algumas propriedades que indicam que uma proteína é uma boa opção para ser utilizada como emulsificante em bebidas são alta solubilidade e alta flexibilidade. (LAM *et al.*, 2016; MCCLEMENTS, 2004; SHARIF *et al.*, 2018)

A maioria das proteínas utilizadas industrialmente são de origem animal, derivadas do leite (*whey*), colágeno (gelatina) ou ovo. No entanto, recentemente tem-se aumentado o interesse no uso de proteínas extraídas de plantas para substituir essas proteínas animais, em busca de uma maior sustentabilidade. Além disso, proteínas animais podem ter seu uso restringido pelas suspeitas de seus papéis em doenças e por crenças religiosas ou morais, além de muitas não serem bons encapsulantes, devido à alta hidrofiliabilidade de grande parte delas. (KARACA; LOW; NICKERSON, 2011; SHARIF *et al.*, 2018)

Entre as proteínas de origem vegetal, as proteínas de leguminosas têm se destacado, pois possuem boas propriedades nutricionais e antioxidantes, sendo geralmente reconhecidas como seguras para consumo. Proteínas de leguminosas são formadas principalmente por globulinas, seguido por albuminas. Elas também são renováveis, anfifílicas e de baixo custo. Por conta disso tem sido estudadas para utilização em preparo de emulsões e no encapsulamento de compostos bioativos. (LAM et al., 2016; SHARIF et al., 2018)

No entanto, geralmente as propriedades dessas proteínas, em solução, são piores do que a de produtos lácteos, pois elas costumam ser pouco solúveis em água e pouco tensoativas em pH's neutros. Para solucionar essas limitações, também se tem estudado fazer modificações na estrutura dessas proteínas ou então utilizá-las em conjunto com outros emulsificantes. (JI et al., 2015; LIANG et al., 2016; SHARIF et al., 2018; YERRAMILLI; LONGMORE; GHOSH, 2017)

A ervilha é uma leguminosa rica em proteínas e carboidratos, tem diversas vitaminas e minerais, além de pouca gordura. O isolado proteico de ervilha (*pea protein isolate* - PPI) tem tido aumento de aceitação no mercado devido ao seu alto valor nutritivo, com perfil balanceado de aminoácidos e rico em lisina, boas propriedades, caráter não alergênico, alta disponibilidade e custo relativamente baixo. Devido ao seu uso como suplemento proteico, atingindo o nicho de mercado de usuário veganos, seu preço tem aumentado, entretanto o custo de matérias-primas permanece relativamente baixo. Em um estudo de Aluko, Mofolasayo e Watts, 2009, o PPI foi considerado um emulsificante melhor que o isolado proteico de soja, apresentando menores tamanhos de gota e melhor capacidade espumante. (ALUKO; MOFOLASAYO; WATTS, 2009; LAM et al., 2016)

O perfil de proteínas no isolado de ervilhas é composto em grande parte por globulinas das classes 7S e 11S, principalmente a legumina (Lg) e a vicilina (Vn), ambas proteínas com propriedades emulsificantes significativas. A legumina apresenta estrutura quaternária hexamérica, de massa molecular na faixa de 320 kDa, com subunidades alfa e beta ligadas por ligação bissulfeto, com subunidades ácidas (α -legumina) de massa molecular em torno de 40 kDa e subunidades básicas (β -legumina) de massa molecular em torno de 20 kDa. A vicilina é um trímero de massa molecular na faixa de 170 kDa, com subunidades alfa, beta e gama ligadas por interação hidrofóbica,

apresentando subunidades maiores de massa molecular na faixa de 47-50 kDa e subunidades menores com massa molecular de aproximadamente 25, 30 e 34 kDa. No PPI, ainda costumam estar presentes a convicilina, proteína com massa molecular na faixa de 70-75 kDa; e, em menores quantidades, lipogenase e inibidores de protease, com massas moleculares em torno de 93 kDa e 11,5 kDa, respectivamente. As estruturas da vicilina e da legumina podem ser observadas na *Figura 2.4*. (BARAC et al., 2010; GRIGA; HORÁČEK; KLENOTICOVÁ, 2007)

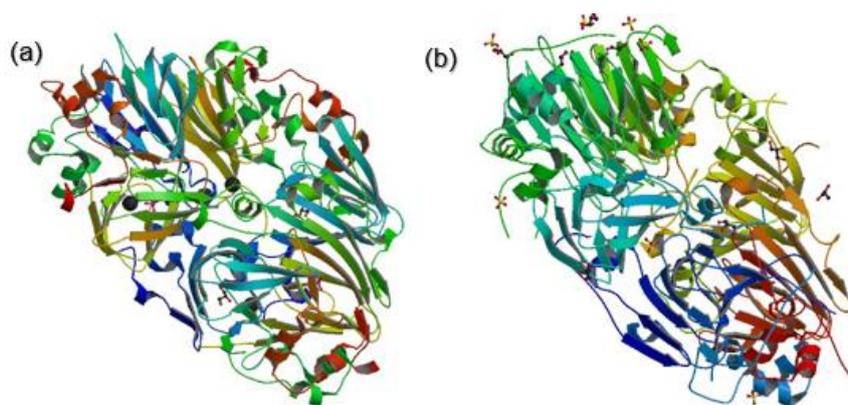


Figura 2.4 – Estrutura das proteínas: (a) vicilina de pinho coreano; (b) prolegumina de ervilha (JIN; WANG; ZHANG, 2013; TANDANG-SILVAS et al., 2009)

O genótipo e fatores ambientais já demonstraram afetar o conteúdo e composição do PPI, de modo que a razão entre essas proteínas (Vn/Lg) é considerado um fator que impacta as propriedades do produto. Entretanto, Lam *et al*, 2017, sugerem que, apesar da diferença de solubilidade, formação de espuma e na razão Vn/Lg, as diferenças de cultura e ambiente não causam diferenças de carga superficial, adsorção ao óleo e estabilidade de espuma e emulsão, portanto não sendo necessária sua especificação. (CHEN et al., 2018a; LAM et al., 2016, 2017)

Não existe um consenso entre qual destas proteínas apresenta melhores propriedades como emulsificante. Chen *et al*, 2018, afirmam que por ser menor e mais flexível, a legumina teria melhores efeitos emulsificantes. Barac *et al*, 2010, alegam que enquanto a legumina contém mais aminoácidos ricos em enxofre e é mais acessível de um ponto de vista nutricional, a vicilina ainda demonstra melhores propriedades emulsificantes. Porém, concluem que o genótipo com menor razão Vn/Lg mostrou a melhor estabilidade, pelo fato da legumina ter maior superfície hidrofóbica exposta que a vicilina, levando a uma maior adsorção na interface. Lam *et al*, 2016, ponderam que a

legumina possui uma conformação mais rígida e demonstra ser melhor na formação das emulsões enquanto a vicilina, devido à maior flexibilidade estrutural, apresenta propriedades melhores, formando emulsões mais estáveis. Comentam ainda que uma maior razão Vn/Lg demonstra maiores propriedades tensoativas na interface O/A. Yerramilli, Longmore e Ghosh, 2017, afirmam que usadas separadamente, ambas demonstram melhor estabilidade contra cremeação que o PPI. (BARAC et al., 2010; CHEN et al., 2018a; LAM et al., 2016; YERRAMILI; LONGMORE; GHOSH, 2017)

Tanto a legumina quanto a vicilina são globulinas, de modo que são relativamente pouco flexíveis e as emulsões formadas por elas são sensíveis a tratamento térmicos. Acima de uma temperatura crítica essas proteínas se desdobram, expondo grupos reativos que aumentam a tendência à floculação e coalescência.(LAM et al., 2016; MCCLEMENTS, 2004)

Contudo, alguns trabalhos afirmam que a dissociação e desdobramento das proteínas, por aumentar a superfície hidrofóbica, pode melhorar a estabilidade de emulsões. (GHARSALLAOUI et al., 2009; LAM et al., 2016)

Como já comentado, proteínas apresentam propriedades diferentes de emulsificação em diferentes pH's. O ponto isoelétrico do PPI é em torno de 4,3, de modo que nesse pH tem-se as piores propriedades possíveis para estabilização de uma emulsão. Gharsallaoui *et al*, 2009, observaram que em pH neutro (pH 7) as proteínas de ervilha adsorvem mais rápido na interface, porém formam um filme mais fino e não homogêneo; já em pH ácido (pH 2,4) tem-se uma distribuição de tamanhos mais homogênea e maior estabilidade contra cremeação. Eles propõe que em pH ácido as globulinas dissociadas formam redes viscoelásticas mais densas e fortes ao adsorver na interface O/A. Aluko, Mofolasayo e Watts, 2009, observaram que em pH 3 um aumento na concentração de PPI levava a um menor tamanho de gota, comportamento que não se repetia no pl e em pH neutro. Chao e Aluko, 2018, constataram que em pH 3 a proteína atinge o maior nível de desnaturação. (ALUKO; MOFOLASAYO; WATTS, 2009; CHAO; ALUKO, 2018; GHARSALLAOUI et al., 2009)

Quanto à distribuição de tamanhos de gotas na emulsão, o PPI pode levar a um perfil bimodal, como apresentado no trabalho de Yerramilli, Longmore e Ghosh, 2017. Nele, uma emulsão (5% O/A) com 5% de PPI apresenta um primeiro pico pequeno na

faixa de 0,1-1 μm , relativo ao real tamanho das gotas, e um segundo pico maior (em relação ao volume total da emulsão), na faixa de 10-100 μm devido à ocorrência de floculação e presença de agregados de PPI não adsorvida. Esse resultado indicou que foi utilizado uma quantidade muito grande de proteína, levando à agregação de gotas e proteína em excesso. (YERRAMILI; LONGMORE; GHOSH, 2017)

O PPI também vem sendo bastante estudado como um encapsulante de ingredientes como ácido ascórbico, α -tocoferol, óleo de linhaça, óleo de girassol e Miglyol; de modo geral se mostrando uma opção viável para este processo. (BAJAJ; TANG; SABLANI, 2015; DONSI et al., 2010; GHARSALLAOUI et al., 2012; PIERUCCI et al., 2006, 2007)

Como já comentado, um dos fatores que afeta a estabilidade em uma emulsão que utiliza o isolado proteico de ervilha é a relação entre as quantidades de cada tipo de proteína presente neste produto, em especial a relação entre legumina e vicilina, as duas em maiores quantidades. Diversas técnicas podem ser utilizadas para determinar essa composição a partir das diferenças em massa molecular e propriedades químicas, como ultracentrifugação, calorimetria e, a mais comum de ser utilizada, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). (LAM et al., 2016)

2.3 Estabilidade e Mecanismos de Desestabilização de Emulsões

Como já apresentado, emulsões são sistemas naturalmente instáveis, graças à tendência termodinâmica à separação de fases. Por conta disso, considera-se uma emulsão estável aquela que cuja velocidade da desestabilização for pequena o suficiente para garantir um tempo de prateleira razoável para o produto, a chamada estabilidade cinética. (MIRHOSSEINI et al., 2009)

Essa estabilidade cinética é determinada pela natureza dinâmica e pelas interações das gotas contidas em uma emulsão. Por conta do movimento Browniano, gravidade e outras forças externas, as gotas se encontram em movimento constante, sofrendo colisões frequentes. Dependendo da natureza das interações entre elas, isto é, da magnitude relativa das forças de atração (van der Waals) e de repulsão (estérica

e eletrostática), elas podem se afastar, permanecer em contato ou se fundir após uma colisão. (MCCLEMENTS, 2016)

Os principais mecanismos físicos de desestabilização são sedimentação, cremação, floculação, coalescência e amadurecimento de Ostwald (*Figura 2.5*). Na prática, dois ou mais desses mecanismos costumam atuar em conjunto, influenciando um ao outro. (MIRHOSSEINI et al., 2009)

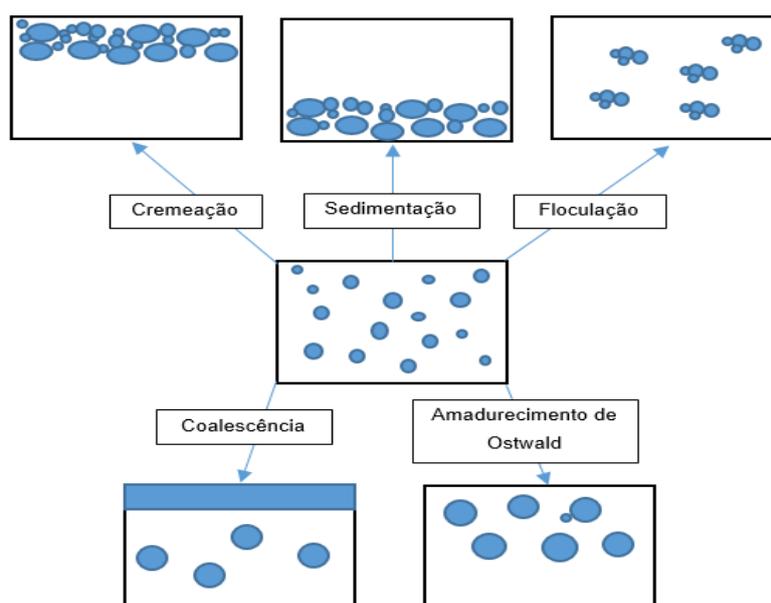


Figura 2.5 – Principais mecanismos de desestabilização de emulsões.

2.3.1 Separação Gravitacional: Cremação e Sedimentação

De modo geral, as duas fases presentes em uma emulsão possuem massas específicas diferentes, resultando em uma força gravitacional que atua sobre as gotas. Essa força gravitacional é responsável por duas das formas mais comuns de desestabilização de emulsões: a cremação e a sedimentação. Esse tipo de desestabilização é bastante ligado à perda de qualidade sensorial de emulsões alimentícias. (MCCLEMENTS, 2016)

Cremação é o nome dado à flotação das gotas dispersas de uma emulsão, se acumulando no topo de recipiente. Ela ocorre quando a fase oleosa é menos densa do

que a fase aquosa e é bastante comum nas emulsões de bebidas, devido à densidade relativamente baixa dos óleos essenciais responsáveis pelo sabor desses produtos. Sedimentação ocorre quando a densidade da fase oleosa é maior do que a da fase aquosa, havendo a deposição das gotas no fundo do recipiente. Como a cremação é um processo mais comum nas emulsões de bebidas, será dado maior destaque a esse mecanismo. (MCCLEMENTS, 2016)

Inicialmente, essa suspensão ocorre sem a perda da identidade individual das gotas, de modo que pode ser revertida sob aplicação de certa agitação. No entanto, o aumento de tempo de contato entre essas gotas pode levar à intensificação de outros processos de desestabilização, como a coalescência e o amadurecimento de Ostwald. (LAM et al., 2016; MCCLEMENTS, 2016)

Em um primeiro momento, a cinética de separação gravitacional – cremação ($\rho_1 < \rho_2$) ou sedimentação ($\rho_1 > \rho_2$) – pode ser aproximada pela Lei de Stokes (Eq. 6): (TAHERIAN et al., 2008)

$$U_{Stokes} = \frac{2gr^2(\rho_1 - \rho_2)}{9\eta_2} \quad \text{Eq. 6}$$

Em que U_{Stokes} é a velocidade de cremação/sedimentação da gota, g é a aceleração da gravidade, r é o raio da gota, ρ_1 é a densidade da fase dispersa, ρ_2 é a densidade da fase contínua e η_2 é a viscosidade da fase contínua.

No entanto, essa equação considera a gota uma partícula esférica rígida e isolada, suspensa em um líquido ideal, gerando desvios entre o calculado e o observado experimentalmente. Alguns dos fatores que podem afetar a acurácia dessa equação são: fluidez da gota, distribuição de tamanhos de gotas, ocorrência de floculação, fase aquosa não newtoniana, gotas com cargas elétricas e o movimento Browniano. Além disso, de modo geral, a velocidade de cremação das gotas em emulsões concentradas é menor do que em emulsões diluídas por conta das interações hidrodinâmicas entre elas. (MCCLEMENTS, 2016)

Além disso, Buffo e Reineccius, 2001, mostraram a dependência da velocidade de suspensão de uma emulsão de bebida com óleo de laranja e goma arábica com a temperatura (devido à redução na viscosidade). Nesse estudo, a cremação aumentou

em 10 vezes entre a menor ($T=4^{\circ}\text{C}$) e a maior ($T=55^{\circ}\text{C}$) temperatura. (BUFFO; REINECCIUS, 2001)

Dessa forma, para se controlar a separação gravitacional, deve-se: minimizar a diferença de densidades (agentes de peso); redução do tamanho das gotas (maior homogeneização); modificar a reologia (aumento da viscosidade da fase aquosa); ou aumento da concentração de gotas, quando possível. (MCCLEMENTS, 2016)

2.3.2 Floculação

Floculação é o processo de agregação reversível ou irreversível de gotículas dispersas, que ocorre quando as forças atrativas de van der Waals excedem as forças repulsivas do sistema, sem a perda de integridade individual das gotas. A taxa de floculação depende, principalmente, da frequência e efetividade de colisões entre as gotas. (LAM et al., 2016; MCCLEMENTS, 2016)

A floculação acelera a taxa de cremação, principalmente em emulsões diluídas, devido ao aumento no raio efetivo do aglomerado ser maior que das gotas individuais. Por outro lado, a floculação tende a aumentar a viscosidade do sistema, algo que quando controlado pode ser positivo para a estabilidade, exceto em casos em que a baixa viscosidade é um fator sensorial importante. Além disso, devido ao aumento de tempo de contato entre as gotas, a floculação costuma anteceder a coalescência e ruptura do sistema. (MCCLEMENTS, 2016)

Em bebidas refrigerantes finalizadas, a concentração de gotículas de óleo é tão baixa que a floculação costuma ser reversível, de modo que os agregados podem ser redispersos com o fornecimento de uma quantidade pequena de energia, em relação à necessária para homogeneização. (BUFFO; REINECCIUS, 2001)

2.3.3 Coalescência

Coalescência ocorre quando duas ou mais gotas se aproximam a ponto do filme separando a fase contínua da fase dispersa ser rompido, resultando na fusão irreversível

dessas gotas em gotas maiores. Dessa forma, os fatores determinantes para que este mecanismo aconteça são: fenômenos responsáveis pelo encontro das gotas (movimento Browniano, turbulência e gravidade); a natureza das interações entre elas; e a resistência desse filme interfacial à ruptura (altamente dependente do emulsificante utilizado). (LAM et al., 2016; MCCLEMENTS, 2016)

Por conta desse último ponto, as gotas em muitas emulsões não conseguem agregar-se pela utilização de emulsificantes iônicos, como proteínas, que adsorvem na superfície da gota, evitando a coalescência por repulsão eletrostática. (DICKINSON, 1994; MCCLEMENTS, 2004)

Esse mecanismo é o principal responsável por levar uma emulsão para o seu estado termodinâmico mais estável (isto é, à sua ruptura), devido à redução da área de contato entre as fase aquosa e oleosa. Além disso, devido ao aumento no tamanho das gotas, a coalescência também aumenta a velocidade de separação gravitacional. (BUFFO; REINECCIUS, 2001; MCCLEMENTS, 2016)

A revisão de Taherian *et al*, 2008, traz duas formas de se calcular a taxa de coalescência (k_c). A Eq. 7 parte de uma cinética de 1ª ordem, onde N_0 e N_t são o número de gotas por unidade de volume no início e em um instante t , respectivamente. A Eq. 8 a determina pela mudança no diâmetro médio das gotas no sistema no início (D_0) e em um instante t (D_t): (TAHERIAN et al., 2008)

$$N_t = N_0 \exp(-k_c t) \quad \text{Eq. 7}$$

$$\ln\left(\frac{D_t}{D_0}\right) = \frac{1}{3k_c t} \quad \text{Eq. 8}$$

2.3.4 Amadurecimento de Ostwald

O amadurecimento de Ostwald é um processo de transferência de massa das gotas menores para as gotas maiores, através da difusão pela fase contínua, resultando no aumento do tamanho médio das gotas do sistema. Para esse processo ocorrer é necessário que a fase dispersa tenha uma certa solubilidade na fase contínua, sendo portanto significativo em emulsões de bebidas que utilizam óleos essenciais de sabor,

com solubilidade relativamente alta (comparado por exemplo a triglicéridos de cadeias longas). (BUFFO; REINECCIUS, 2001; MCCLEMENTS, 2016)

De modo similar ao efeito da redução do tamanho de uma gota no aumento da sua pressão de vapor – fenômeno descrito pela equação de Kelvin (Eq. 9) – quanto menor for uma gota, maior será a solubilidade da fase dispersa na fase contínua. Dessa forma, em um sistema polidisperso, ao redor das gotas menores há uma maior concentração de moléculas da fase dispersa dissolvidas do que ao redor das gotas maiores. Por conta desse gradiente de concentração, ocorre a difusão de moléculas da fase dispersa das gotas menores para as maiores, aumentando assim o tamanho médio da distribuição. (ALMEIDA, 2012; WEISS; HERRMANN; MCCLEMENTS, 1999)

$$RT \ln \left(\frac{S_{12}^k}{S_{12}} \right) = \frac{2\gamma V_m}{r} \quad \text{Eq. 9}$$

Em que R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, S_{12}^k é solubilidade da fase 1, em forma de gota, na fase 2, S_{12} é a solubilidade da fase 1 na fase 2 em uma superfície plana, V_m é o volume molar, γ é a tensão interfacial e r é o raio da gota.

O trabalho de Buffo e Reineccius, 2001, demonstrou que em emulsões de bebidas o amadurecimento de Ostwald é altamente significativo, podendo ser até mais importante do que a coalescência sobre a estabilidade da emulsão. (BUFFO; REINECCIUS, 2001)

Os métodos de controle deste mecanismo são a redução largura da distribuição de tamanhos, a redução da tensão interfacial e o aumento da espessura da camada de emulsificante. Devido ao efeito da diluição das emulsões de bebidas, o estreitamento da distribuição de tamanhos é o método mais efetivo. (BUFFO; REINECCIUS, 2001)

2.3.5 Estabilidade Química

Além dos mecanismos de instabilidade física descritos acima, também existem reações químicas que podem afetar a qualidade de uma emulsão, em especial a perda

de cor, perda de sabor e oxidação de lipídios, resultando em sabores desagradáveis. (MCCLEMENTS, 2016)

Quanto menor a concentração do óleo utilizado, maior sua propensão à oxidação. Carotenoides (muito utilizados como corantes em alimentos) são bastante susceptíveis à oxidação, mas esta pode ser minimizada pela utilização de um óleo com maior resistência a esse tipo de degradação. A degradação de lipídios e carotenoides em emulsões dependem do nível de dispersão da fase oleosa, concentração e tipo de lipídio, temperatura, luz e pH. (SZTERK; ROSZKO; GÓRNICKA, 2013)

Weigel *et al*, 2018, testaram a utilização de diversos antioxidantes (EDTA, α -tocoferol, catequina, ácido ascórbico) para tentar reduzir a oxidação da luteína, no entanto apenas o ácido ascórbico apresentou alguma capacidade de inibir a oxidação, enquanto os demais acabaram favorecendo essa degradação. (WEIGEL *et al.*, 2018)

2.4 Encapsulamento

Encapsulamento é o processo em que substâncias ativas ou sensíveis são envolvidas em uma cobertura (que pode ser tanto homo quanto heterogênea) para obter uma estrutura específica. Os materiais utilizados como encapsulantes (também chamados de “paredes”) devem ser de qualidade alimentar, biodegradáveis, compatíveis com a substância ativa, e providenciar estabilidade máxima durante e após o processamento, com boas propriedades funcionais e reológicas. Além disso, não podem afetar negativamente aparência, estabilidade, textura e sabor dos produtos. (SHARIF *et al.*, 2018; YANG; MCCLEMENTS, 2013)

Carboidratos são normalmente preferidos para uso como parede devido à baixa viscosidade em altas concentrações e boas propriedades de formação de filmes (BAJAJ; TANG; SABLANI, 2015).

No entanto, há também diversos estudos com proteínas (PPI, *whey*, gelatina); surfactantes (Tween 80); ou saponinas (*Quillaja saponina*). (FUSTIER *et al.*, 2015; PIERUCCI *et al.*, 2007; YANG; MCCLEMENTS, 2013)

Um dos principais objetivos de se fazer o encapsulamento de ingredientes ativos é para impedir a degradação destes. Alguns ativos são instáveis durante a produção, transporte ou armazenamento dos produtos comerciais, enquanto outros são altamente susceptíveis à degradação devido a reação com outros compostos na formulação do alimento ou bebida. Outra razão pode ser para mascarar um sabor desagradável do ingrediente. (MCCLEMENTS, 2016)

Alguns dos mais importantes tipos de compostos passíveis de encapsulamento são: vitaminas, minerais, fármacos, sabores, cores e preservantes; cada um com propriedades e necessidades funcionais específicos, exigindo sistemas específicos para estabilização. Para a indústria de alimentos e bebidas, encontraram-se trabalhos com vitaminas (ácido ascórbico e α -tocoferol), corantes (β -caroteno) e compostos com benefícios à saúde (óleo de linhaça, curcumã). (BAJAJ; TANG; SABLANI, 2015; GASPAR, 2015; KHARAT; ZHANG; MCCLEMENTS, 2018; MCCLEMENTS, 2016; PIERUCCI et al., 2006, 2007; YANG; MCCLEMENTS, 2013)

Emulsões O/A são o tipo de emulsão mais utilizado atualmente para encapsular ingredientes lipofílicos, apesar de certas desvantagens como a possibilidade de quebra da emulsão com o tempo ou quando exposta a estresses na produção, transporte, armazenamento ou utilização. Por conta disso, tem-se aumentado bastante o interesse em tipos alternativos de emulsões como emulsões multicamadas, nanoemulsões, emulsões múltiplas, entre outros. Cada tipo de emulsão apresenta suas vantagens e suas desvantagens, contudo, esses métodos alternativos são geralmente mais complexos, mais difíceis de preparar e às vezes até mesmo mais instáveis. (CHEN et al., 2018b; DONSI et al., 2010; FUSTIER et al., 2015; MCCLEMENTS, 2016)

A eficiência de encapsulamento (EE) pode ser medida diretamente pela determinação da quantidade de composto encapsulado, ou calculada pela mensuração da fração de composto ativo que permanece livre (A_{livre}) após a formação da emulsão, Eq. 10: (CHEN et al., 2018b)

$$EE = 100 * \frac{A_{total} - A_{livre}}{A_{total}} \quad \text{Eq. 10}$$

Além disso, Bajaj, Tang e Sablani, 2015, concluíram que o aumento da quantidade de composto ativo por quantidade de encapsulante reduz a EE; e Fustier *et al*, 2015,

afirmam que as propriedades e funcionalidades das micropartículas formadas (EE, liberação, proteção contra oxidação) podem ser modeladas ao variar a espessura e composição da parede. (BAJAJ; TANG; SABLANI, 2015; FUSTIER et al., 2015)

Alguns possíveis benefícios de se fazer o encapsulamento de compostos ativos em emulsões são resumidos na *Tabela 2.2*:

Tabela 2.2 – Benefícios do Encapsulamento (SHARIF et al., 2018)

Benefícios do encapsulamento
Liberação controlada (em um alvo específico)
Maior tempo de retenção no organismo
Melhora de bioacessibilidade
Ferramenta para enriquecimento e fortificação de alimentos
Desenvolvimento de novas formulações de alimentos
Melhor estabilidade (contra condições severas de ambiente e processamento)
Melhor estabilidade ao manuseio
Economia (menor uso da substancia ativa)
Melhora em características sensoriais

2.5 Propriedades que afetam a estabilidade das emulsões

2.5.1 Tensão Superficial e Ângulo de Contato

O fenômeno da tensão superficial, ou interfacial, é explicado em termos das forças de interação intermoleculares presentes. Em média, as moléculas presentes nas interfaces de um líquido estão sujeitas a um desequilíbrio de forças atrativas, enquanto no interior do líquido (“bulk”) são sujeitas a forças equivalentes em todas as direções, como representado na *Figura 2.6*. Devido a esse desequilíbrio de forças, as moléculas na superfície se encontram em um estado energético superior ao das moléculas no bulk e a resultante dessa forças, no sentido do interior do líquido, tende a minimizar a superfície líquida. Isso faz com que a superfície se contraia e explica a tendência de

gotas e bolhas adotarem a forma esférica. (ADAMSON; GAST, 1997; ALMEIDA, 2012; SHAW, 1992)

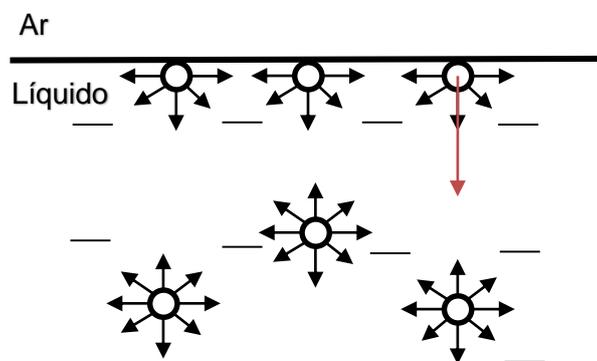


Figura 2.6 – Forças atrativas entre moléculas na superfície e no bulk

Uma de suas principais definições é que tensão superficial, também chamada de energia livre de superfície, é o trabalho requerido para se aumentar reversível e isotermicamente a área de uma superfície em uma unidade de medida, podendo então ser representada em unidades de energia por área (ergs/cm^2 ou J/m^2) ou em unidade de força por comprimento (mN/m). Ela também pode ser definida como a força necessária para se levar uma molécula do bulk para a superfície. (ADAMSON; GAST, 1997; SHAW, 1992)

Vale ressaltar que não há uma diferença conceitual entre os termos superfície e interface, de modo que seu uso é intercambiável. Entretanto, costuma-se adotar superfície quando uma das fases presentes é gasosa e interface quando a fronteira é entre duas fases não-gasosas. (SHAW, 1992)

Devido à força das ligações de hidrogênio, líquidos polares, como a água, estão sujeitos a fortes interações intermoleculares e, conseqüentemente, apresentam elevadas tensões superficiais. A utilização de moléculas orgânicas com caráter anfifílico, como surfactantes ou proteínas, tira proveito da tendência destes materiais de se concentrarem nas interfaces, resultando na diminuição da energia livre do sistema e favorecimento da formação de emulsões. (ALMEIDA, 2012; GASPAR, 2015)

A tensão interfacial influencia no tamanho e estabilidade das gotas formadas em emulsões, estando relacionada com diversas características como a taxa de adsorção, reologia interfacial e concentração superficial em excesso. (MCCLEMENTS, 2016)

Uma propriedade interessante relacionada à tensão superficial é a chamada molhabilidade, que pode ser avaliada pelo teste do ângulo de contato.

O comportamento de uma gota ou uma bolha sobre uma superfície sólida pode ser descrito pelo perfil obtido pelo equilíbrio das forças resultantes das três tensões interfaciais presentes, entre as fases sólida, líquida e gasosa, como demonstrado pela equação de Young (Eq. 11). (HARTLAND, 2004; LAW; ZHAO, 2016)

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} = \gamma_{LG} * \cos \theta \quad \text{Eq. 11}$$

Em que γ_{SG} , γ_{SL} e γ_{LG} são as tensões interfaciais sólido-gás, sólido-líquido e líquido-gás, respectivamente, e θ é o ângulo de contato, ângulo entre a superfície sólida e a interface líquido-gás, como pode-se observar na *Figura 2.7*.

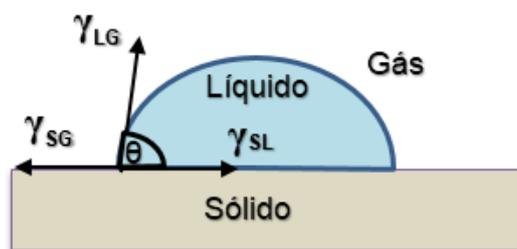


Figura 2.7 – Representação do ângulo de contato observado pelo método de gota sessil.

Devido à dificuldade de se determinar individualmente as tensões superficiais relativas à fase sólida (lado esquerdo da equação de Young), costuma-se discutir o comportamento do molhamento utilizando apenas o ângulo de contato, a tensão interfacial líquido-gás e a diferença entre essas outras tensões. Desse modo, tem-se que quando a diferença entre as tensões no sólido é grande o suficiente para que o ângulo de contato seja pequeno ($\theta < 90^\circ$), pode-se dizer que o sólido é molhado pelo líquido. (HARTLAND, 2004)

Quando o líquido escolhido para esse teste é a água, a realização desse teste leva à conclusão sobre a hidrofiliicidade ($\theta < 90^\circ$) ou hidrofobicidade ($\theta > 90^\circ$) do material estudado.

2.5.2 Natureza do filme estabilizando a interface

Uma monocamada de Langmuir é um filme superficial formado por uma única camada de moléculas, resultante da orientação de moléculas anfifílicas para minimizar a energia livre de superfície do sistema. (PETTY, 1996)

A tensão superficial de um líquido é afetada pela presença de uma monocamada na superfície deste. Esta variação costuma ser medida na forma de pressão superficial, um análogo bidimensional da pressão, que corresponde à diferença entre a tensão superficial do líquido puro e da superfície coberta (Eq. 12). (GIRARD-EGROT; GODOY; BLUM, 2005; PETTY, 1996)

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Eq. 12}$$

Em que Π é a pressão superficial, γ_0 é a tensão superficial do líquido puro e γ é a tensão superficial na presença do surfactante.

Quando a distância entre as moléculas é grande, elas apresentam pouca interação entre si, tendo pouco efeito sobre a tensão superficial ($\Pi \sim 0$). Esse estado costuma ser associado a uma fase gasosa bidimensional. Com a redução da área disponível para essa monocamada, por exemplo por uma barreira móvel, essas moléculas começam a exercer um efeito repulsivo entre si, aumentando a pressão superficial e se organizando cada vez mais, de modo análogo ao que ocorre tridimensionalmente com o aumento da pressão em mudanças de fase gás-líquido-sólido, como pode ser visto na *Figura 2.8*. (GIRARD-EGROT; GODOY; BLUM, 2005; PETTY, 1996)



Figura 2.8 – Orientação das moléculas nas fases: (a) gás, (b) líquido, (c) sólido. (Adaptado de HANN, 1990)

A pressão superficial aumenta continuamente com a redução da área disponível até atingir o ponto de colapso da monocamada, em que as moléculas são expulsas da monocamada, sobrepondo-se umas às outras de forma desordenada e causando a redução da pressão superficial. (ALMEIDA, 2012; PETTY, 1996)

É utilizada a Balança de Langmuir para acompanhar a variação da pressão de superfície à medida em que se manipula a área molecular disponível, possibilitando assim a obtenção de uma isoterma de compressão (Figura 2.9). A análise de isotermas de compressão fornece informações sobre a existência de fases de transição, a estabilidade da monocamada na interface água-ar e a ocorrência das reorientações das moléculas. (GIRARD-EGROT; GODOY; BLUM, 2005)

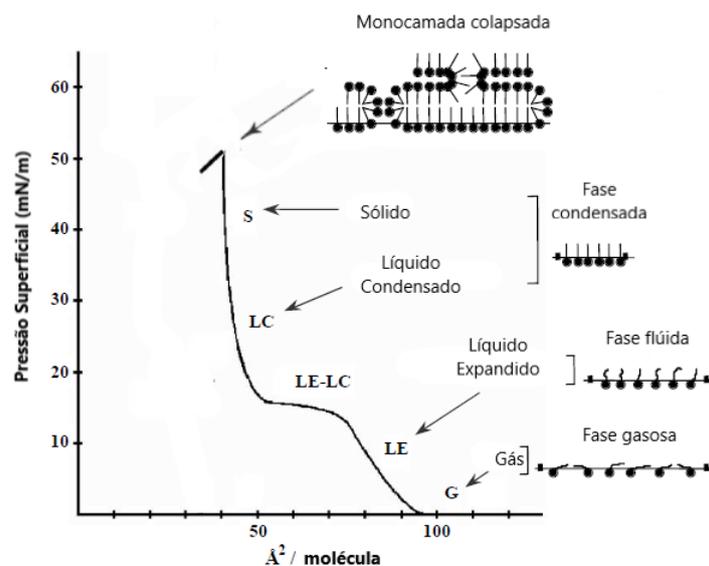


Figura 2.9 – Isoterma de compressão de um fosfolípido. (Adaptado de GIRARD-EGROT; GODOY; BLUM, 2005)

A elasticidade do filme formado pode ser calculada pela Eq. 13: (LANGEVIN, 2000)

$$\varepsilon = -A \frac{d\Pi}{dA} \quad \text{Eq. 13}$$

Em que ε é a elasticidade de um filme formado na interface, Π é a pressão superficial e A é a área interfacial.

2.5.3 Tamanhos de Gotas

A distribuição dos tamanhos de gotas influencia diretamente em diversas propriedades das emulsões, como textura, perfil sensorial e características de liberação no organismo, assim como na reologia, propriedades ópticas e, principalmente, na estabilidade dessas emulsões. Emulsões com gotas maiores tendem a ter menor estabilidade, com maior ocorrência de floculação e coalescência, do que aquelas com gotas menores, como exemplificado pelo estudo de Rezvani, Schleining e Taherian em 2012. De acordo com a lei de Stokes (Eq. 6), a velocidade de cremação de uma gota é proporcional ao quadrado do seu raio, de modo que a estabilidade da emulsão será maior quando a maioria das gotas for menor. (MCCLEMENTS, 2016; REZVANI; SCHLEINING; TAHERIAN, 2012; TAHERIAN et al., 2008)

Quando todas as gotas em uma emulsão apresentam o mesmo tamanho, refere-se a ela como monodispersa. No entanto, de modo geral, emulsões apresentam uma distribuição de tamanhos, sendo assim polidispersas. As emulsões polidispersas podem ainda ser caracterizadas como monomodais, bimodais ou multimodais, de acordo com a quantidade de picos na distribuição. (MCCLEMENTS, 2007)

Tamanhos médios de gotas são geralmente calculados pelo produto de um fator de ponderação pelo parâmetro de dimensão da gota (ex: diâmetro), sendo os diâmetros ponderados pelo número (d_{10}), pela superfície (d_{32}) ou pelo volume (d_{43}), Eq. 14, 15 e 16, respectivamente; os três mais comuns utilizados. De modo geral, o d_{43} é mais útil do que os demais para detectar pequenas quantidades de floculação e coalescência em uma emulsão. Técnicas diferentes de caracterização determinam valores diferentes

para o tamanho, por exemplo técnicas de espalhamento de luz de laser retornam o valor de d_{43} , enquanto microscopia retorna de d_{10} . (MCCLEMENTS, 2016)

$$d_{10} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \quad \text{Eq. 14}$$

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{Eq. 15}$$

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad \text{Eq. 16}$$

Em alguns casos saber o tamanho médio das partículas é o suficiente, contudo, quando for necessário saber a distribuição completa de tamanhos, a melhor forma de se representar essa distribuição é através de um histograma. Um histograma é construído se dividindo a distribuição em classes de tamanhos e contabilizando a concentração de gotas de cada classe. A concentração de gotas em uma emulsão pode ser expressa em razão volumétrica ou em razão numérica. Essa distinção pode ser importante em casos em que uma quantidade numericamente inexpressiva de gotas grandes pode representar um volume expressivo da emulsão, como mostrado na *Figura 2.10*. (MCCLEMENTS, 2007, 2016)

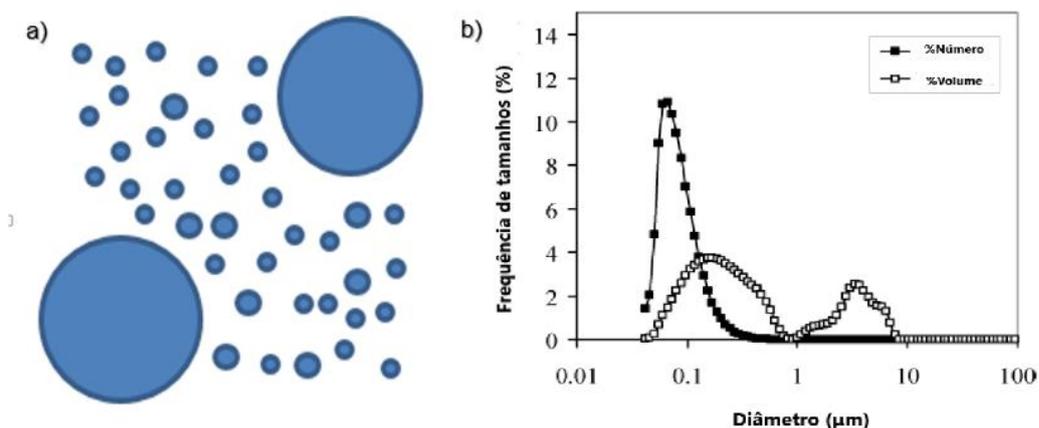


Figura 2.10 – Distribuição de tamanho de partículas de uma emulsão - (a) - representada como percentual numérico ou volumétrico versus diâmetro de partícula (b). (Adaptado de MCCLEMENTS, 2007)

Para a formação de gotas menores, Yang e McClements, em 2013, concluíram que devem-se utilizar uma fase aquosa com maior viscosidade possível em conjunto

com uma fase oleosa de baixa viscosidade. Soleimanpour, Koochehi e Kadkhodae, também em 2013, constataram que, para o mesmo objetivo, deve-se utilizar menores concentrações de óleo e maiores concentrações de emulsificante. (SOLEIMANPOUR; KOOCHKEI; KADKHODAE, 2013; YANG; MCCLEMENTS, 2013)

Como já comentado, pode-se utilizar diversas técnicas para medição do tamanho de partículas, em especial a microscopia óptica e o espalhamento dinâmico de luz (DLS). De modo geral, para que essas técnicas sejam devidamente realizadas, pode ser necessário fazer a diluição da emulsão, principalmente no caso do DLS que requer uma baixa interação entre partículas, pela utilização da equação de Stokes-Einstein (Eq. 17)

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta_1 D} \quad \text{Eq. 17}$$

Em que k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, D é o coeficiente de difusão translacional das partículas e η_1 é a viscosidade da fase contínua.

2.5.4 Potencial Zeta

Ao se dispersar um nanomaterial em um meio líquido, pode-se obter uma suspensão do tipo coloidal capaz de adquirir carga por diversos mecanismos. Quanto maior for a magnitude dessa carga, maior será a intensidade das forças de repulsão eletrostática entre as partículas. (BUTT; GRAF; KAPPL, 2003)

É possível caracterizar as propriedades elétricas desse sistema de partículas dispersas através do seu potencial zeta. O sistema formado pelas partículas carregadas mais os contra-íons em solução se chama dupla camada elétrica, onde a camada mais interna constitui a camada de Stern e a camada externa constitui a camada difusa. O potencial zeta (ζ) ou potencial eletrocinético é o potencial no plano de cisalhamento, isto é, na região em que termina a camada de Stern e começa a camada difusa, como pode-se observar na *Figura 2.11*. O potencial zeta é uma medida da diferença do potencial elétrico das partículas em suspensão e o meio em que estão suspensas. (BUTT; GRAF; KAPPL, 2003; MCCLEMENTS, 2007, 2016; MIRHOSSEINI et al., 2007)

A característica elétrica na superfície da partícula depende do tipo e concentração das espécies carregadas presentes, assim como das propriedades físicas e da composição iônica do líquido circundante. (ALMEIDA, 2012)

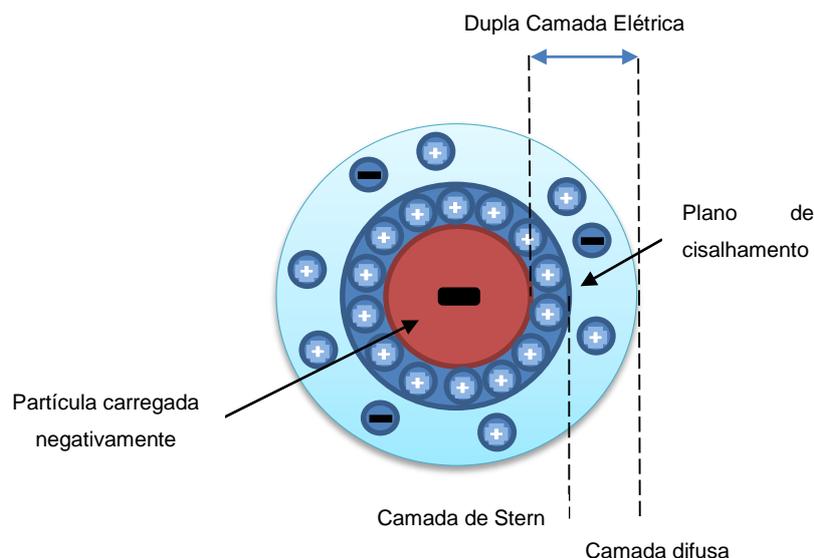


Figura 2.11 - Representação esquemática do potencial zeta

A determinação do potencial zeta pode ser feita a partir do fenômeno eletrocinético da eletroforese. O cálculo pode ser feito a partir da equação de Smoluchowski (Eq. 18):

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\nu}{\varepsilon_d\varepsilon_0} \quad \text{Eq. 18}$$

onde η é a viscosidade do meio, ν é a mobilidade eletroforética, ε_d é a constante dielétrica e ε_0 é a permissividade do ar.

Sistemas contendo emulsões 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 da 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. (GASPAR, 2015)

A interação entre as gotas é afetada 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. (MIRHOSSEINI 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. O pH em que o potencial zeta é zero ($\zeta = 0$) é chamado de ponto isoelétrico (pI).

2.5.5 Índice de Estabilidade

O método mais simples para se acompanhar a separação de fases em emulsões é pela observação visual. Para isso, deixa-se uma amostra da emulsão em repouso por uma certa quantidade de dias, em um recipiente transparente, de modo que se possa observar a formação de camadas. Ao se demarcar as alturas das camadas formadas, pode-se determinar a extensão de separação de acordo com índice de estabilidade, Eq. 19. Dessa forma, quanto maior esse índice, maior a estabilidade da emulsão. (ALMEIDA, 2012; MCCLEMENTS, 2007)

$$IE = 100 * \frac{V_E}{V_T} \quad \text{Eq. 19}$$

Em que IE é o índice de estabilidade, V_E é o volume da camada composta pela emulsão e V_T é volume total presente no recipiente.

2.5.6 Reologia

Reologia é o nome dado ao estudo das propriedades dos materiais em relação ao modo como estes fluem e se deformam ao serem submetidos a forças externas. Os principais testes realizados para se caracterizar a reologia são de cisalhamento estacionário (velocidade angular constante), oscilatório e rotacional, que são usados para estudar, respectivamente, a curva de escoamento, as propriedades viscoelásticas da amostra, e o comportamento de escoamento do produto. (SCHRAMM, 2000)

Dessa forma, é possível separar os materiais em dois tipos: sólidos ideais e fluidos ideais. Sólidos ideais são aqueles que se deformam elasticamente ao serem submetidos a uma tensão, retornando ao estado inicial e recuperando a energia requerida para deformação quando essa tensão é retirada. Fluidos ideais são líquidos e gases que fluem devido à aplicação de tensão, se deformando irreversivelmente de modo que a energia utilizada para a deformação é dissipada na forma de calor, não sendo recuperada com a retirada da tensão. (SCHRAMM, 2000)

Todavia, de modo geral corpos reais não apresentam comportamento completamente elástico de sólidos ideais ou viscoso de fluidos ideais, e sim algo entre essas duas categorias, podendo então ser chamados de viscoelásticos. (MCCLEMENTS, 2016)

Viscosidade

Viscosidade é uma propriedade de escoamento de um fluido que depende intrinsecamente da natureza do material, e está relacionada à resistência a fluir imposta pelo atrito de suas camadas internas, de modo que quanto maior for a viscosidade de um fluido, maior a força necessária para movê-lo. Essa propriedade foi definida inicialmente por Isaac Newton, para líquidos ideais, como uma constante relacionando a taxa de cisalhamento (gradiente de deformação do material) com a tensão de cisalhamento (força aplicada tangencialmente em uma área, causando uma deformação na camada líquida), de acordo com a Eq. 20. (SCHRAMM, 2000; STEFFE, 1996)

$$\tau = \eta * \dot{\gamma} \quad \text{Eq. 20}$$

Em que τ é a tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}) e η é a viscosidade (Pa.s).

Além da natureza físico-química do material, a viscosidade também depende de outros fatores, como temperatura (geralmente inversamente proporcional) e pressão (diretamente proporcional); tempo de atuação da deformação, chamados de fluidos tixotrópicos (quando a viscosidade diminui com o tempo) ou reopéticos (quando viscosidade aumenta com o tempo); e taxa de cisalhamento, classificados com fluidos

newtonianos (viscosidade é independente da taxa de cisalhamento) e não-newtonianos (viscosidade varia com a taxa). (SCHRAMM, 2000)

Pode-se ainda subdividir os fluidos não-newtonianos em: pseudoplásticos, quando a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (ex.: concentrado de suco de laranja, molhos para saladas); dilatantes, quando a viscosidade aumenta com aumento da taxa (ex.: soluções concentradas de amido, lama, argila); e viscoplásticos, ou fluidos de Bingham (ex.: pasta de dente, tintas, pasta de tomate), fluidos que formam uma rede intermolecular quando em repouso, elevando a viscosidade de modo que o fluxo só inicia quando a tensão aplicada supera as forças de reticulação, colapsando a estrutura. Esses comportamentos podem ser observados na *Figura 2.12*. (SCHRAMM, 2000; STEFFE, 1996)

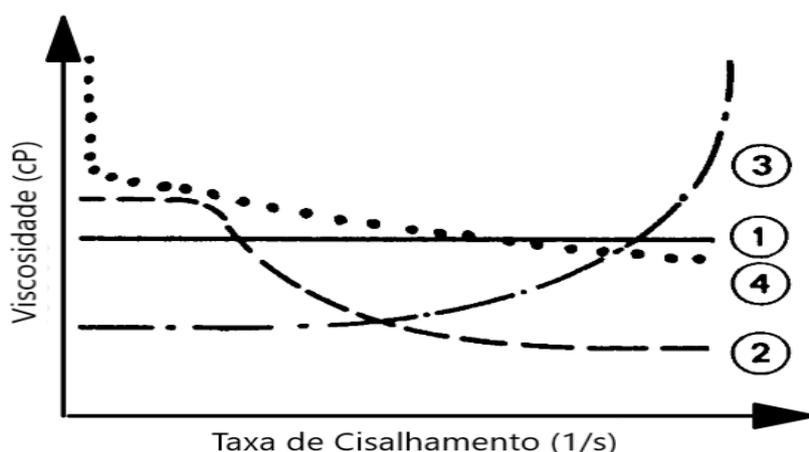


Figura 2.12 – Possíveis comportamentos de fluidos: (1) Newtoniano, (2) Pseudoplástico, (3) Dilatante, (4) Bingham (Adaptado de SCHRAMM, 2000)

A maioria das emulsões apresenta comportamento pseudoplástico. Esse tipo de fluido permanece em estado desordenado quando em repouso, passando a se orientar na direção do escoamento ao ser submetido a uma tensão de cisalhamento. Com o aumento da tensão aplicada, ocorre um maior ordenamento, consequentemente reduzindo a viscosidade aparente, como visto na *Figura 2.13*. Isso ocorre, pois as interações hidrodinâmicas são de maior alcance que as interações coloidais. (SCHRAMM, 2000; TADROS, 2009)

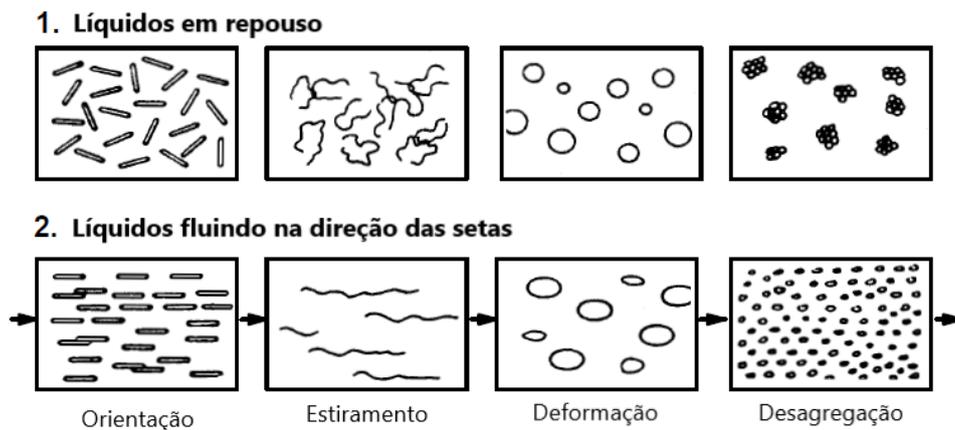


Figura 2.13 – Representação do ordenamento de um líquido submetido a cisalhamento (Adaptado de SCHRAMM, 2000)

Módulo Elástico e Módulo Viscoso

Além da análise da variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento, outro tipo de ensaio pode ser feito para complementar o estudo da reologia: os testes dinâmicos.

Nesse tipo de teste, aplica-se uma tensão oscilatória nas amostras, normalmente seguindo uma função senoidal (Eq. 21), relacionando a frequência (ω) dessas oscilações à viscosidade e elasticidade das amostras. (SCHRAMM, 2000)

$$\tau = \tau_0 \text{sen}(\omega * t) \quad \text{Eq. 21}$$

Uma varredura de frequências proporciona dados do módulo complexo G^* , a resistência total de uma substância ao stress aplicado, e do ângulo de mudança de fase δ , que representa a proximidade da substância a um material viscoso ($\delta=90^\circ$) ou elástico ($\delta=0^\circ$). De modo geral, géis apresentam ângulos de fase menores que 45° . (MCCLEMENTS, 2016; SCHRAMM, 2000)

Com esses dados, o módulo complexo pode ser dividido em dois: o módulo elástico, ou módulo de armazenamento, G' (Eq. 22); e o módulo viscoso, ou módulo de perda, G'' (Eq. 23).

$$G' = G^* \cos(\delta) \quad \text{Eq. 22}$$

$$G'' = G^* \sin(\delta) \quad \text{Eq. 23}$$

Tipicamente para líquidos viscoelásticos, os módulos viscoso e elásticos aumentam com o aumento da frequência, sendo que em baixas frequências o componente viscoso é maior do que o componente elástico, e em altas frequências esse comportamento é invertido. A partir de uma determinada frequência, o módulo viscoso atinge um valor máximo, a partir do qual o subsequente aumento na frequência resulta na redução desse módulo. (TADROS, 2009)

De modo geral, os resultados de testes dinâmicos avaliados são a frequência em que as curvas se interceptam e suas inclinações. O comportamento das curvas também pode ser utilizado para se avaliar a formação de reticulação de cadeias poliméricas. (SCHRAMM, 2000)

Reologia Interfacial

O estudo das propriedades reológicas de interfaces ajuda a compreender melhor as interações de moléculas tensoativas na camada interfacial de emulsões, existindo uma correlação entre as propriedades viscoelásticas dos filmes na interface e a estabilidade das gotas contra a coalescência. (TADROS, 2009)

Existem duas formas principais de se estudar o comportamento reológico de interfaces. Uma forma é observar como diferentes regiões da interface se comportam entre si sob tensão, sem alteração da área interfacial, podendo-se medir a deformação interfacial cisalhante, bastante semelhante à medição do comportamento do bulk. Alternativamente, pode-se observar o comportamento da área de uma gota sujeita a expansões e contrações, e determinar a resistência do filme a essa dilatação, chamada de deformação interfacial dilatacional. No caso da deformação dilatacional costuma estudar a reologia por meio da elasticidade interfacial dilatacional (ϵ^*), que, assim como o módulo complexo G^* , pode ser separada em um módulo elástico (ϵ') e um módulo viscoso (ϵ''). (MCCLEMENTS, 2016)

A reologia dilatacional é determinada pela concentração de emulsificante, estrutura molecular e condições do meio, e depende da relação da taxa com que as moléculas tensoativas adsorvem na interface com a mudança na área interfacial. Ao se dilatar a gota, uma maior quantidade de emulsificante pode adsorver, de modo que quanto mais rápida for essa adsorção, menor é o módulo de dilatação dessa interface. (MCCLEMENTS, 2016)

Emulsificantes como proteínas e polissacarídeos, que tendem a reticular ou se emaranhar, costumam formar camadas interfaciais com maior viscosidade e módulo elástico, sendo bastante influenciados pela temperatura, pH e força iônica, responsáveis pelas forças de interação das moléculas adsorvidas nas interfaces. (MCCLEMENTS, 2016)

Reologia de Emulsões de Alimentos

A reologia é importante para emulsões por diversos fatores. O tempo de prateleira (devido à relação entre cremeação e viscosidade) de diversas emulsões de alimentos, e até mesmo fatores organolépticos (cremosidade, textura, etc), são dependentes de suas propriedades reológicas. Além disso, medidas dessa propriedades podem fornecer informações sobre a força das interações coloidais entre componentes, a organização estrutural, ou serem usadas para os projetos de processamento desse tipo de produto. (MCCLEMENTS, 2016; MIRHOSSEINI et al., 2007)

Em emulsões concentradas, dependendo da natureza das interações coloidais, o comportamento reológico pode variar significativamente. Em sistemas com grande interação repulsiva (estérica ou eletrostática), a fração volumétrica efetiva de gotas é maior, levando a uma maior viscosidade. (MCCLEMENTS, 2016)

Em emulsões com comportamento pseudoplástico, pode-se inferir sobre a formação de flocos pela medida da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento. A quantidade de gotas envolvidas na formação dos flocos, assim como o tamanho e empacotamento destes flocos, estão diretamente relacionados com o aumento da viscosidade do sistema. À medida que as forças de atração relacionadas à

ocorrência de flocculação aumentam, maior o valor da tensão de cisalhamento na qual a viscosidade da emulsão começa a diminuir abruptamente. (MCCLEMENTS, 2007)

Tadros, 2004, afirma que o acompanhamento da viscosidade pode ser útil para verificar a ocorrência de coalescência das gotas, uma vez que, em emulsões concentradas e na ausência de flocculação, o aumento do tamanho de gotas resulta em uma redução na viscosidade. O acompanhamento periódico dos parâmetros viscoelásticos dinâmicos também podem ser feito para avaliar mudanças estruturais e a ocorrência de coalescência, como mostrado no trabalho de Zapata, Rodríguez-Barona e Gómez, 2015. (TADROS, 2004; ZAPATA; RODRÍGUEZ-BARONA; GÓMEZ, 2015)

No entanto, Tesch, Gerhards e Schubert, 2002, demonstraram que o aumento da viscosidade na fase contínua não é decisivo para a estabilização de uma emulsão de óleo de canola, ao utilizar pequenas quantidades de amido modificado para estabilizar essa emulsão de baixa viscosidade. (TESCH; GERHARDS; SCHUBERT, 2002)

Franco *et al.*, 2000, estudam a influência do pH (3,5-7,0) e do tratamento térmico (25-90°C) na reologia de uma emulsão concentrada de óleo de girassol (65%) estabilizada com 6% de isolado proteico de ervilha. Eles reportam que o aumento do pH leva ao aumento da viscosidade da emulsão. O aumento da temperatura também levou ao aumento na viscosidade. Para os testes dinâmicos, eles relatam que para esse tipo de emulsão as funções viscoelásticas permanecem lineares até atingirem uma tensão crítica de 2-15 Pa. Essas emulsões apresentam uma resposta predominantemente elástica ($G' > G''$, por todo o intervalo de frequências analisado), devido à formação de uma rede tridimensional de segmentos de proteínas adsorvidas nas interfaces O/A, que resultam em um processo extensivo de flocculação típico de emulsões muito concentradas. (FRANCO *et al.*, 2000)

Os trabalhos de Riscardo, Franco e Gallegos, 2003, e de Martinez, Riscardo e Franco, 2007, estudam as propriedades reológicas de emulsões de óleo de girassol (35%) com 8% de diferentes misturas de gema de ovo com outros estabilizantes (PPI, Tween 20, caseinato de sódio e diestearato de sacarose) e o efeito da adição de sal. Todas essas emulsões apresentaram comportamento pseudoplástico e resposta predominantemente elástica, relacionando mais uma vez a uma microestrutura extremamente flocculada. Nas emulsões com mistura de gema de ovo com PPI,

observou-se que a viscosidade é mínima quando esses componentes são utilizados em mesmas quantidades e que uma maior concentração de PPI levou a maiores viscosidades, possivelmente devido a quantidades de proteína de ervilha não adsorvidas. Quanto ao efeito do sal (0-2,3%), foi observado que os valores da viscosidade e das funções viscoelásticas aumentaram significativamente com o aumento da concentração de sais, em especial nas misturas envolvendo proteínas, aumentando também a estabilidade contra cremeação. (MARTÍNEZ; RISCARDO; FRANCO, 2007; RISCARDO; FRANCO; GALLEGOS, 2003)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico (PA) e estão detalhados na *Tabela 3.1*. As soluções foram preparadas em água ultrapura, proveniente de uma unidade de purificação Milli-Q (*Millipore Corporation*).

Tabela 3.1 – Relação de reagentes utilizados

Reagente	Fórmula Química	Procedência	Pureza ou Concentração
Ácido acético	CH ₃ COOH	Vetec	Glacial
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Vetec	96-100%
Ácido clorídrico	HCl	Vetec	99%
Benzoato de sódio	C ₇ H ₅ NaO ₂	Vetec	99.5%
Cloreto de potássio	KCl	Vetec	99%
Coomassie Brilliant Blue	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	Vetec	G-250
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	Merck	99,8%
Dodecil sulfato de sódio	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Vetec	99%
Hidrocloreto de Tris(hidroximetil)aminometano	C ₄ H ₁₂ CINO ₃	Vetec	99,9%
Hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	99%
Isolado proteico de ervilha	-	Pisane	88-90%
Metanol	CH ₃ OH	Merck	99,5%
Nanocelulose	-	Suzano	Suspensão 3%
Óleo essencial de laranja	-	Ferquima	-
Sorbato de potássio	C ₆ H ₇ KO ₂	Vetec	98-101%
α-tocoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	Sigma-Aldrich	96%
β-mercaptoetanol	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich	99%

A nanocelulose utilizada foi cedida pela Suzano, e consiste de um rejeito industrial sobre o qual não se tem muitas informações.

O óleo essencial de laranja doce foi adquirido na Ferquima, extraído por prensagem a frio da casca dos frutos. Este óleo é composto principalmente por limoneno (95%), contendo também, em valores aproximados, mirceno (1,8%), α-pineno (0,5%), sabineno (0,3%) e linalol (0,3%), além de traços de outras moléculas não identificadas.

O isolado proteico de ervilha amarela, *C9 Pea Protein* da marca *Pisane*[®], foi gentilmente fornecido pela professora Ana Paola Pierucci, do Instituto de Nutrição da UFRJ. Esse produto contém de 88 a 90% de proteínas e quantidades máximas de 3,0% carboidratos, 6,0% cinzas e 1,5% gorduras.

3.2 Caracterização da nanocelulose

A nanocelulose foi submetida às seguintes análises: potencial zeta, DRX, MEV, FTIR, tensão superficial e ângulo de contato. Mais detalhes sobre algumas dessas técnicas de caracterização podem ser encontradas no Anexo A.

3.2.1 Potencial Zeta

As medidas do potencial zeta foram realizadas em equipamento Zeta Plus Analyser Brookhaven Instruments Corporation, sendo determinado pela média de 5 ciclos por ensaio em cubetas de plástico (10 mm de percurso). Neste estudo foi utilizado o modelo de Smoluchowski, com aproximação de Debye-Huckel. Medidas do potencial zeta tiveram o objetivo de caracterizar o tipo de carga superficial e o comportamento com variação de pH.

As amostras de nanocelulose foram analisadas numa concentração de 0,1% m/m em água ultra pura e em solução 10 mM de KCl. Os experimentos foram conduzidos a temperatura ambiente com os valores de pH ajustados com soluções de HCl e NaOH.

3.2.2 Difração de Raios-X (DRX)

As análises em DRX foram realizadas em um difratômetro de raios X *PANalytical X'pert-PRO* com radiação de cobre ($\text{Cu K}\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$). Os valores de 2θ variaram de 10° a 120° , com passo de $0,00836^\circ$, e os picos foram identificados pelo auxílio do *software X'pert Highscore*. Para sua realização, foi feita a secagem da suspensão de nanocelulose em uma estufa a 60°C por 18 horas, o filme formado foi em seguida triturado e peneirado, obtendo um pó com granulometria $< 450 \mu\text{m}$.

Através dos difratogramas, foi possível determinar o grau de cristalinidade da nanocelulose, assim como o tamanho do cristalito. O grau de cristalinidade é calculado por deconvolução de picos, i.e. pela relação entre a área sob a curva dos picos característicos da estrutura analisada sobre a área total do difratograma. O cálculo do tamanho do cristalito é uma forma de se dimensionar o diâmetro médio das nanopartículas, onde o diâmetro calculado (D) é menor ou igual ao diâmetro médio da largura da partícula e pode ser determinado pela equação de Scherrer (Eq. 24): (MA et al., 2014)

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad \text{Eq. 24}$$

Em que k é uma constante igual a 0,89, λ é o comprimento de onda da radiação utilizada (Cu K $_{\alpha}$ = 1,5406 Ang), β é a largura na meia altura do pico de maior intensidade e θ é metade do ângulo 2θ relativo ao pico utilizado para calcular β .

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no microscópio *Quanta FEG*, utilizando aumentos de 40.000 a 100.000 vezes. A partir das imagens obtidas por essa técnica, é possível verificar a morfologia das partículas e determinar suas dimensões.

Foi utilizada a amostra de nanocelulose seca pelo mesmo processo descrito anteriormente, e o filme obtido foi então metalizado com partículas de ouro.

3.2.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) possibilitou determinar os grupos funcionais presentes na amostra de nanocelulose utilizada. Esta análise foi feita em equipamento de FTIR com reflexão total atenuada (*Attenuated Total Reflectance – ATR*), pelo Instituto de Macromoléculas (IMA) da UFRJ, utilizando o pó de nanocelulose com granulometria < 450 μm .

3.2.5 Tensão Superficial e Ângulo de Contato

Neste estudo utilizou-se o goniômetro *DataPhysics OCA*, que determina a tensão superficial pelo método da gota pendente e o ângulo de contato de avanço pelo método da gota séssil.

A tensão superficial da suspensão de nanocelulose foi calculada em 3 concentrações: 0,1%, 0,5% e 1% m/m em água Milli-Q.

Já o ângulo de contato é determinado pelo ângulo formado entre uma gota de água Milli-Q e um filme de nanocelulose obtido pela secagem em estufa a 60°C por 18 horas.

3.3 Caracterização do Óleo de Laranja

No laudo técnico enviado juntamente com o produto constam algumas características importantes, como a composição, a densidade (0,845 g/mL) e o índice de refração do óleo (1,472). Desse modo, para caracterização do óleo de laranja foram medidas sua tensão superficial pelos métodos da gota pendente e da placa de Wilhelmy e sua tensão interfacial com água ultrapura, pelo método da gota ascendente.

Para determinar a tensão interfacial, utilizou-se o goniômetro *Teclis Instruments*, pelo método da gota ascendente. Assim como na medida de tensão superficial, o óleo é colocado em uma seringa e a tensão é determinada pela análise do formato da gota formada. Entretanto, em vez de se estudar a gota formada no ar, essa seringa é mergulhada em água ultrapura, medindo assim a tensão entre as duas fases.

3.4 Caracterização do Isolado Proteico de Ervilha

O isolado proteico de ervilha foi submetido à análise da balança de Langmuir, foi feita a determinação da razão V_n/L_g por densitometria (SDS-PAGE) e foi medida sua tensão interfacial com o óleo de laranja. As mucilagens foram analisadas quanto às suas tensões superficiais e reologia, cujas metodologias estão descritas no item 3.8.

3.4.1 Isoterma de Compressão

Como explicado na seção 2.5.7, a balança de Langmuir é um instrumento que permite manipular a área molecular média por compressão ou expansão do filme, enquanto se mede sua pressão superficial.

Foi utilizada a balança de Langmuir *MicroTrough – S (Kibron Inc.)* para avaliar a estabilidade mecânica e resistência à compressão dos filmes monomoleculares formados pelo PPI.

Devido à natureza sensível dessa análise, antes de ser realizada, deve-se fazer um limpeza rigorosa na bandeja do equipamento, utilizando etanol e posteriormente água ultrapura.

Para análise do filme de PPI, foi adicionada à subfase aquosa 50 µL de uma solução de 50 mg/mL de PPI em água Milli-Q.

3.4.2 Razão Vn/Lg

Para determinar a razão entre as proteínas do isolado de ervilha, foi realizada a densitometria de um gel de poliacrilamida com adição de dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate - SDS*), obtido por eletroforese do isolado proteico (SDS-PAGE). Na técnica de SDS-PAGE, o isolado proteico é submetido a um campo elétrico, sob o qual cada proteína se move em diferentes velocidades. Com a utilização do SDS a forma e cargas das proteínas é negada, de modo que a separação em seus diversos componentes depende apenas da massa molecular de cada um deles. (LAM et al., 2016)

Em preparação para a eletroforese, o PPI foi diluído até a concentração de 1 g/L em solução tampão de 0,5M de hidrocloreto de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), em pH 6.8. Em um eppendorf de 1,5mL, foram adicionados 75 µL da amostra, 25 µL de tampão e 5 µL de β-mercaptoetanol. Esse eppendorf foi então encubado por 5 minutos a 99°C no *Thermomixer Confort Eppendorf*.

Alíquotas de 30 µL foram depositadas em três poços do gel para se realizar a análise em triplicata. Em outro poço, foi depositado o padrão de massa molecular comercial *Precision Plus Protein Dual Color Standards*, da Bio-Rad, que serve como marcador para as seguintes massas moleculares: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa e 10 kDa. Em seguida deu-se início à eletroforese na placa de gel utilizando equipamento *Mini-PROTEAN Tetra System* da Bio-Rad, aplicando tensão de 150 V e corrente de 30 mA até finalizar a corrida das amostras pelo gel.

Após finalizada a eletroforese, deve-se fazer a revelação do gel. Primeiramente deixa-se o gel sob agitação por 30-60 minutos imerso em solução corante de Comassie Blue (0,575 g/L Comassie Blue Brilliant G 250; 45% v/v metanol; 55% v/v ácido acético). Em seguida faz-se algumas etapas de descoloração, mantendo o gel sob agitação, imerso em solução descorante (8,5% v/v metanol; 6% v/v ácido acético; 85,5% v/v água Milli-Q), fazendo trocas periódicas dessa solução.

O gel é digitalizado e é então feita a análise da sua densitometria, com auxílio do software *Image J*, permitindo a determinação das proteínas presentes nas amostras.

3.4.3 Tensão Interfacial PPI-Óleo

Para determinar a tensão interfacial, utilizou-se o goniômetro *Teclis Instruments*, pelo método da gota pendente. Uma das amostras é colocada em uma seringa e a tensão interfacial é determinada pela análise do formato da gota formada, quando imersa no óleo.

Nessa análise, mediu-se a tensão interfacial de gotas de suspensões com 10% de PPI, em pH ácido (~2,6) e em pH neutro (~7,5), imersas no óleo de laranja.

3.5 Emulsões Testes

Para a formulação das emulsões, inicialmente foram preparadas emulsões de 30% m/m de óleo de laranja com 0,1-1% NFC, de 30% óleo e 10% PPI e de 40% óleo,

0,5% NFC e 5% PPI. Em seguida, foi realizado o planejamento experimental avaliando apenas o comportamento do isolado proteico de ervilha.

3.6 Planejamento Experimental

O planejamento de experimentos encontra-se muito associado ao estudo de estabilidade de emulsões, uma vez que este ainda é muito empírico. (ALMEIDA, 2012; GASPAR, 2015; MIRHOSSEINI et al., 2007; MIRHOSSEINI; TAN; TAHERIAN, 2008)

Nesse planejamento, decidiu-se adicionar o pH da emulsões como uma das variáveis, juntamente com as concentrações de óleo essencial de laranja e do isolado proteico de ervilha (PPI), devido à importância dessa propriedade em emulsões estabilizadas por proteínas.

O intuito desse trabalho é correlacionar as propriedades físico-químicas das emulsões formadas com a suas estabilidades. Para isso, elaborou-se um planejamento experimental fatorial completo do tipo $2^3 + 3$ pontos centrais (*Tabela 3.2*), para se avaliar os efeitos mais significativos para as respostas do sistema. O teor de óleo foi variado de 20 a 40% em relação à massa total da emulsão, a concentração de PPI foi de 5% a 10% em relação à massa da emulsão e o pH foi estudado em níveis ácidos (~2,5) a neutros (~7), utilizando soluções de ácido cítrico para acidificar as emulsões.

Tabela 3.2 – Níveis do planejamento de experimentos

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Óleo de Laranja (%m/m)	20	30	40
Isolado Proteico de Ervilha (%m/m)	5	7,5	10
pH	Ácido (~2,5)	~4,75	Neutro (~7)

A partir dos resultados obtidos, foram feitas análises estatísticas utilizando o software *Statistica 8.0* para determinação dos efeitos de cada variável e suas interações, com intervalo de confiança de 90%. A significância desses efeitos é representada pelo

p-valor, uma medida da probabilidade dessa variável ter efeito significativo sobre a resposta observada.

3.7 Preparo das Emulsões

O preparo das emulsões consiste na preparação das fases aquosas e oleosa, nas composições de cada experimento, seguido da homogeneização das misturas, formando as emulsões. As emulsões foram preparadas e estocadas em temperatura ambiente (em torno de 25°C) no Laboratório de Engenharia de Fenômenos Interficiais (LABEFIT). As análises para caracterização das emulsões foram realizadas no dia em que foram preparadas, com exceção às análises dependentes do tempo.

3.7.1 Fases aquosas

Em um primeiro momento, as fases aquosas, também chamadas de mucilagens, consistiram apenas da mistura e homogeneização do PPI em água Milli-Q ou solução ácida (ácido cítrico), de acordo com o pH desejado. Esses componentes são misturados e levados a um homogeneizador de alta velocidade *Ultra-Turrax® T 25 digital (IKA®)* a 6.000 rpm por volta de três minutos, *Figura 3.1*.



Figura 3.1 – Homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax T 25 digital (IKA, 2019)

Após a finalização do planejamento, foram escolhidos os 3 pontos do planejamento com maiores estabilidades para avaliar a influência da utilização de outros

conservantes na formação das emulsões. Para isso, foram adicionadas na formulação das fases aquosas concentrações fixas de 1,6% de ácido cítrico (conservante), 0,4% de benzoato de sódio (antioxidante) e 0,4% de sorbato de potássio (bactericida).

3.7.2 Fase oleosa

A fase oleosa consistiu exclusivamente do óleo de laranja a ser misturado com a fase aquosa nas proporções definidas pelo planejamento de experimentos.

Estudos com óleo essencial de laranja doce demonstraram que ele pode apresentar potencial anticarcinogênico e atividade ansiolítica, e seu odor apresenta propriedades que reduzem sintomas de ansiedade e melhoram o humor. (DOSOKY; SETZER, 2018)

3.7.3 Formação da emulsão

As fases aquosa e oleosa de cada experimento foram misturadas utilizando um homogeneizador de alta velocidade (*Ultra-Turrax*[®]) a 10.000 rpm por 15 minutos. Esse tipo de homogeneizador costuma resultar em gotas na faixa de 2 a 10 µm de diâmetro.

Os homogeneizadores de alta velocidade estão entre os métodos mais utilizados para a homogeneização direta da emulsão na indústria de alimentos. As fases aquosa e oleosa de cada experimento são misturadas e então colocadas em um recipiente adequado, onde passa por um agitador com lâminas que promovem o cisalhamento. A rotação da lâmina em alta velocidade resulta em uma combinação de gradientes de velocidade longitudinal, rotacional e radial nos líquidos, perturbando a interface entre o óleo e a água, misturando-os e rompendo as gotas maiores em menores. (ALMEIDA, 2012)

3.8 Caracterização das Emulsões

A estabilidade física das emulsões formadas será avaliada pelas seguintes análises: índice de estabilidade, tensão superficial, tamanho de gota, potencial zeta e reologia (viscosidade sob cisalhamento e módulos viscoso e elástico).

3.8.1 Índice de estabilidade

Para se fazer a observação visual da liberação de óleo, foram coletadas amostras das emulsões recém formadas em provetas graduadas. Essas provetas são seladas e deixadas em repouso por 15 dias, para que os mecanismos de desestabilização possam ocorrer.

Ao término dos 15 dias, são marcadas as alturas de cada fase formada, permitindo calcular o IE de acordo com a Eq. 19.

3.8.2 Tensão Superficial

As medidas de tensão superficial das emulsões e das mucilagens foram realizadas com o tensiômetro *K100 (Krüss Scientific)* pelo método da placa de Wilhelmy. Esse método se baseia no registro da força durante a passagem da placa pela superfície. A força máxima exercida logo antes da ruptura do filme de líquido aderido na placa permite o cálculo da tensão superficial. Com essa análise, pode-se prever se haverá separação de fases e avaliar as interações intermoleculares.

Para garantir a medição dessa propriedade no tempo zero, as medições foram feitas após as amostras serem reemulsificadas em um *Ultra-Turrax®* por 5 minutos a 10.000 rpm. Após o intervalo de 15 dias, em que as amostras foram deixadas em repouso para se avaliar a estabilidade, foram medidas novamente as tensões de cada amostra.

3.8.3 Diâmetro de gotas

Os diâmetros médios e distribuições de tamanhos das gotas foram analisado nas emulsões recém formadas por microscopia óptica, em campo claro. As medidas de tamanho de gota fornecem um indicativo dos possíveis mecanismos de desestabilização.

Para realizar a análise por microscopia óptica, uma gota da amostra é colocada em uma lamínula, que por sua vez é colocada sob as lentes do microscópio com aumentos de 20 a 100 vezes. Para obter uma boa imagem com boa visualização da microestrutura da emulsão, são necessário ajustes na luz, foco e lente de aumento. Para medição dos tamanhos, foi feita a análise das fotos com o software *AxioVision 4.8*, a partir da medição do diâmetro de ao menos 200 gotas.

3.8.4 Potencial zeta

As medidas do potencial zeta das emulsões e mucilagens foram realizadas no equipamento *Zeta Plus Analyser Brookhaven Instruments Corporation*, utilizando o modelo de Smoluchowski, com aproximação de Debye-Huckel.

Para possibilitar a análise, as amostras foram diluídas 400x em água Milli-Q ou em soluções ácidas (ácido cítrico) de acordo com o pH analisado. A partir das análises do potencial zeta, pode-se predizer se as gotas estão carregadas e se são essas cargas as responsáveis pela estabilidade do sistema devido a repulsões eletrostáticas.

3.8.5 Reologia

Com o reômetro rotativo *AR-G2 (TA Instruments)*, foi analisada a reologia das mucilagens e emulsões produzidas. Foram feitas duas análises: a variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento e variação dos módulos viscoso e elástico com a frequência angular.

Para a maioria das amostras foi utilizada uma geometria cone-placa 2° de aço, de 60 mm de diâmetro, com *gap* de 57µm. Apenas para as mucilagens 4 e 8 foi necessário utilizar geometria placa-placa, 40mm, com *gap* de 1000µm, devido à alta concentração de proteínas nessas amostras.

Os testes de viscosidade pela taxa de cisalhamento foram feitos em rampa contínua, variando a taxa de cisalhamento entre 0,02 e 1000 1/s, em um intervalo de 5 minutos. Os testes oscilatórios foram feitos variando a frequência angular de 1 a 100 rad/s, sob tensão de 0,1 Pa.

Algumas possíveis fontes de erro nesse tipo de experimento são: efeitos do *gap* do reômetro (deve ser grande o suficiente para a emulsão ser homogênea, mas pequeno o suficiente para uma distribuição uniforme da tensão de cisalhamento); efeito de escorregamento da parede (se assume que o líquido em contato com as superfícies da geometria se movem em conjunto com ela, na mesma velocidade); separação gravitacional (se houver cremação ou sedimentação ocorrendo durante o experimento a distribuição de gotas se torna não-homogênea). (MCCLEMENTS, 2016)

3.9 Reologia Dilatacional Interfacial

O método da gota oscilatória pode ser usado para caracterizar simultaneamente a tensão interfacial e a reologia dilatacional de uma interface líquido-líquido.

Para determinar a reologia dilatacional, aplica-se uma pressão controlada na seringa, variando o volume da gota. Com isso observa-se como a tensão interfacial (γ) se comporta com a variação da área interfacial (A), como descrito na Eq. 25. Ao se utilizar uma frequência senoidal para essa variação de volume, é possível destringir a elasticidade dilatacional (ϵ^*) em módulos elástico (ϵ') e viscoso (ϵ''). (MCCLEMENTS, 2016)

$$\epsilon^* = \frac{d\gamma}{d\ln A} \quad \text{Eq. 25}$$

Para o estudo da reologia interfacial entre a fase aquosa com PPI e o óleo de laranja, utilizou-se o goniômetro *Teclis Instruments* e observou-se como uma gota da fase aquosa se comportava imersa em óleo. Foram utilizadas duas fases aquosas com

0,01% de PPI, uma em pH neutro e outra em pH ácido (2,5), acidificada com ácido cítrico. Como a tensão interfacial é pequena, é necessário fazer o teste em uma gota de pequeno volume. Deste modo, os testes foram feitos com gotas de 2 μ L, amplitude de dilatação de 0,2 μ L e frequência de 0,2 Hz. Este tamanho reduzido de gotas, assim como a baixa concentração de PPI na fase aquosa, foram necessários para se obter gotas que suportassem a análise sem desprender da agulha. Devido à baixa tensão interfacial, em conjunto com uma solubilidade das proteínas relativamente baixa, uma pequena diferença no peso das gotas impedia a realização da análise.

3.10 Encapsulamento de Vitamina E

Foi escolhido o α -tocoferol, conhecido popularmente como vitamina E, como composto ativo a ser encapsulado nesse trabalho.

A vitamina E apresenta alto caráter antioxidante e contribui para a prevenção de diversas doenças degenerativas, como Alzheimer, câncer e doenças cardiovasculares, e para melhora da resistência a infecções. Seu uso sob encapsulamento é interessante pela sensibilidade dessa vitamina à luz, calor, oxigênio, congelamento e meios alcalinos. (GONZALES, 2019)

3.10.1 Preparo

Para o teste de encapsulamento, foi utilizado o sistema determinado como mais estável. A quantidade indicada para consumo (DRI) de α -tocoferol (vitamina E) por adultos de ambos os sexos é de 15mg por dia. (PADOVANI et al., 2006; RIZVI et al., 2014)

Dessa forma, o composto ativo foi misturado junto à fase oleosa da emulsão na concentração de 0,5% m/m em relação à quantidade de óleo. Com essa quantidade, se o composto ativo for satisfatoriamente encapsulado, em um produto final com 0,5% óleo, seria possível consumir até 2,5mg de vitamina E por 100g de produto, i.e., com o consumo de uma embalagem de 600g de produto seria possível alcançar o valor diário indicado para consumo deste composto.

3.10.2 Quantificação de compostos encapsulados

O grau de encapsulamento foi calculado pela quantificação do composto ativo após a emulsificação, através da técnica de espectrofotometria no UV/Vis, no espectrofotômetro Alpha Asw 002 UV-Vis Analyst 1803. Para isso, é feita a extração líquido-líquido desse composto.

Para extração do nutriente, α -tocoferol, a quantificação foi feita seguindo o método utilizado por Gaspar, 2015. Desse modo, uma alíquota de 1 g de emulsão foi extraída com 10 mL de diclorometano. Para agilizar a extração e separação de fases, colocou-se a amostra em uma centrífuga a 6000G por 3 minutos. Após a extração, a fase contendo diclorometano foi diluída 24 vezes para a análise espectrofotométrica, com comprimento de onda igual a 296 nm. Nessas mesmas condições foi construída uma curva de calibração, possibilitando a obtenção da concentração de α -tocoferol na amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados do trabalho. Primeiramente serão apresentados os resultados para a caracterização e produção de emulsões teste com a nanocelulose. Em seguida serão apresentados os resultados para caracterização do PPI e óleo de laranja, seguidos dos resultados do planejamento, reologia interfacial e encapsulamento da vitamina E.

4.1 Nanocelulose

4.1.1 Potencial Zeta

O potencial zeta da nanocelulose foi determinado em uma suspensão em água ultrapura, na concentração de 0,1% m/m, retornando o valor de -33,39 mV com desvio de 1,84 mV.

Foi feita a análise do comportamento do potencial zeta da suspensão de nanocelulose com a variação de pH em uma solução com 0,01M de KCl, obtendo-se o gráfico da *Figura 4.1*.

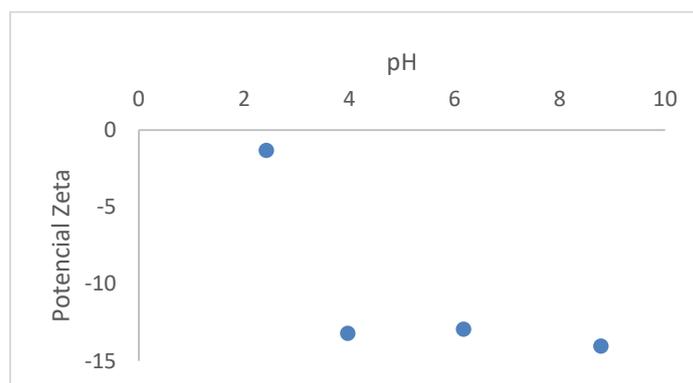


Figura 4.1 – Comportamento do potencial zeta (em mV) em função do pH de uma suspensão 0,1% m/m nanocelulose em solução 0,01M KCl

Observa-se que as nanopartículas de celulose apresentam um potencial zeta negativo em toda extensão do pH. Este comportamento pode ser explicado pela presença dos grupos hidroxila em sua superfície, como mostrado na *Figura 2.3*, de modo que, à medida que o pH aumenta, a densidade de cargas negativas na superfície da partícula aumenta, em função da adsorção dos grupos hidroxílicos.

Um comportamento relativamente semelhante da curva de potencial zeta versus pH foi obtido por Prathapan *et al.*, 2016, com nanocristais de celulose, e por Kargar *et al.*, 2012, com celulose microcristalina, ambos extraídos por hidrólise ácida. Kalashnikova *et al.*, 2012, demonstram como o potencial zeta de uma solução, com nanocristais de celulose bacteriana, diminui, em módulo, com o aumento na concentração de íons no meio, justificando a diferença encontrada para os valores de potencial zeta em água e na presença de íons KCl. (KALASHNIKOVA *et al.*, 2012; KARGAR *et al.*, 2012; PRATHAPAN *et al.*, 2016)

Esse resultado demonstra que, assim como nesses trabalhos da literatura, a nanocelulose utilizada apresenta cargas negativas em sua superfície, que tendem a ser neutralizadas em pH muito ácido.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura resultou em imagens do filme de nanocelulose metalizado (*Figura 4.2*).

A partir das fotos, foi possível demarcar diversas fibras, de modo a se calcular as médias do diâmetro e do comprimento das fibras de nanocelulose, assim como se construir histogramas para as duas dimensões (*Figura 4.3*). Dessa forma, a partir da medida de 200 fibras em cada dimensão, temos um comprimento médio de 652,4 nm com desvio padrão de 371,8 nm; e um diâmetro médio de 61,1 nm com desvio padrão de 26,5 nm. Os histogramas foram produzidos a partir da ferramenta de análise de dados do programa *Microsoft Excel*, e pode-se afirmar que a distribuição de tamanhos é monomodal.

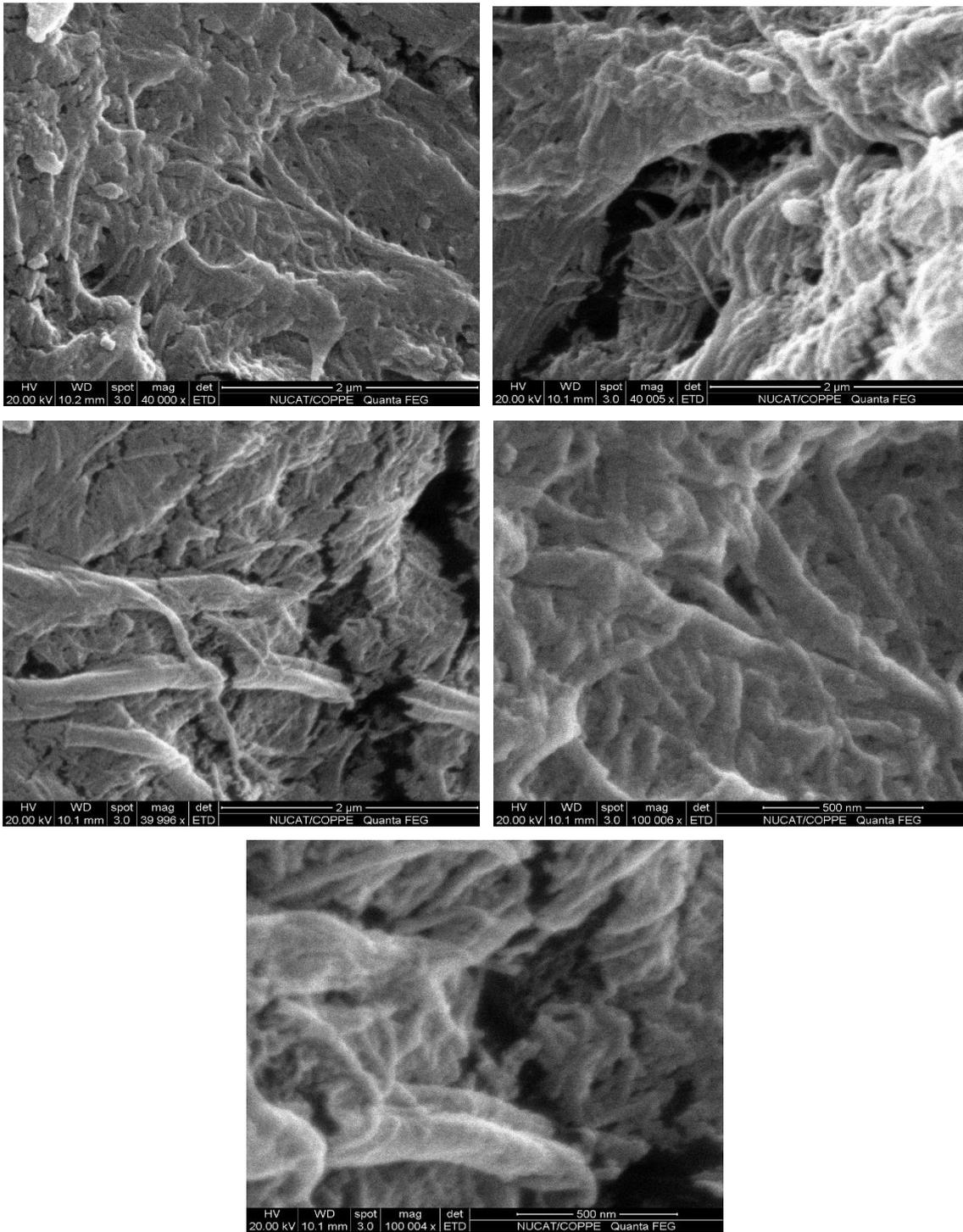


Figura 4.2 – Micrografias da nanocelulose obtidas por microscopia eletrônica de varredura

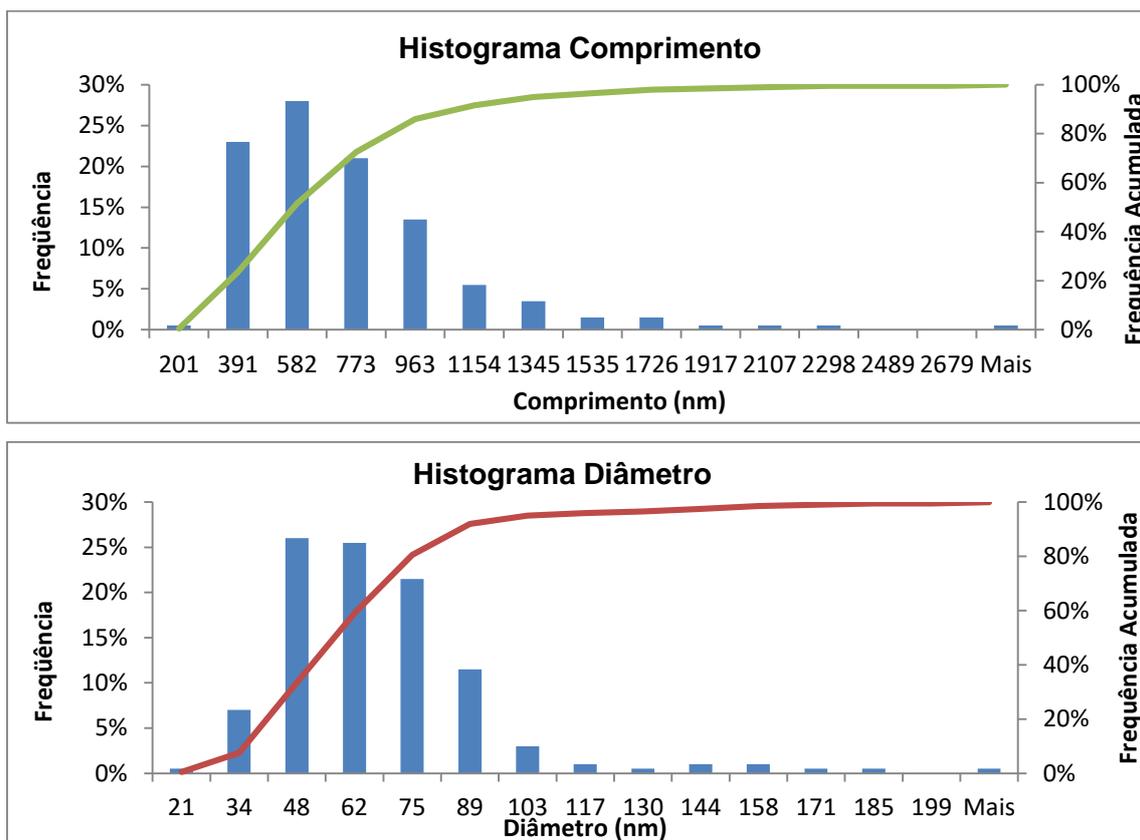


Figura 4.3 – Histogramas da distribuição de tamanhos dos comprimentos e diâmetros das nanofibras de celulose

4.1.3 Difração de Raios-X (DRX)

A técnica de DRX retornou o difratograma abaixo (Figura 4.4), a partir do qual pode-se extrair a informação do grau de cristalinidade da amostra de nanocelulose, assim como calcular o tamanho do cristalito.

No difratograma, pode-se observar a presença de três picos, em 2θ de aproximadamente 17° , 22° e 35° , característicos da nanocelulose, como podemos ver pela comparação com os difratogramas encontrados para este material nos trabalhos de Ma *et al.*, 2014 e Nobuta *et al.*, 2016. (MA *et al.*, 2014; NOBUTA *et al.*, 2016)

A amostra de nanocelulose apresentou grau de cristalinidade de aproximadamente 72% e tamanho de cristalito de aproximadamente 2,4 nm, menor do que o diâmetro encontrado pela análise do MEV. Esse valor de grau de cristalinidade

confirma a presença de regiões amorfas na amostra, corroborando a análise de que a nanocelulose utilizada é composta por nanofibras, e não por nanocristais.

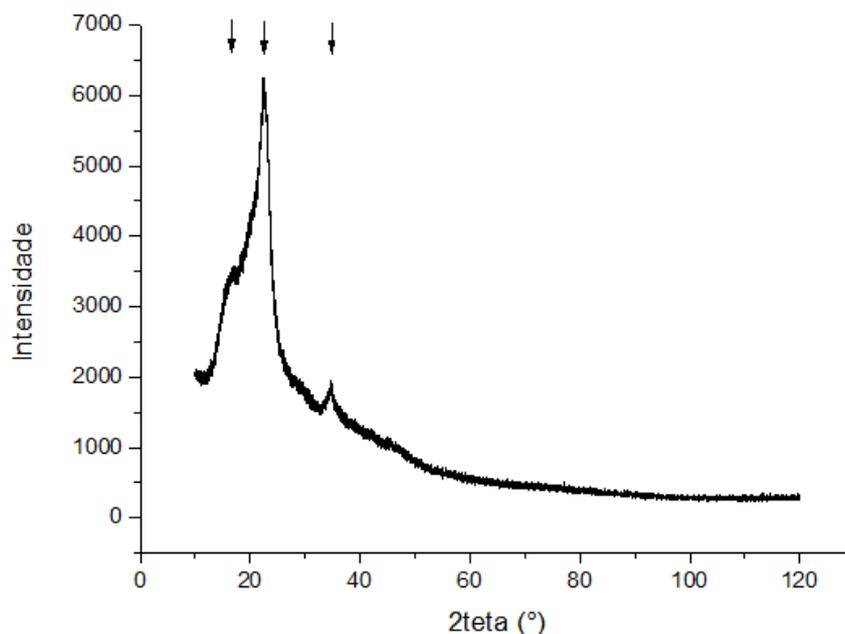


Figura 4.4 – Difratograma da nanocelulose

4.1.4 Tensão superficial

Para a determinação das propriedades de superfície da nanocelulose, foi medida a tensão superficial de suspensões com diferentes concentrações desse material pelo método da gota pendente. As concentrações escolhidas foram de 0,1%, 0,5% e 1% m/m, sendo as duas últimas as que serão utilizadas para formulação das emulsões.

Foram feitas ao menos três medidas de cada concentração. Quanto maior a concentração da amostra, mais medidas foram feitas por conta do aumento na variabilidade dos resultados encontrados.

Deste modo, a *Tabela 4.1* a seguir apresenta o número de medidas, valor médio e desvio padrão da tensão superficial das amostras:

Tabela 4.1 – Medidas de tensão superficial das amostras de nanocelulose em diferentes concentrações

Concentração (%m/m)	Número de Medidas	Tensão Superficial (mN/m)	
		Média	Desvio
0,1	3	76,53	0,07
0,5	5	75,45	0,87
1,0	7	70,43	1,81

Com base nesses resultados, pode-se observar que em suspensões mais diluídas as tensões superficiais se mostraram maiores que da água pura (72mN/m). Isso é um indicativo da presença de impurezas na amostra de nanocelulose. Com o aumento de concentração, observa-se uma redução na tensão superficial da suspensão, atingindo valores próximos ao da água pura na suspensão com 1% de NFC.

Pode-se notar também o aumento na variação das medidas com o aumento da concentração. Essa variação pode se dar pelo aumento da turbidez das amostras, dificultando a passagem da luz e reduzindo a precisão da medida.

Por si só, esse comportamento não seria determinante, uma vez que o mecanismo de estabilização da nanocelulose se baseia principalmente no impedimento estérico das gotas de óleo por Pickering. No entanto, é um indicativo da presença de impurezas na amostra.

4.1.5 Ângulo de Contato

O ângulo de contato da água sobre a nanocelulose foi determinado pelo método de gota séssil. Foram feitas quatro medidas, cujos resultados da média e desvio podem ser observados na *Tabela 4.2*.

Tabela 4.2 – Média e desvio padrão do ângulo de contato do filme de nanocelulose preparado a partir da secagem da suspensão 3%

Ângulo de Contato (°)	
Média	Desvio Padrão
56,6°	3,4°

O valor encontrado (56,6°C) é condizente com uma superfície moderadamente hidrofílica, o que é indicado para adsorção na interface óleo-água, já que uma afinidade muito grande por uma das fases tornaria a partícula menos adequada para estabilizar a emulsão.

4.1.6 Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A amostra de nanocelulose seca e triturada foi enviada para análise no Instituto de Macromoléculas (IMA) – UFRJ. O resultado desta análise pode ser observado na *Figura 4.5* a seguir.

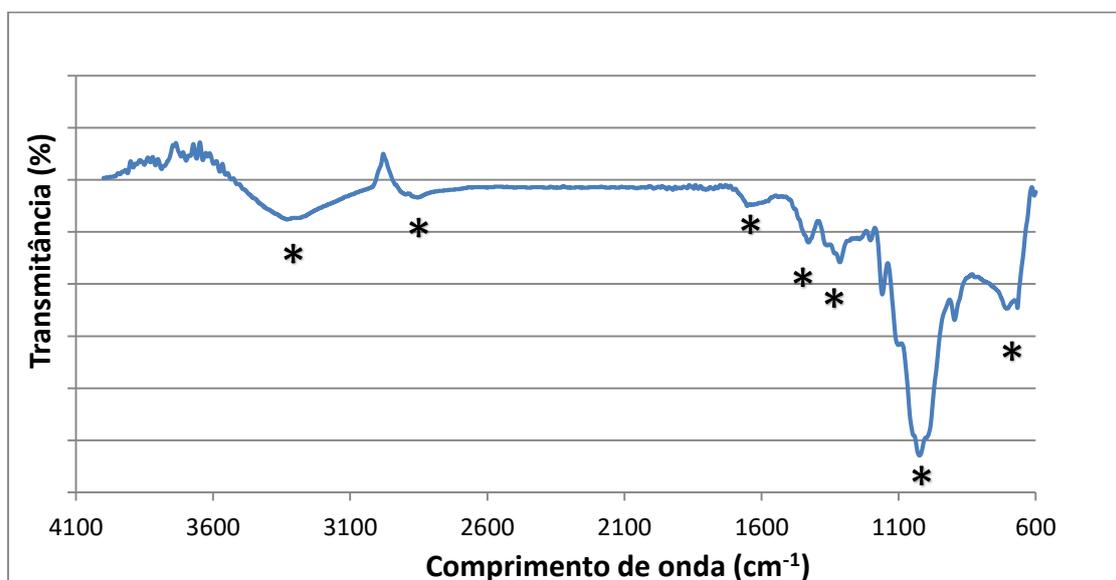


Figura 4.5 – FTIR-ATR da nanocelulose

O espectro obtido é semelhante a outros reportados na literatura, porém com a diferença dos picos nas faixas de 3334 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} , reportados como sendo às vibrações de alongamento de O–H e C–H, respectivamente, terem sido consideravelmente menos pronunciados. O pequeno pico em 1630 cm^{-1} representa a vibração de ligações O–H de água absorvida e os picos entre 1316-1340 cm^{-1} estão relacionados às vibrações de flexão dos grupos C–H e C–O presentes nos anéis aromáticos de polissacarídeos, presentes na celulose. O maior pico, em 1023 cm^{-1} , corresponde à vibração de flexão do C–O–C no anel de piranose. O pico em 1431 cm^{-1}

indica a presença de lignina na amostra. (LANI et al., 2014; THEIVASANTHI et al., 2018; WULANDARI; ROCHLIADI; ARCANA, 2016)

4.1.7 Emulsões Teste

Após fazer as caracterizações, foram realizados alguns testes para verificar a capacidade de emulsificação da nanocelulose (NFC) e em conjunto com o isolado proteico de ervilha (PPI). Foram preparadas emulsões com 30% m/m de óleo de laranja com 0,1-1% NFC e de 40% óleo, 0,5% NFC e 5% PPI.

Como pode ser visto na *Figura 4.6*, em todos os testes realizados, não foi possível dispersar eficientemente o óleo na fase aquosa, ocorrendo a separação de fases oleosa e aquosa imediatamente após a cessação da homogeneização.

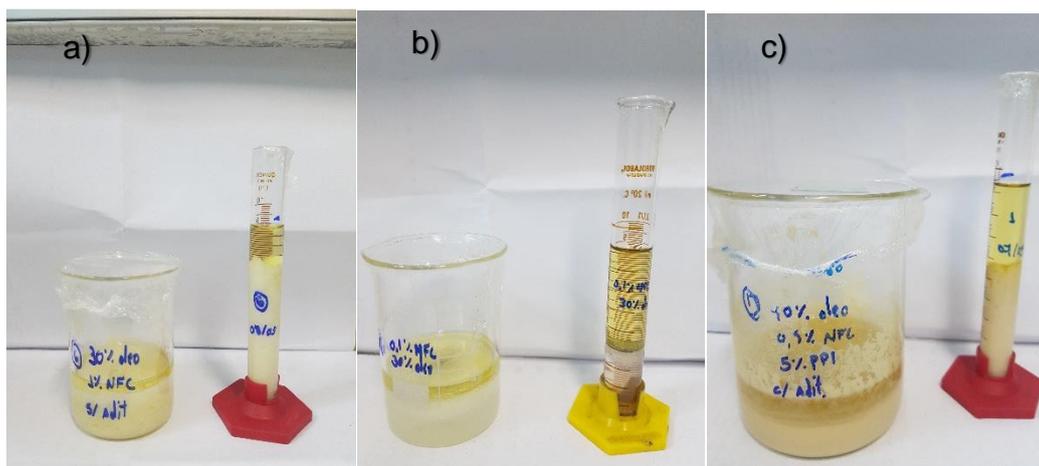


Figura 4.6 – Fotografias das amostras do teste de emulsificação com nanocelulose: a) 1% NFC e 30% óleo; b) 0.1% NFC e 30% óleo; c) 0,5% NFC, 40% óleo e 5% PPI

Como comentado após o teste de tensão superficial da nanocelulose, havia indícios da presença de impurezas na amostra fornecida. Possivelmente, essas impurezas apresentam alguma propriedade que impediu a adsorção das fibras na superfície das gotas, impossibilitando a formação da emulsão. Por se tratar de uma amostra proveniente de um rejeito industrial, não é possível saber quais seriam essas impurezas.

Por conta deste resultado, em conjunto com o fato de a emulsão teste com apenas PPI ter se mostrado estável, foi decidido pelo abandono do uso da nanocelulose e formulação do planejamento de experimentos apenas com o isolado proteico.

4.2 Caracterização do Isolado Proteico de Ervilha e Mucilagens

4.2.1 Razão Vn/Lg

Como descrito no item 2.2.3, o perfil de proteínas no isolado de ervilhas é composto principalmente por: legumina (Lg), vicilina (Vn), convicilina, lipogenase e inibidores de protease. Além das subunidades descritas nesse item, em meio redutor (utilização de 2-mercaptoetanol) a legumina ainda costuma apresentar bandas não reduzidas na faixa de 60-65kDa. (BARAC et al., 2010)

Dessa forma, temos que os sinais presentes no gel de poliacrilamida nas seguintes faixas de massa molecular representam as seguintes proteínas (*Tabela 4.3*):

Tabela 4.3 – Massas moleculares das frações proteicas do PPI

Proteína	Massa Molecular (kDa)
Vicilina	47-50 (subunidades maiores) 34; 30; 25 (subunidades menores)
Legumina	60-65 (não reduzida) ~40 (ácida) ~20 (básica)
Convicilina	70-75
Lipogenase	93-100
Inibidores de Protease	10-12

Uma corrida preliminar foi realizada para se determinar a melhor concentração para se fazer a corrida em gel, obtendo-se assim a placa apresentada na *Figura 4.7*:

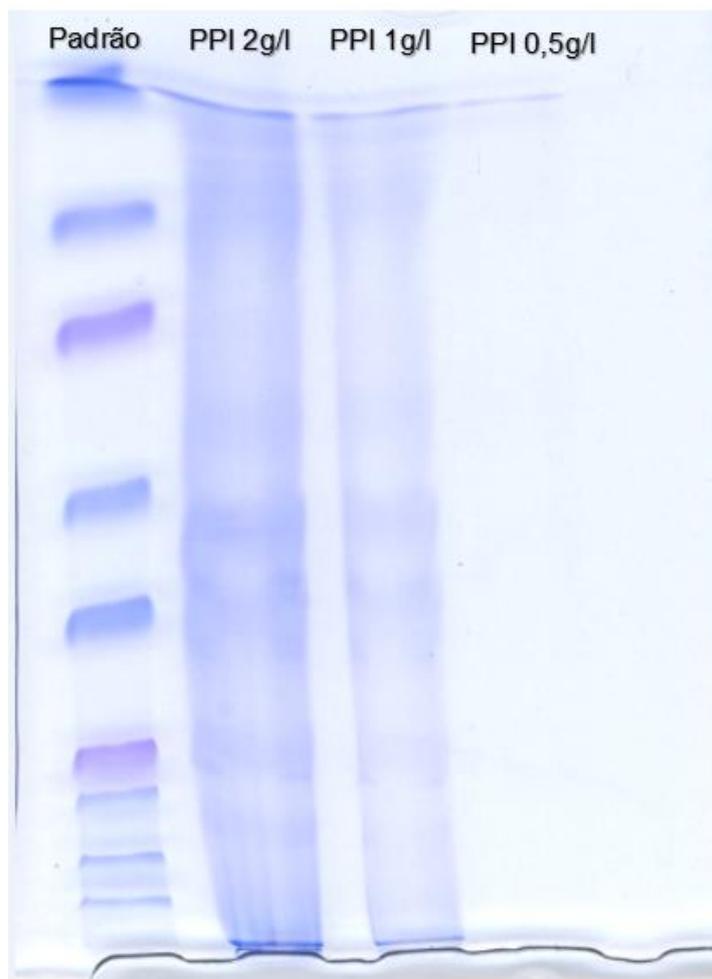


Figura 4.7 – SDS-PAGE preliminar

A partir da análise densitométrica desse gel, pode-se confirmar a presença de grande parte dessas proteínas e escolher a concentração de 1 g/L de PPI em solução tampão para o teste seguinte, realizado em triplicata para maior confiabilidade na determinação das proteínas presentes, como pode ser visto na *Figura 4.8*.

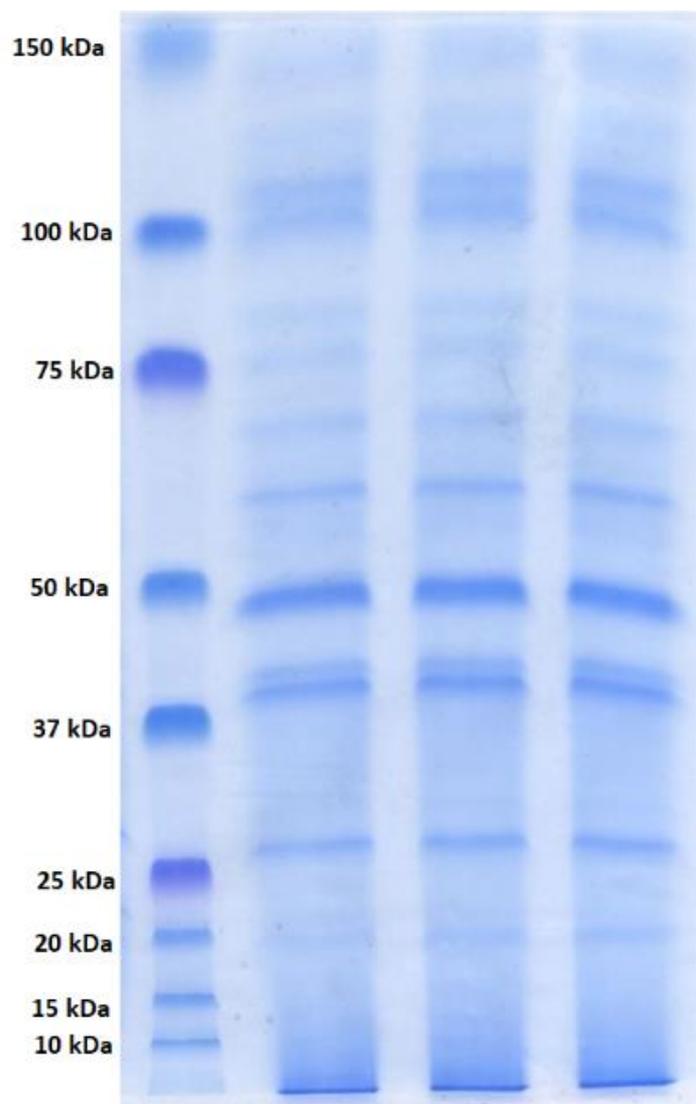


Figura 4.8 – SDS-PAGE do PPI em triplicata

Desse modo, analisando todas as frações proteicas observadas no gel, pode-se fazer a análise densitométrica com auxílio do *software Image J*, obtendo-se uma razão Vn/Lg de 1,29 +- 0,11.

4.2.2 Isoterma de Compressão

A partir da análise das isotermas de Langmuir do agente emulsionante, podem ser obtidas informações quanto à natureza do filme formado. Foi avaliado o filme do isolado proteico de ervilha, com visto na *Figura 4.9*.

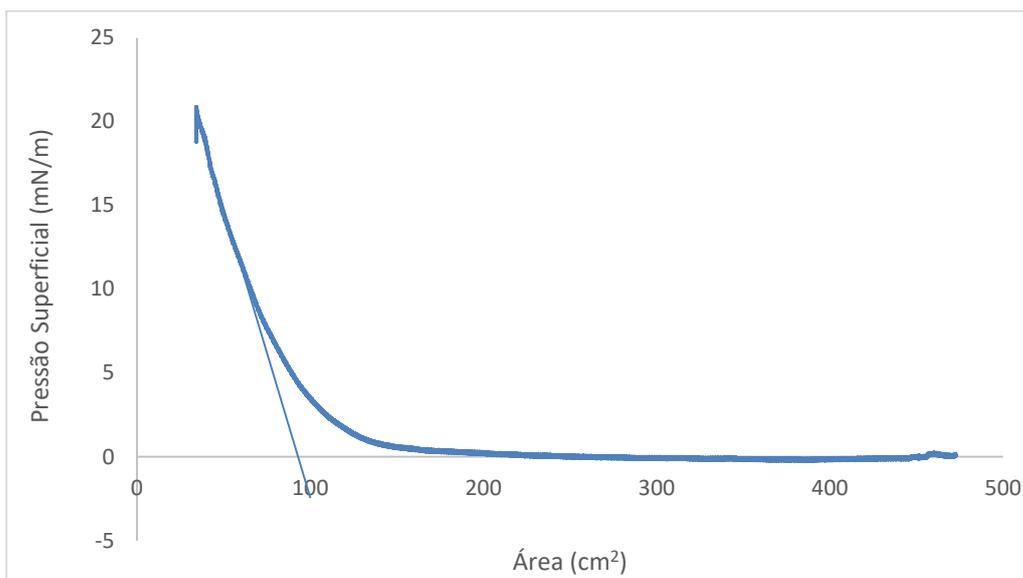


Figura 4.9 – Isotherma de Compressão do PPI

O filme foi capaz de reduzir a tensão superficial da água, como pode-se observar pelo grande aumento na pressão superficial, acima de 20 mN/m, durante a redução da área disponível entre as barreiras. O formato da isoterma é característico de um líquido condensado, indicando que o PPI deve formar filmes densos e elásticos, fornecendo uma barreira mecânica à coalescência, o que resultaria em emulsões estáveis. A elasticidade desse filme, definida pela Eq. 13, foi calculada se utilizando dois pontos na região linear de aumento de pressão logo antes do colapso, e é de $\epsilon=10,67\text{mN/m}$.

A área ocupada por uma molécula na superfície pode ser estimada considerando-se uma massa molar média do isolado proteico. Sabendo que a massa molecular da vicilina é de aproximadamente 170 kDa e da legumina é de aproximadamente 320 kDa, e com a informação do SDS-PAGE de que a amostra apresenta proporção Vn/Lg de 1,29, então pode-se estimar a massa molecular média do isolado proteico como sendo aproximadamente 236 kDa. (BARAC et al., 2010)

Com isso, considerando que no ponto de máxima pressão superficial na isoterma há uma monocamada de moléculas de proteína, a área média ocupada por molécula é de aproximadamente $53,9\text{ nm}^2$.

4.3 Tensão Superficial e Interfacial do Óleo de Laranja

4.3.1 Tensão superficial

Pelo método de gota pendente, após calibração do aparelho, a tensão superficial do óleo de laranja foi determinada pela média e desvio padrão de três medidas, utilizando a densidade fornecida no laudo técnico (0,845 g/mL). Desse modo, o valor encontrado foi de 28,6 mN/m com desvio padrão da réplica de 0,1 mN/m.

Também foi feita a medida dessa propriedade pelo método de placa de Wilhelmy, se obtendo uma tensão superficial de 28,2 mN/m.

4.3.2 Tensão interfacial do óleo com a água

Pelo método da gota ascendente, foi medida a tensão interfacial entre esse óleo e água ultrapura Milli-Q. Foi obtida uma tensão interfacial de 6,4 mN/m com desvio padrão da réplica de 0,1 mN/m, próximo dos valores encontrados por Arneodo *et. al.* em 1988, de 6,6 a 8,2 mN/m. (ARNEODO et al., 1988)

Esse valor baixo de tensão interfacial pode ser explicado pela presença, mesmo que em pequenas quantidades, de linalol e outros traços de compostos presentes no óleo essencial de laranja, que tendem a se concentrar na interface para reduzir a tensão entre as fases.

4.3.3 Tensão interfacial do óleo com as mucilagens

Pelo método de gota pendente, foram determinadas as tensões interfaciais de duas suspensões de PPI (10%) em óleo de laranja, com desvio padrão de três medidas.

Desse modo, a tensão encontrada para a suspensão em pH ácido (2,5) foi de 2,9 mN/m com desvio padrão de 0,1 mN/m. Em pH neutro (7,0) essa tensão foi de 3,4 mN/m com desvio padrão de 0,2 mN/m. Comparando com o valor obtido para a tensão

interfacial com água pura (6,3 mN/M), observa-se que o filme de proteína foi capaz de reduzir pela metade a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, demonstrando a sua capacidade tensoativa, também observada pelo estudo com a balança de Langmuir. Vale ressaltar que em pH mais ácido obteve-se uma tensão interfacial menor do que em pH neutro, possivelmente pela desnaturação e mudança de conformação das proteínas, reduzindo sua solubilidade e, conseqüentemente, aumentando sua adsorção na interface água-óleo.

4.4 Caracterização das Mucilagens

Para a determinação das propriedades de superfície das mucilagens, foram realizadas medidas da tensão superficial pelo método da placa de Wilhelmy e das propriedades reológicas. As concentrações de PPI variaram de 6,3% a 16,7% $m_{PPI}/m_{Mucilagem}$, de modo que ao serem misturadas com o óleo, a concentração de PPI da emulsão formada seja a do planejamento. Foram analisadas as variações das viscosidades com taxa de cisalhamento, tendo sido escolhida a taxa de $0,1 \text{ s}^{-1}$ para se fazer a comparação das viscosidades entre as amostras, pois como as mucilagens são fluidos pseudoplásticos, a viscosidade em taxa menores é mais representativa. Os resultados obtidos podem ser observados na *Tabela 4.4*.

Tabela 4.4 – Resultados das propriedades das mucilagens

Mucilagem	Variáveis		Tensão Superficial (mN/m)	Viscosidade a $0,1 \text{ s}^{-1}$ (cP)
	%PPI mucilagem	pH mucilagem		
1	6,3%	7,60	47,1	661
2	12,5%	7,31	52,7	47110
3	8,3%	7,46	47,1	903
4	16,7%	7,48	54,1	2027000
5	6,3%	2,49	48,1	53310
6	12,5%	2,51	49,6	245200
7	8,3%	2,65	48,8	71140
8	16,7%	2,54	47,5	220800
9	10,7%	4,80	47,7	66670
10	10,7%	4,80	48,0	50940
11	10,7%	4,69	48,5	33600
Média dos pontos centrais			47,9	50400
Desvio padrão dos pontos			0,7	16540
Erro relativo dos pontos			1,4%	32,8%

Dessa forma, pode-se observar que em quase todas as mucilagens com mais de 12% de PPI (isso é, aquelas correspondentes ao nível superior de %PPI_{emulsão} no planejamento) apresentaram valores maiores de tensão superficial do que as mucilagens com menos PPI. Esse aumento pode se dar pela formação de uma estrutura tridimensional em altas concentrações de proteína, o que ocasiona um aumento de viscosidade nessas amostras. Esse valor elevado de viscosidade pode introduzir erros na medida da tensão superficial pelo método da placa, já que este envolve a penetração da superfície pela placa e seu içamento através de uma solução com elevada resistência ao deslizamento.

A maioria das formulações apresentam viscosidade bastante elevada (acima de 10⁴ cP em baixas taxas de cisalhamento), evidenciada pela aspecto de gel observado. Essa alta viscosidade da mucilagem é um indicativo de um possível comportamento de gel na emulsão, que tende a ser benéfico para sua estabilidade. Entretanto, uma mucilagem com alta viscosidade pode levar a desafios operacionais em um processamento em larga escala, devido à maior dificuldade de transporte por tubulações, além de afetar a medida de tensão superficial. Como pode-se observar no gráfico da variação de viscosidades com a taxa de cisalhamento (*Figura 4.10*), as mucilagens apresentam comportamento pseudoplástico.

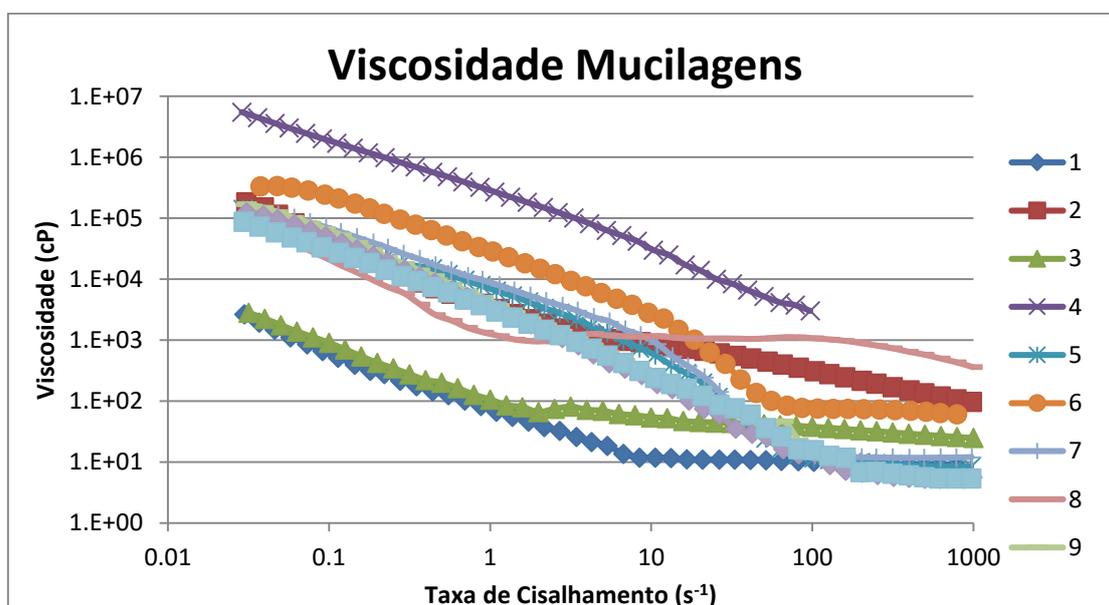


Figura 4.10 – Gráfico de viscosidades em função das taxas de cisalhamento das mucilagens

Foi feita a análise de efeitos das variáveis independentes do planejamento de experimentos, utilizando intervalo de confiança de 90%. O software Statistica faz a análise de efeitos com base no planejamento de experimentos das emulsões, por conta disso, o efeito da concentração de PPI e de óleo na emulsão atuam em conjunto para definir o efeito da concentração de PPI na mucilagem (quanto maior a concentração de óleo a ser utilizada na emulsão, maior a concentração de PPI na mucilagem correspondente, pois a mesma quantidade de PPI será diluída em uma menor quantidade de fase aquosa).

Uma vez que os efeitos na tensão superficial são devido a problemas de medida causados pela alta viscosidade, não faz sentido realizar a análise de efeitos significativos para a tensão superficial.

Pode-se verificar na *Tabela 4.5* os efeitos significativos para a viscosidade da mucilagem sob taxa de cisalhamento de $0,1 \text{ s}^{-1}$. Observa-se que o p-valor da curvatura foi inferior a 0,10, indicando que a hipótese de linearidade teria sido confirmada. Dessa forma, as interações que causam a formação da estrutura responsável pelo comportamento de gel são intensificadas com o aumento da concentração de PPI na mucilagem. No nível de pH mais ácido, as proteínas mudam de conformação, possivelmente reduzindo sua solubilidade. Desse modo, em pH neutro teria uma maior quantidade de proteínas em solução, intensificando as forças da rede viscoelástica formada.

Tabela 4.5 – Efeitos das variáveis sobre a viscosidade das mucilagens

Viscosidade a $0,1 \text{ s}^{-1}$			
	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor ¹
Média / Interseção	308425	5848	0,000
Curvatura	-516044	22397	0,002
(1) % PPI emulsão²	553844	11697	0,000
(2) % Óleo emulsão²	443710	11697	0,001
(3) pH	420986	11697	0,001
1 x 2	434675	11697	0,001
1 x 3	482429	11697	0,001
2 x 3	546356	11697	0,000

¹Valores de $p < 0,10$ indicam que a variável é estatisticamente significativa (em negrito)

²A relação entre %PPI e %Óleo presentes na emulsão determina a concentração de PPI presente na mucilagem

Porém, ao se analisar o gráfico de valores previstos contra observados, *Figura 4.11*, pode-se notar uma concentração de dados no início da curva, com apenas um ponto deslocando o modelo. Isso pode indicar que o modelo linear não seria o mais indicado para essa propriedade.

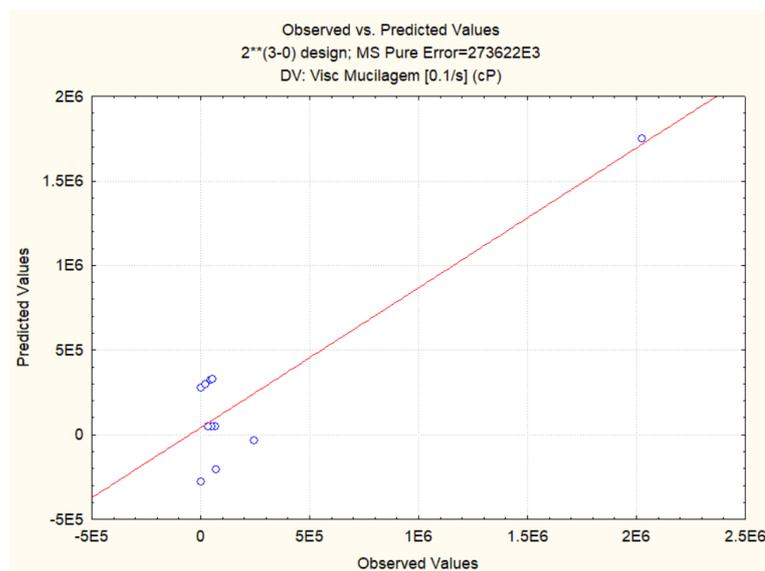


Figura 4.11 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para a viscosidade das mucilagens

4.5 Resultados do Planejamento de Experimentos

Para avaliar a estabilidade de emulsões e suas propriedades físico-químicas, foi realizado um planejamento fatorial completo com triplicata no ponto central, 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. Foram analisadas as respostas em relação à estabilidade, à tensão superficial, ao potencial zeta, ao tamanho de gota e à reologia. Na *Tabela 4.6*, pode-se observar todos os resultados do planejamento de experimentos.

Tabela 4.6 – Resultados do planejamento experimental

Emulsão	Variáveis			Estabilidade após 15 dias	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro Médio de Gotas (μm)	Viscosidade a $0,1 \text{ s}^{-1}$ (cP)	Módulos a 1 rad/s		Tensão Superficial (mN/m)	
	%PPI	%Óleo	pH					G' (Pa)	G'' (Pa)	t = 0	t = 15d
1	-	-	+	48,6%	-36,30	6,7	151	0,009	0,035	29,4	38,8
2	+	-	+	92,4%	-40,85	3,8	1393	0,129	0,150	39,1	50,6
3	-	+	+	87,5%	-56,96	10,9	744	0,011	0,060	33,3	46,0
4	+	+	+	100%	-49,73	6,8	97320	31,63	14,71	40,7	57,5
5	-	-	-	67,0%	48,51	10,8	306	0,008	0,023	31,0	46,9
6	+	-	-	100%	47,87	9,9	3562	1,025	0,383	36,9	59,5
7	-	+	-	92,7%	52,95	10,4	1121	9,785	2,377	30,8	44,6
8	+	+	-	100%	65,60	5,4	22210	25,83	8,862	40,3	58,0
9	0	0	0	64,9%	-14,34	20,1	4481	3,61	1,465	31,2	38,9
10	0	0	0	67,0%	-15,39	19,9	3248	3,505	1,588	29,8	39,8
11	0	0	0	62,4%	-13,58	21,2	15180	7,935	2,51	33,2	37,5
Média dos pontos centrais				64,8%	-14,44	20,4	7640	5,017	1,854	31,4	37,6
Desvio padrão dos pontos centrais				2,3%	0,91	0,7	6560	2,528	0,571	1,7	1,4
Erro relativo dos pontos centrais				3,5%	6,3%	3,3%	85,9%	50,4%	30,8%	5,5%	3,6%

Para se avaliar a relação entre a estabilidade e as propriedades físico-químicas das emulsões, foi calculada a matriz de correlações entre as variáveis dependentes do planejamento. A partir dessa matriz, que pode ser vista na íntegra no Anexo D, foram consideradas como significativas as correlações com módulo acima de 0,60. Dessa forma, é possível perceber uma alta correlação da estabilidade com o módulo do potencial zeta (0,69), assim como com a tensão superficial da emulsão no tempo zero (0,80) e da mucilagem (0,60). Sendo os efeitos das tensões causados por problemas de medida relacionados com a viscosidade, análise reforçada pela alta correlação entre a tensão superficial e as propriedades reológicas, não seria indicado utilizar esse dado para correlacionar com a estabilidade. No entanto, isso indica que deve haver uma relação entre a reologia e estabilidade das emulsões.

4.5.1 Estabilidade

Foram feitas as emulsões com as diferentes formulações, seguindo os níveis do planejamento de experimentos, utilizando o isolado proteico de ervilha. A *Tabela 4.7* mostra os resultados em relação à porcentagem de emulsão estável após 15 dias. Nela, pode-se observar que as amostras 4, 6 e 8 foram as que apresentaram resultados satisfatórios quanto estabilidade, não apresentando separação de fases após 15 dias; como pode se observar na *Figura 4.12*.

Tabela 4.7 – Resultados da estabilidade das emulsões com PPI

Emulsão	Variáveis (nível)			Estabilidade após 15 dias
	%PPI	%Óleo	pH	
1	-	-	+	48,6%
2	+	-	+	92,4%
3	-	+	+	87,5%
4	+	+	+	100%
5	-	-	-	67,0%
6	+	-	-	100%
7	-	+	-	92,7%
8	+	+	-	100%
9	0	0	0	64,9%
10	0	0	0	67,0%

Emulsão	Variáveis (nível)			Estabilidade após 15 dias
	%PPI	%Óleo	pH	
11	0	0	0	62,4%
Média dos pontos centrais				64,8%
Desvio padrão dos pontos centrais				2,3%
Erro relativo dos pontos centrais				3,5%

Em uma primeira análise, é possível notar que as amostras com nível superior de emulsificante apresentaram maiores estabilidades, assim como as com nível superior de óleo. Pode-se justificar esse comportamento, pois, quanto maior a quantidade de óleo menor é a velocidade de cremação. (TADROS, 2004)



Figura 4.12 – Provetas com amostras de emulsões após 15 dias: amostras 1 a 11, da esquerda para a direita

Na análise visual é possível observar que nas amostras que se mostraram instáveis há a separação em 3 fases: uma fase menos densa, composta pela emulsão; uma fase intermediária, chamada de clarificado, composta por fase aquosa em excesso; e ao fundo, uma fase depositada, provavelmente composta por excesso de PPI não adsorvido e não solubilizado. Para verificar essa hipótese, foram deixadas amostras de mucilagem em repouso e, após algum tempo, foi possível observar a decantação de proteína insolúvel. As emulsões que apresentam esse comportamento de separação podem ser reformadas por uma agitação branda, podendo ser consideradas mais desejáveis do que se a fase oleosa se separasse do resto da emulsão.

Pode-se notar também a diferença de coloração entre as emulsões do ponto central, mais amareladas, das demais emulsões, mais esbranquiçadas, possivelmente devido à menor quantidade de proteína dissolvida na fase aquosa. No pl a solubilidade do PPI diminui, como pode ser observado pela diferença de turbidez das fases clarificadas entre as emulsões do ponto central e as demais. Por conta dessa baixa solubilidade, tem uma quantidade menor de proteínas livres na fase aquosa, reduzindo assim a turbidez da emulsão e expondo as gotas (de coloração alaranjada) à uma maior incidência de luz. Demais imagens das emulsões podem ser observadas no Anexo B.

As amostras no ponto central (9-11), apesar de resultar em Índices de Estabilidade maiores do que da amostra 1 e na mesma faixa da amostra 5, demonstraram alta instabilidade, ocorrendo a separação de fases em questão de minutos (30-45 minutos), enquanto as separações das outras amostras se prolongaram por algumas horas. Essa alta instabilidade nos pontos centrais era esperada, considerando que nessas condições o pH das emulsões (~4,7) é relativamente próximo do ponto isoelétrico do PPI (~4,3), em que devido à ausência de forças eletrostáticas, ocorre uma redução na repulsão entre as gotas, levando a emulsões menos estáveis.

Vale ressaltar que até o momento da redação deste documento, as emulsões estáveis mantiveram-se sem separação de fases, apresentando assim uma estabilidade de ao menos 2 meses.

Os efeitos de cada variável na estabilidade, apresentados na *Tabela 4.8*, podem ser identificados a partir de análises dos resultados do planejamento de experimentos, utilizando o *software Statistica*.

Tabela 4.8 – Efeito das variáveis sobre a estabilidade das emulsões.

Índice de Estabilidade			
	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor ¹
Média / Interseção	85,9%	0,8	0.000
Curvatura	-42,6%	2,9	0.005
(1) % PPI	24,3%	1,5%	0.004
(2) % Óleo	18,2%	1,5%	0.007
(3) pH	-8,0%	1,5%	0.034
1 x 2	-14,4%	1,5%	0.011
1 x 3	4,2%	1,5%	0.110
2 x 3	5,4%	1,5%	0.071

¹Valores de $p < 0,10$ indicam que a variável é estatisticamente significativa (em negrito)

Desse modo, pode-se perceber que, à exceção do efeito da interação entre a porcentagem de PPI e o pH, todos os outros efeitos foram significativos para a obtenção de altas estabilidades. Os efeitos da %PPI (1) e %Óleo (2) apresentaram efeito positivo, de modo que ao aumentar esses fatores do nível -1 para o nível 1 leva ao aumento da estabilidade. Essas respostas estão de acordo com a primeira análise feita. O efeito da interação entre %PPI e %Óleo (1x2) é negativo, indicando que o efeito sinérgico entre eles pode ser prejudicial à estabilidade.

Além disso, o efeito do pH (3) também é negativo, demonstrando que no nível inferior de pH as amostras tiveram um aumento na estabilidade. Gharsallaoui *et al.*, 2009, atribui esse comportamento ao fato de em pH ácido as globulinas dissociadas formarem redes viscoelásticas mais densas e fortes ao adsorver na interface O/A. Entretanto, verificando os demais resultados apresentados no decorrer deste trabalho, pode-se notar que a redução do pH resultou em uma diminuição na viscosidade e nos módulos viscoso e elástico das emulsões, indicando que, para este sistema, as redes viscoelásticas formadas apresentam maior força em pH neutro. Entrementes, a utilização do nível inferior de pH foi positiva para o aumento do valor absoluto de potencial zeta desse sistema. Sendo assim, propõe-se que o efeito do pH para o aumento da estabilidade está mais relacionado ao aumento de impedimento eletrostático do que à reologia das emulsões.

O p-valor da curvatura abaixo de 0,10 confirma a hipótese de linearidade estabilidade em relação a esses fatores e a *Figura 4.13* apresenta o gráfico de valores preditos contra valores observados, demonstrando que o modelo descreve relativamente bem a estabilidade das emulsões.

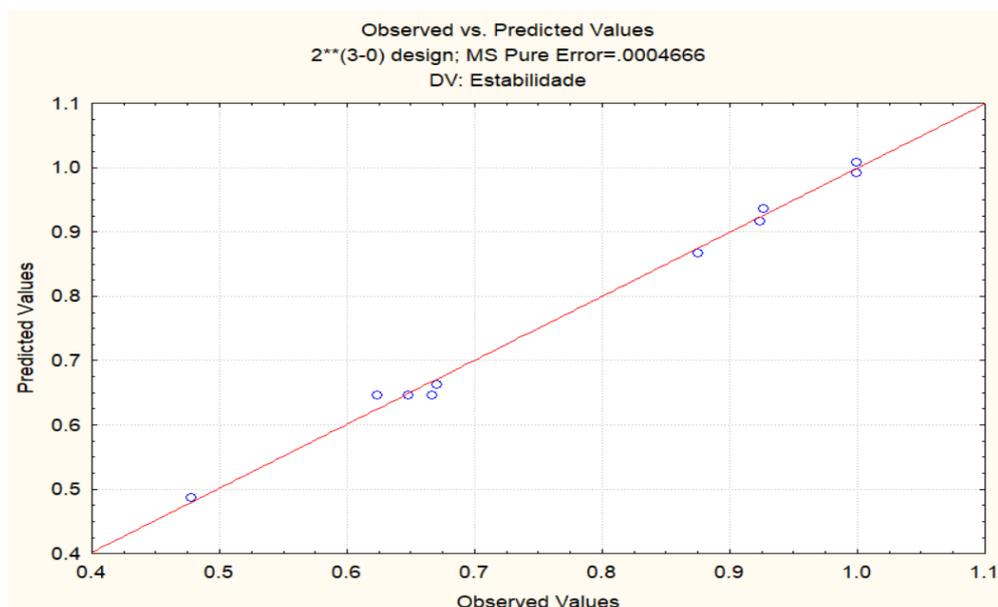


Figura 4.13 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para a estabilidade

4.5.2 Tensão Superficial

A Tabela 4.9 mostra os resultados em relação à tensão superficial das emulsões formadas no tempo zero e após 15 dias.

Tabela 4.9 – Resultados de tensão superficial das emulsões com PPI

Emulsão	Variáveis			Estabilidade após 15 dias	Tensão Superficial (mN/m)	
	%PPI	%Óleo	pH		t = 0	t = 15d
1	-	-	+	48,6%	29,4	38,8
2	+	-	+	92,4%	39,1	50,6
3	-	+	+	87,5%	33,3	46,0
4	+	+	+	100%	40,7	57,5
5	-	-	-	67,0%	31,0	46,9
6	+	-	-	100%	36,9	59,5
7	-	+	-	92,7%	30,8	44,6
8	+	+	-	100%	40,3	58,0
9	0	0	0	64,9%	31,2	38,9
10	0	0	0	67,0%	29,8	39,8
11	0	0	0	62,4%	33,2	37,5
Média dos pontos centrais				64,8%	31,4	37,6
Desvio padrão dos pontos centrais				2,3%	1,7	1,4
Erro relativo dos pontos centrais				3,5%	5,5%	3,6%

É possível perceber que, de modo geral, as emulsões com maiores estabilidades apresentaram também maiores tensões superficiais. Aquelas com as menores estabilidades apresentaram em um primeiro momento tensões superficiais na faixa de 30 mN/m, bastante próximas da tensão superficial do óleo de laranja (~28 mN/m). Isso pode demonstrar uma liberação de óleo, invisível a olho nu, mas representativa para a estabilidade final das amostras.

Além disso, é notável que após serem deixadas em repouso por 15 dias, todas as emulsões sofreram aumentos em suas tensões superficiais. Esse aumento pode ter duas origens. Assim como foi comentado para a medida da tensão superficial das mucilagens, a formação de uma rede tridimensional pela presença da proteína solúvel eleva muito a viscosidade da emulsão, o que pode interferir na medida da tensão superficial. Outro fator é a precipitação do excesso de proteína da fase contínua, o que também provocaria o aumento da tensão superficial da emulsão com o tempo.

Essa análise é corroborada pela alta correlação obtida no planejamento entre a tensão superficial e as variáveis relacionadas à reologia das emulsões (Anexo D). Como essa correlação é positiva, quanto maiores forem a viscosidade e os módulos viscoso e elástico, maior tende a ser a tensão superficial. Sendo assim, é esperado que as amostras com maiores viscosidades apresentem também maiores estabilidades.

Também é possível notar que as amostras com maiores tensões superficiais foram aquelas com maiores quantidades de proteína. Ressalta-se que o efeito normalmente esperado seria que o aumento na quantidade de PPI (que tem propriedades tensoativas), promovesse uma redução na tensão superficial. No entanto, em função dessa interferência da viscosidade na medida, observa-se o aumento no valor da tensão.

Como os efeitos na tensão superficial são causados por problemas de medida, não faz sentido realizar a análise de efeitos significativos para a tensão superficial.

4.5.3 Potencial Zeta

A *Tabela 4.10* mostra os resultados em relação ao potencial zeta das emulsões recém formadas.

Tabela 4.10 – Resultados de potencial zeta das emulsões com PPI

Emulsão	Variáveis			Estabilidade após 15 dias	Potencial Zeta (mV)
	%PPI	%Óleo	pH		
1	-	-	+	48,6%	-36,30
2	+	-	+	92,4%	-40,85
3	-	+	+	87,5%	-56,96
4	+	+	+	100%	-49,73
5	-	-	-	67,0%	48,51
6	+	-	-	100%	47,87
7	-	+	-	92,7%	52,95
8	+	+	-	100%	65,60
9	0	0	0	64,9%	-14,34
10	0	0	0	67,0%	-15,39
11	0	0	0	62,4%	-13,58
Média dos pontos centrais				64,8%	-14,44
Desvio padrão dos pontos centrais				2,3%	0,91
Erro relativo dos pontos centrais				3,5%	6,3%

Esses resultados demonstram que as amostras com valores absolutos elevados de potencial zeta (>40mV) tendem a apresentar maiores estabilidades, indicando uma contribuição considerável de impedimento eletrostático para a estabilização das emulsões.

Vale ressaltar a inversão de sinal do potencial zeta entre os níveis de pH do planejamento, como esperado. Pelo fato das proteínas serem moléculas anfífilas, suas cargas efetivas variam de acordo com o pH do meio. Acima do ponto isoelétrico da proteína ($pI \sim 4,3$), no qual a carga efetiva é nula, há uma maior quantidade de sítios carregados negativamente na estrutura da proteína, de modo que o potencial zeta se torna negativo. Em pH ácido, abaixo do pI , essa carga efetiva se torna positiva, invertendo o sinal do potencial zeta, como visto pelo resultado do planejamento de experimentos.

Os efeitos de cada variável no valor absoluto do potencial zeta, apresentados na Tabela 4.11, podem ser identificados a partir de análises dos resultados do planejamento de experimentos, utilizando o *software Statistica*.

Tabela 4.11 – Efeito das variáveis sobre o valor absoluto do potencial zeta das emulsões.

Módulo do Potencial Zeta			
	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor ¹
Média / Interseção	49,84	0,32	0,000
Curvatura	-70,81	1,23	0,000
(1) % PPI	2,34	0,64	0,068
(2) % Óleo	12,92	0,64	0,002
(3) pH	-7,78	0,64	0,007
1 x 2	0,39	0,64	0,610
1 x 3	-3,67	0,64	0,029
2 x 3	1,84	0,64	0,104

¹Valores de p < 0,10 indicam que a variável é estatisticamente significativa (em negrito)

Desse modo, pode-se perceber que apenas os efeitos das interações entre as concentrações de proteína e de óleo (1x2), e entre a concentração de óleo e o pH (2x3) não foram significativos para a obtenção de potenciais zeta elevados em módulo.

O aumento da concentração de PPI resulta em maiores potenciais zeta, provavelmente por uma maior adsorção de proteínas carregadas nas interfaces. Com o aumento da quantidade de óleo, aumenta-se a área interfacial, possibilitando que parte da quantidade de proteínas livres na fase aquosa tenham onde adsorver, aumentando assim o efeito da repulsão eletrostática.

Com efeito negativo para o pH, é possível que no nível inferior de pH (~2,5) as proteínas mudem para uma conformação com maior adsorção às gotas ou maior densidade de cargas do que no nível superior (pH neutro), aumentando assim a carga efetiva e, conseqüentemente, o potencial zeta. Essa relação entre o pH e as proteínas ainda ajudaria a explicar o efeito da interação entre pH e a concentração de PPI ser significativo.

O p-valor da curvatura abaixo de 0,10 confirma a hipótese de linearidade das propriedades em relação ao módulo do potencial zeta e a *Figura 4.14* apresenta o gráfico de valores preditos contra valores observados, demonstrando que o modelo descreve relativamente bem essa propriedade.

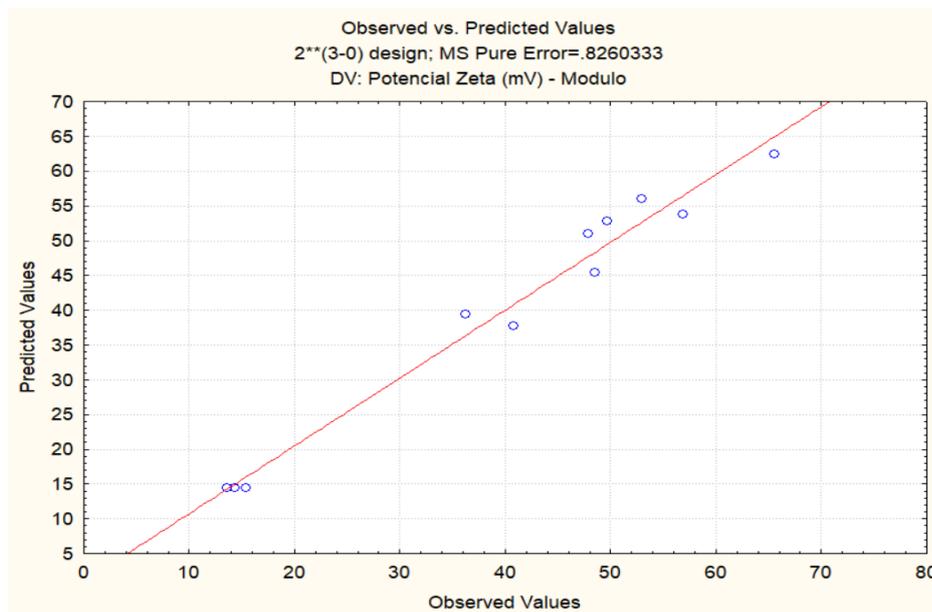


Figura 4.14 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o módulo do potencial zeta

4.5.4 Diâmetro de gotas

A Tabela 4.12 mostra os resultados em relação ao diâmetro médio de gotas das emulsões formadas.

Tabela 4.12 – Resultados diâmetro médio de gotas das emulsões com PPI

Emulsão	Variáveis			Estabilidade após 15 dias	Diâmetro de Gotas (µm)
	%PPI	%Óleo	pH		
1	-	-	+	48,6%	6,7
2	+	-	+	92,4%	3,8
3	-	+	+	87,5%	10,9
4	+	+	+	100%	6,8
5	-	-	-	67,0%	10,8
6	+	-	-	100%	9,9
7	-	+	-	92,7%	10,4
8	+	+	-	100%	5,4
9	0	0	0	64,9%	20,1
10	0	0	0	67,0%	19,9
11	0	0	0	62,4%	21,2
Média dos pontos centrais				64,8%	20,4
Desvio padrão dos pontos centrais				2,3%	0,7
Erro relativo dos pontos centrais				3,5%	3,3%

É possível notar que, como esperado, as emulsões com menores diâmetros médios de gotas tendem a apresentar estabilidades relativamente maiores. Pode-se ainda perceber a instabilidade das emulsões no ponto central pelo aumento considerável do tamanho médio das gotas.

Na *Figura 4.15*, fica clara essa desestabilização nos pontos centrais ao se observar como o comportamento das gotas, grandes e com formas irregulares, é diferente das demais amostras (*Figura 4.16*).

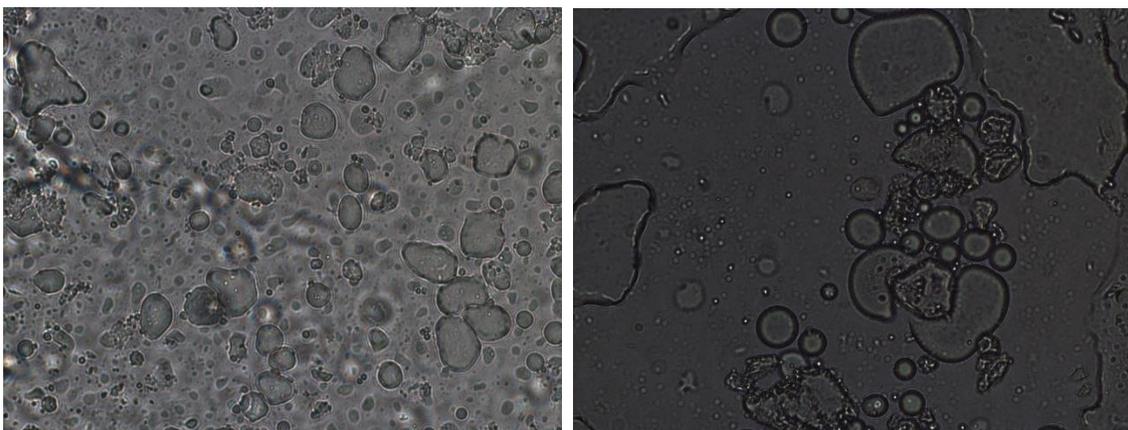


Figura 4.15 – Imagens de microscopia de amostras do ponto central (aumento 50x)

Nas micrografias das amostras mais estáveis (4, 6 e 8), *Figura 4.16*, é possível perceber uma grande concentração de gotas pequenas em contato próximo, com os filmes de proteínas nas interfaces impedindo que ocorra coalescência e formando uma estrutura semelhante a um gel que restringe o movimento das gotas.

É possível ainda observar que nas amostras 3 e 7 (*Figura 4.16*) ocorreu a formação de algumas gotas com emulsão múltipla. Em ambos os casos as emulsões estão em condição de alta concentração de óleo e baixa concentração de proteínas. Altas concentrações da fase dispersa podem favorecer a inversão da emulsão, o que, aliado à baixa concentração de proteínas, pode justificar a formação de emulsões múltiplas.

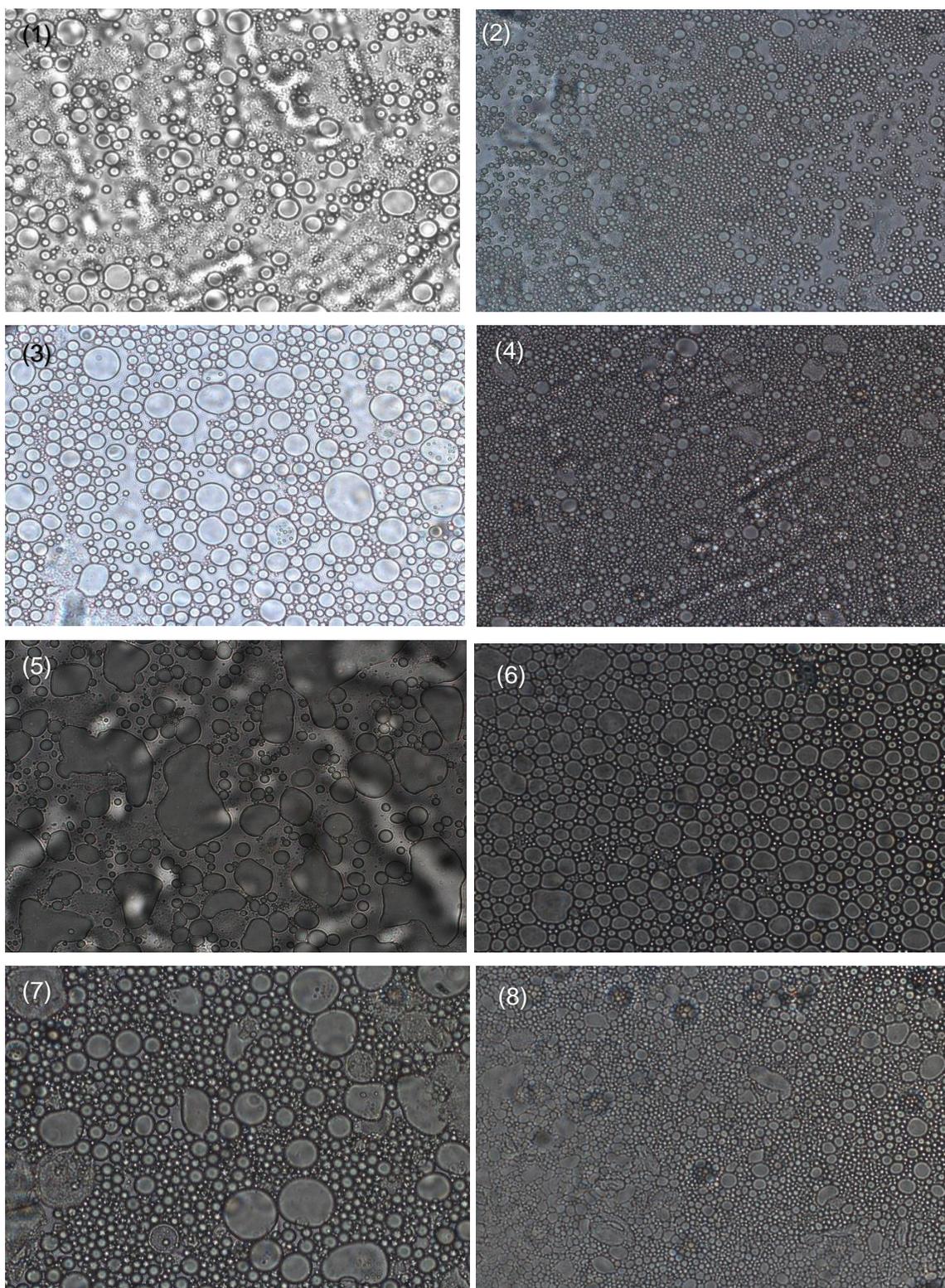


Figura 4.16 – Imagens de microscopia das amostras 1 a 8 do planejamento de experimentos (aumentos de 50x)

Nota-se ainda, uma maior dispersão de tamanhos (Anexo C) nas amostras 1 e 5, sendo possível ver nas micrografias (*Figura 4.16*) algumas gotas semelhantes às das amostras no ponto central, indicando uma maior instabilidade nesses sistemas.

Vale ressaltar que todas as amostras apresentaram distribuição monomodal de diâmetros de gotas, como pode ser verificado nos histogramas presentes no Anexo C.

Os efeitos de cada variável no diâmetro médio das gotas, apresentados na *Tabela 4.13*, podem ser identificados a partir de análises dos resultados do planejamento de experimentos, utilizando o *software Statistica*.

Tabela 4.13 – Efeito das variáveis sobre o diâmetro médio de gotas das emulsões.

Diâmetro Médio de Gotas			
	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor ¹
Média / Interseção	8,08	0,24	0,001
Curvatura	24,62	0,91	0,001
(1) % PPI	-3,23	0,47	0,021
(2) % Óleo	0,58	0,47	0,344
(3) pH	-2,08	0,47	0,048
1 x 2	-1,33	0,47	0,107
1 x 3	-0,25	0,47	0,652
2 x 3	3,04	0,47	0,023

¹Valores de $p < 0,10$ indicam que a variável é estatisticamente significativa (em negrito)

Desse modo, pode-se perceber que os efeitos da concentração de PPI, do pH e da interação entre o pH e a concentração de óleo foram significativos para a obtenção de diferentes tamanhos médios de gotas.

O aumento da concentração de PPI possibilita que uma maior área interfacial seja coberta, favorecendo a formação de gotas menores. Em pH mais ácido, uma mudança de conformação, ou mesmo uma possível desnaturação, das proteínas pode favorecer uma cobertura de menores áreas de interface por proteína, gerando assim, gotas maiores que em pH neutro.

Uma maior quantidade de óleo, aliada a um pH mais elevado podem atuar em conjunto para aumentar a área interfacial do sistema e a tensão interfacial PPI/óleo, justificando o efeito sinérgico positivo (gotas maiores) dessa interação, na tentativa de contrabalancear essas alterações.

O p-valor da curvatura abaixo de 0,10 confirma a hipótese de linearidade das propriedades em relação ao diâmetro médio de gotas e a *Figura 4.17* apresenta o gráfico de valores preditos contra valores observados, demonstrando que o modelo descreve relativamente bem essa propriedade.

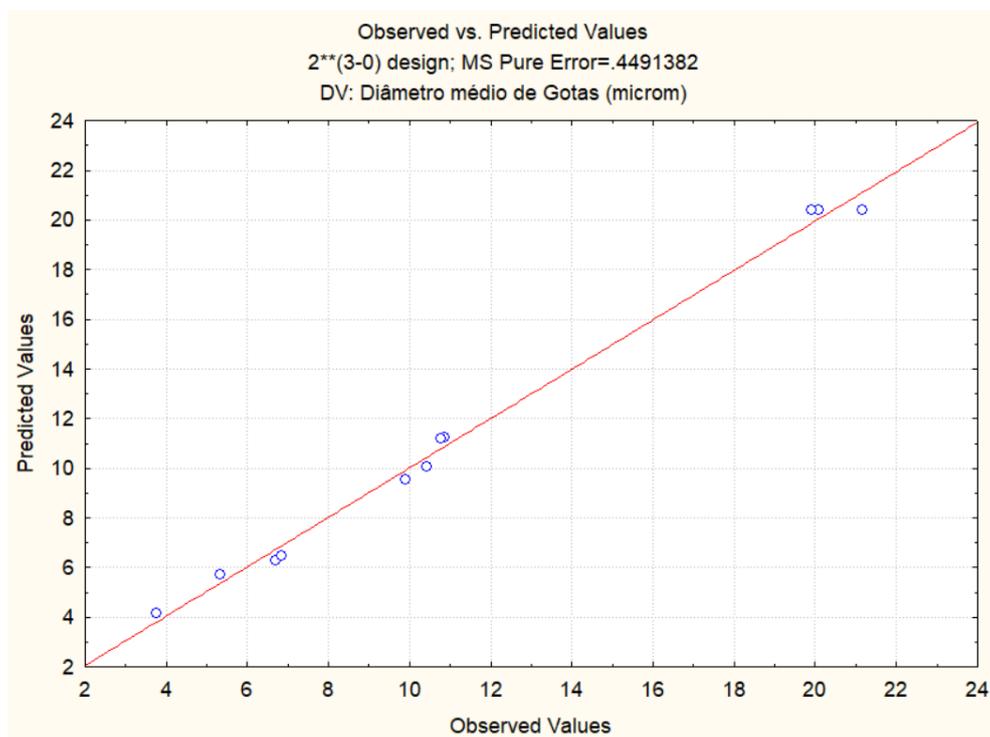


Figura 4.17 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o diâmetro médio de gotas

4.5.5 Reologia

Viscosidade

A variação das viscosidades foram analisadas sob taxa de cisalhamento entre 0,03 e 1000 s^{-1} . Na *Figura 4.18*, fica possível observar a redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, comprovando o comportamento pseudoplástico das emulsões. Por conta disso, foi escolhida a taxa de 0,1 s^{-1} para se fazer a comparação das viscosidades entre as amostras, pois em emulsões pseudoplásticas, menores taxas seriam mais representativas. Os erros relativos elevados observados para todas as

variáveis da reologia estão relacionados com as fontes de erros experimentais citadas no item 3.8.5. Além disso, em baixas taxas de cisalhamento, a viscosidade está em uma região de queda exponencial, aumentando ainda mais essa incerteza de medida.

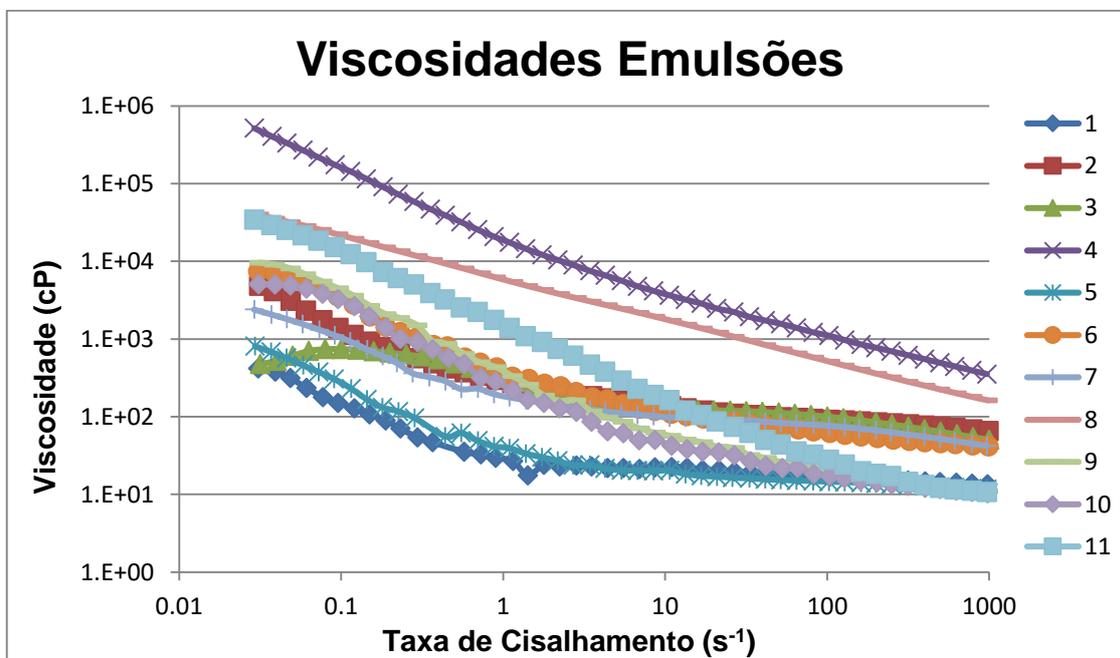


Figura 4.18 – Gráfico de viscosidades versus taxa de cisalhamento das emulsões

A Tabela 4.14 mostra os resultados em relação à viscosidade das emulsões recém formadas, sob taxa de cisalhamento de $0,1 \text{ s}^{-1}$.

Tabela 4.14 – Resultados de viscosidade das emulsões com PPI

Emulsão	Variáveis			Estabilidade após 15 dias	Viscosidade a $0,1 \text{ s}^{-1}$ (cP)
	%PPI	%Óleo	pH		
1	-	-	+	48,6%	151
2	+	-	+	92,4%	1393
3	-	+	+	87,5%	744
4	+	+	+	100%	97320
5	-	-	-	67,0%	306
6	+	-	-	100%	3562
7	-	+	-	92,7%	1121
8	+	+	-	100%	22210
9	0	0	0	64,9%	4481
10	0	0	0	67,0%	3248
11	0	0	0	62,4%	15180
Média dos pontos centrais				64,8%	7640
Desvio padrão dos pontos centrais				2,3%	6560
Erro relativo dos pontos centrais				3,5%	85,9%

Esses resultados demonstram que as amostras com viscosidades mais elevadas tendem a ser mais estáveis. As amostras 4 e 8, com níveis superiores de proteína e óleo, demonstram um grande aumento na viscosidade quando comparadas às demais, reforçando a ideia da formação de uma microestrutura semelhante a um gel, comentada na discussão da tensão superficial e observada nas micrografias. É notável também que a viscosidade tende a aumentar com aumento da concentração de PPI e de fração de óleo, pela intensificação das forças de interação entre as gotas e possível aglomeração de proteínas entre elas. Vale ressaltar que a diferença de consistência das emulsões é visualmente perceptível.

Pode-se verificar na *Tabela 4.15* os efeitos significativos para as viscosidades das emulsões sob taxa de cisalhamento de $0,1 \text{ s}^{-1}$. Contudo, observa-se que o p-valor da curvatura foi superior a 0,10, indicando que a hipótese de linearidade não foi confirmada.

Tabela 4.15 – Efeito das variáveis sobre a viscosidade das emulsões

Viscosidade a $0,1 \text{ s}^{-1}$			
	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor ¹
Média / Interseção	15851	2320	0,021
Curvatura	-16429	8885	0,206
(1) % PPI	30541	4640	0,022
(2) % Óleo	28996	4640	0,025
(3) pH	18102	4640	0,060
1 x 2	28291	4640	0,026
1 x 3	18368	4640	0,058
2 x 3	19264	4640	0,053

¹Valores de $p < 0,10$ indicam que a variável é estatisticamente significativa (em negrito)

Ao se analisar o gráfico de valores previstos em função dos valores observados, *Figura 4.19*, pode-se notar uma concentração de dados no início da curva, com grande espaçamento entre os pontos que deslocam a curva. Com isso, é possível que para essa propriedade haja uma contribuição não linear, não prevista pelo modelo. A formação da estrutura organizada de gel em algumas das amostras, aumentando suas viscosidades, pode ser responsável por essa não linearidade, como pode-se ver pelas grandes diferenças de intensidade dessa propriedade entre as formulações.

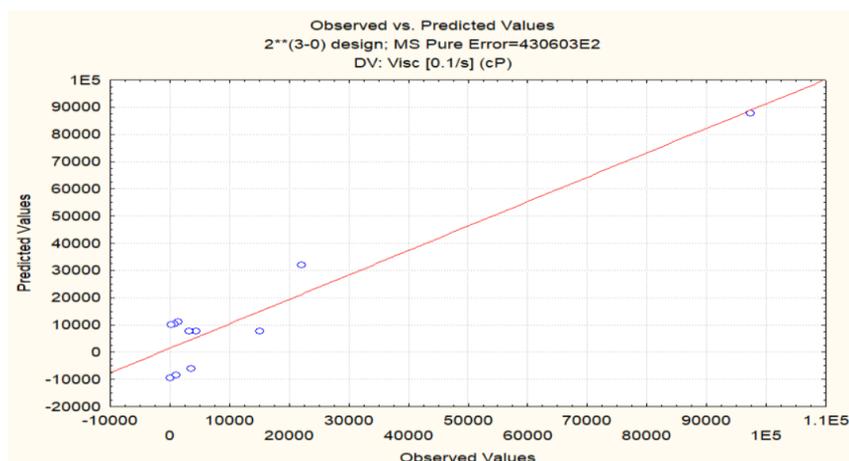


Figura 4.19 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para a viscosidade das emulsões a $0,1 \text{ s}^{-1}$

Testes Oscilatórios

Os testes dinâmicos, ou oscilatórios, foram realizados na faixa de frequências de 1 a 100 rad/s, para se observar o comportamento dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') das amostras. A Tabela 4.16 mostra os resultados em relação a G' e G'' , na frequência angular de 1 rad/s, por ser uma situação com poucos distúrbios. Os erros relativos elevados observados para todas as variáveis da reologia estão relacionados com as fontes de erros experimentais citadas no item 3.8.5.

Tabela 4.16 – Resultados dos testes dinâmicos das emulsões com PPI

Emulsão	Variáveis			Estabilidade após 15 dias	G' a 1 rad/s (Pa)	G'' a 1 rad/s (Pa)
	%PPI	%Óleo	pH			
1	-	-	+	48,6%	0,009	0,035
2	+	-	+	92,4%	0,129	0,150
3	-	+	+	87,5%	0,011	0,060
4	+	+	+	100%	31,63	14,71
5	-	-	-	67,0%	0,008	0,023
6	+	-	-	100%	1,025	0,383
7	-	+	-	92,7%	9,785	2,377
8	+	+	-	100%	25,83	8,862
9	0	0	0	64,9%	3,61	1,465
10	0	0	0	67,0%	3,505	1,588
11	0	0	0	62,4%	7,935	2,51
Média dos pontos centrais				64,8%	5,017	1,854
Desvio padrão dos pontos centrais				2,3%	2,528	0,571
Erro relativo dos pontos centrais				3,5%	50,4%	30,8%

Analisando estes dados, é possível perceber uma intensidade consideravelmente maior em ambos os módulos nas amostras estáveis com níveis superiores de PPI e de óleo (amostras 4 e 8), nas quais o módulo elástico é consideravelmente maior do que o módulo viscoso, reforçando a ideia da formação da rede viscoelástica que mantém a estrutura da emulsão estável. Nas amostras instáveis de consistência mais líquida (amostras 1 e 5) percebem-se módulos viscosos superiores aos elásticos, ambos com baixíssima intensidade. Dessa forma, pode-se dizer que a formação dessa estrutura favorece a estabilização das emulsões.

Foram construídos os gráficos dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular, sendo possível observar 4 comportamentos diferentes entre as amostras (*Figura 4.20 a Figura 4.23*). Os gráficos de todas as amostras podem ser vistos no Anexo E.

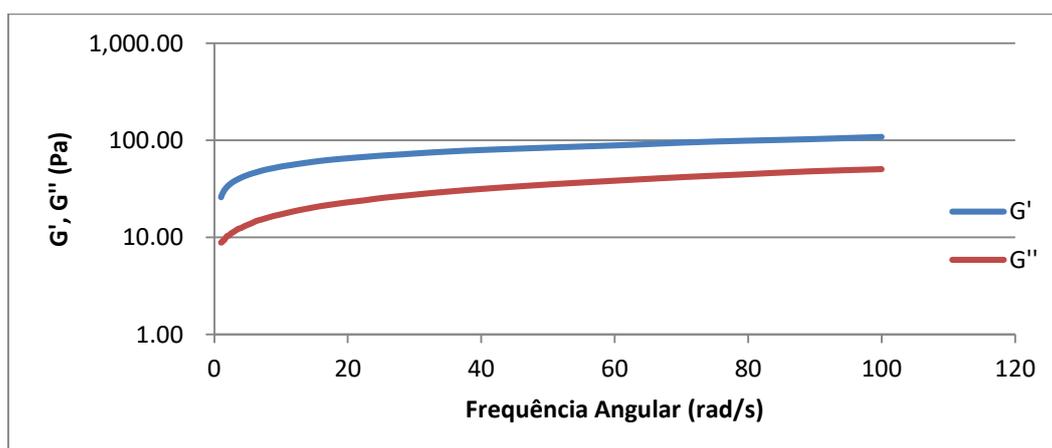


Figura 4.20 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 8

Na *Figura 4.20* está representado o primeiro comportamento, observado nas amostras 4, 7, 8, e nas amostras no ponto central. Nesse gráfico, é visto que para estas amostras a emulsão apresenta um comportamento elástico dominante desde frequências mais baixas até frequências mais altas, estando relacionado à formação da microestrutura viscoelástica observada.

Esse comportamento é típico de quando a rede de gotas não consegue se reorganizar para acomodar o distúrbio no intervalo de uma oscilação. Essa estrutura de gel é estabelecida pelo aumento das interações entre as gotas em conjunto com a

presença de agregados proteicos entre elas. Tal comportamento se assemelha ao encontrado em algumas condições de pré-tratamento dos emulsificantes por Diftis, Biliaderis e Kiosseoglou, 2005, em emulsões modelo de molhos para salada estabilizadas com misturas de isolado proteico de soja com dextrano. (DIFTIS; BILIADERIS; KIOSSEOGLU, 2005)

Esse comportamento é típico de emulgéis, emulsões que podem formar géis, como pode ser visto nos trabalhos de Santos *et al.*, 2015, com a adição de goma guar em emulsões de óleo de girassol com isolado proteico de batata; e de Félix *et al.*, 2019, em emulsões de óleo de girassol com outras proteínas de leguminosas (fava e grão-de-bico). As amostras mais destacadas deste trabalhos (amostras 4 e 8) apresentam intensidade de módulos na faixa de 10^2 Pa, em altas frequências, se aproximando do comportamento reológico da emulsão de Santos *et.al*, com adição de 0,2% de goma guar, mas abaixo das intensidades obtidas por Félix *et al.* para as melhores condições de suas emulsões com fava e grão-de-bico (G' na faixa de 10^3 Pa). (FÉLIX et al., 2019; SANTOS et al., 2015)

A grande diferença de intensidade dos módulos das amostras 4 e 8 (na ordem de 10-100 Pa), as mais estáveis, para as demais (1-20 Pa), pode ser um fator que ajudaria a explicar a diferença de estabilidade.

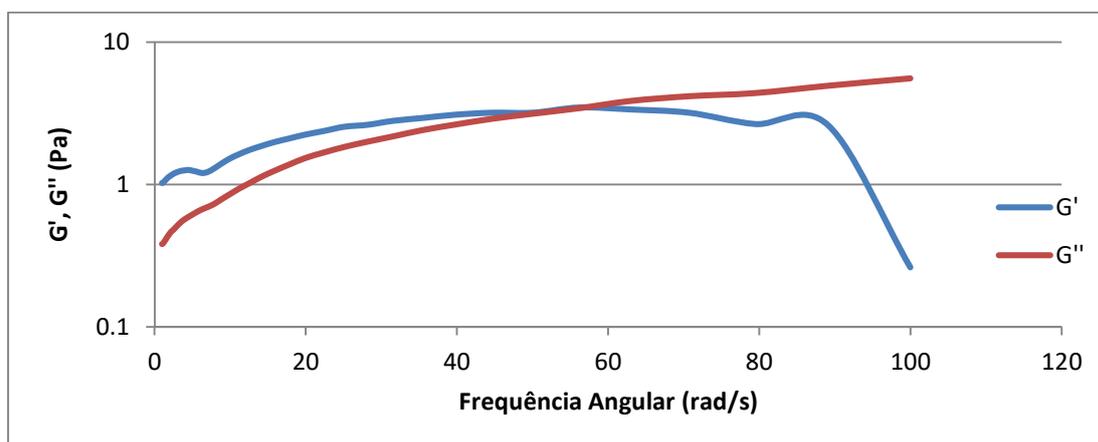


Figura 4.21 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 6

Em frequências mais baixas, a amostra 6, Figura 4.21, apresenta comportamento típico de um sólido viscoelástico, iniciando com o módulo elástico maior do que o módulo

viscoso, mas, com o aumento da frequência, o módulo viscoso aumenta mais intensamente que o módulo elástico, chegando a ultrapassá-lo, quando isso ocorre a amostra deixa de ser um gel. Em frequências mais altas percebe-se uma queda vertiginosa no módulo elástico, sugerindo a quebra dessa estrutura. (MALVERN, 2016)

Entrementes, pode-se notar que essa emulsão demonstrou alto índice de estabilidade, mesmo com módulos com menor intensidade (0,3-8 Pa) que as outras amostras estáveis (4 e 8) e com a possível instabilidade estrutural causada pelo aumento da frequência, demonstrando que, mesmo a reologia tendo um papel na estabilização das emulsões, o fator primordial ainda parece ser os impedimentos estérico e eletrostático das proteínas adsorvidas nas interfaces.

As amostras 2, 3 e 5 apresentam o comportamento apresentado na *Figura 4.22*, em que os módulos iniciam bastante próximos um do outro, com o módulo viscoso tendendo a aumentar mais com o aumento da frequência angular. Isso indica que o gel não é formado nessas condições, análise corroborada pela observação da consistência líquida dessas emulsões.

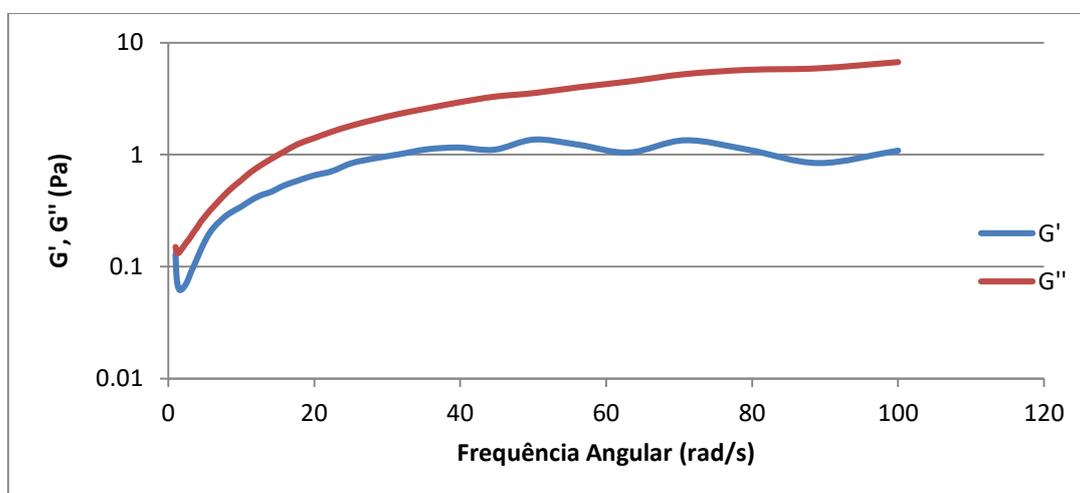


Figura 4.22 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 2

Esse comportamento mais líquido pode estar associado a uma rede de gotas agregadas fracamente, que facilmente se reorganiza em resposta à tensão aplicada. Esse tipo de comportamento é semelhante ao encontrado em uma das condições de pré-tratamento dos emulsificantes por Diftis, Biliaderis e Kiosseoglou, 2005, em

emulsões modelo de molhos para salada estabilizadas com misturas de isolado proteico de soja com dextrano. (DIFTIS; BILIADERIS; KIOSSEOGLOU, 2005)

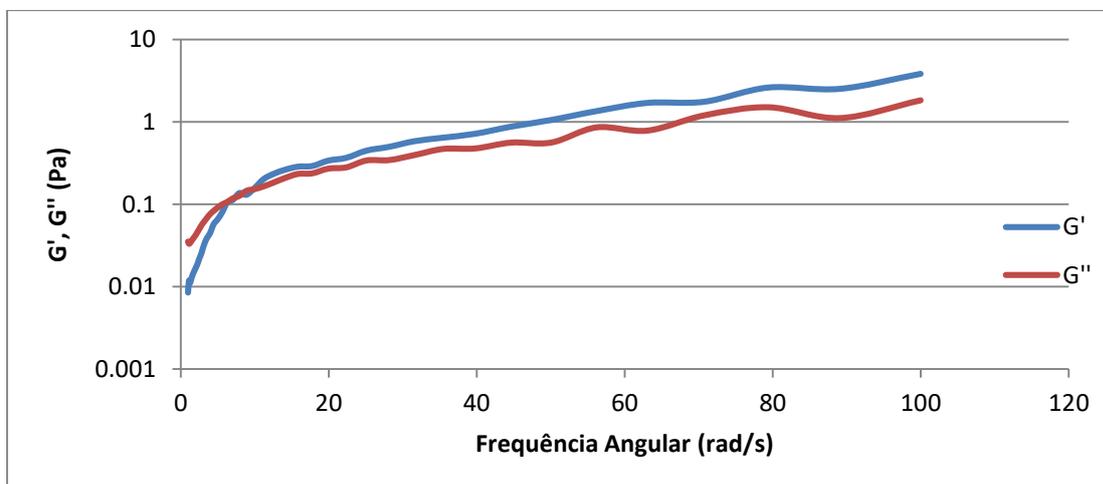


Figura 4.23 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 1

Por fim, a amostra 1 apresenta o comportamento apresentado na *Figura 4.23*, típico de líquidos viscoelásticos, em que a baixas frequências o módulo viscoso é superior ao elástico e a altas frequências o comportamento se inverte. (MALVERN, 2016)

Esse tipo de comportamento é semelhante ao obtido por Hao *et al.*, 2018, em amostras com menores quantidades do polissacarídeo *Sparassis crispa*. Nas amostras com maiores quantidades desse polissacarídeo, o comportamento é o de gel, semelhante ao da *Figura 4.20*. (HAO *et al.*, 2018)

De qualquer forma, pode-se perceber que esses módulos não se distanciam muito e que, mesmo obtendo um caráter mais elástico em frequências mais altas, esse comportamento não é suficiente para estabilizar estas emulsões.

Os efeitos de cada variável nos módulos, na frequência de 1 rad/s, apresentados na *Tabela 4.17*, podem ser identificados a partir de análises dos resultados do planejamento de experimentos.

Tabela 4.17 – Efeito das variáveis sobre os módulos elástico e viscoso das emulsões

	G' a 1 rad/s			G'' a 1 rad/s		
	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor ¹	Efeito Estimado	Erro Padrão	p-valor ¹
Média / Interseção	8,553	0,894	0,011	3,325	0,202	0,004
Curvatura	-7,731	3,423	0,175	-2,942	0,773	0,063
(1) % PPI	12,201	1,787	0,021	5,402	0,404	0,006
(2) % Óleo	16,521	1,787	0,012	6,355	0,404	0,004
(3) pH	-1,217	1,787	0,566	0,828	0,404	0,177
1 x 2	11,632	1,787	0,023	5,165	0,404	0,006
1 x 3	3,669	1,787	0,177	1,980	0,404	0,039
2 x 3	-0,770	1,787	0,709	0,938	0,404	0,146

¹Valores de p < 0,10 indicam que a variável é estatisticamente significativa (em negrito)

Assim como para a viscosidade, para o módulo elástico o p-valor da curvatura foi superior a 0,10, indicando que a hipótese de linearidade não é correspondida. Para o módulo viscoso essa hipótese foi confirmada, de modo que os efeitos da concentração de PPI e fração de óleo são significativos e quanto maiores forem essas variáveis, maior esse módulo para a emulsão, como observado anteriormente. Contudo, ambos os gráficos de valores preditos contra observados, *Figura 4.24* e *Figura 4.25*, apresentam certa concentração de pontos na região inicial do gráfico, dando indícios de uma contribuição não linear para essas propriedades.

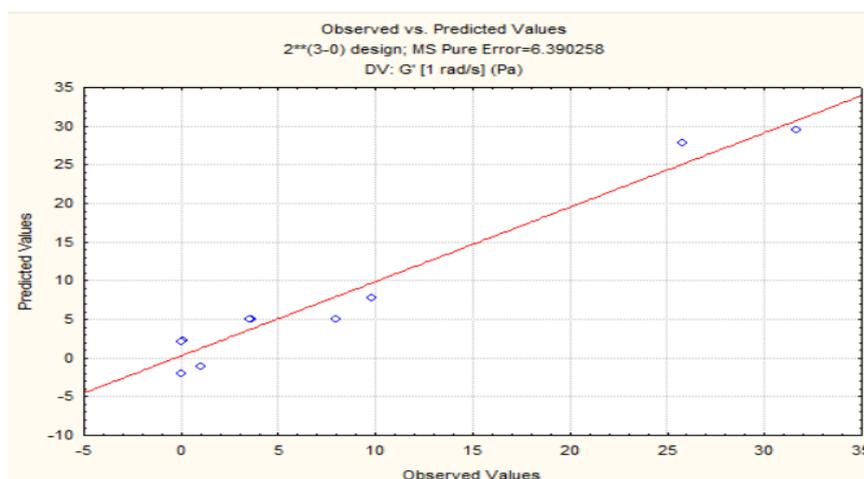


Figura 4.24 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o módulo elástico a 1 rad/s

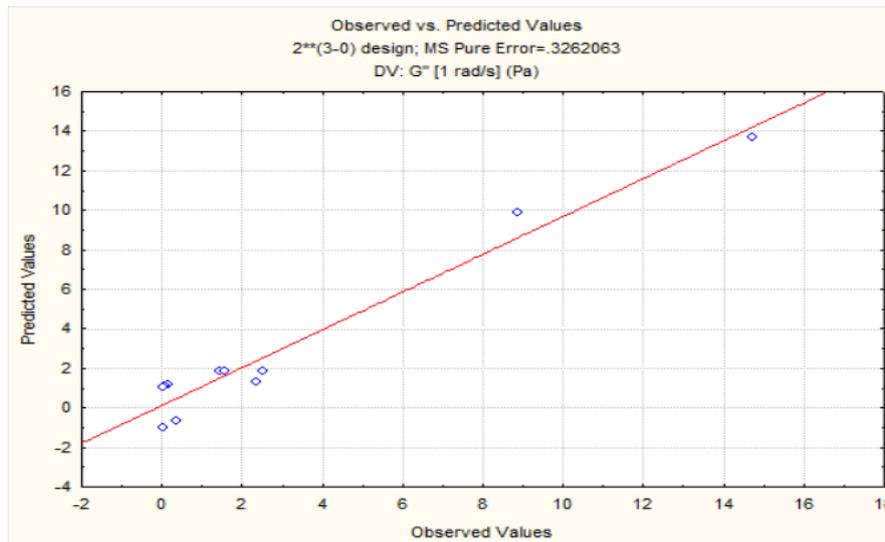


Figura 4.25 – Gráfico de valores preditos contra valores observados para o módulo viscoso a 1 rad/s

A formação da estrutura organizada de gel mais pronunciada em algumas das amostras pode ser responsável por essa não linearidade, como pode-se ver pela variedade de comportamentos e pela diferença de intensidades dos módulos entre as formulações.

4.5 Reologia Interfacial

Com as medidas da reologia dilatacional interfacial, foi possível se obter a tensão interfacial ($\gamma_{a/o}$) de um gota de 2 μL de fase aquosa com 0,01% de PPI em óleo de laranja, assim como a elasticidade dilatacional (ϵ^*) e os módulos elástico (ϵ') e viscoso (ϵ''). Os valores obtidos para as duas condições de pH, mais ou menos seus desvios padrões, podem ser observados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Resultados da reologia interfacial PPI/óleo de laranja

	pH	
	Ácido	Neutro
$\gamma_{a/o}$ (mN/m)	1,975±0,551	2,143±0,610
ϵ^* (mN/m)	3,160±0,295	3,592±0,218
ϵ' (mN/m)	2,782±0,257	3,199±0,182
ϵ'' (mN/m)	1,496±0,172	1,626±0,208

Estes resultados mostram que a interface água-óleo contendo uma pequena quantidade de proteína exibe um comportamento viscoelástico. O módulo elástico está relacionado à resistência da interface ao aumento da área e o módulo viscoso traduz quão rápido o valor da tensão interfacial é reestabelecido mediante uma deformação. Dessa forma, é possível perceber que em ambos os pH's há uma queda na tensão interfacial em relação à tensão entre a água e o óleo, e as interfaces apresentam um comportamento mais elástico do que viscoso ($\epsilon' > \epsilon''$), seguindo a mesma tendência da vista na reologia bulk das emulsões mais estáveis. Os desvios das medidas são relativamente grandes devido ao volume pequeno das gotas estudadas, que se fez necessário pela tensão interfacial ser pequena.

Nota-se que a tensão interfacial em pH ácido permanece menor do que em pH neutro, demonstrando maior estabilidade. Entretanto, em pH neutro as propriedades reológicas são maiores do que em pH ácido, de modo que as gotas formadas tendem a apresentar maior resistência a deformações. Esse comportamento deve se dar por mudanças de conformação das proteínas com alteração do pH e mesmo na reologia bulk foram observados maiores viscosidades das emulsões em pH neutro.

Os valores encontrados para a elasticidade interfacial são menores que os apresentados por Amine *et al.*, 2014, para proteínas de ervilha (0,01% em pH 7) em óleo MCT (triglicérido de cadeia média, ou *medium chain triglyceride* em inglês), com $\epsilon^* \sim 11 \text{mN/m}$, $\epsilon' \sim 10 \text{mN/m}$, $\epsilon'' \sim 4 \text{mN/m}$, indicando que também é possível obter filmes estáveis com essa proteína com outros tipos de óleos. (AMINE et al., 2014)

4.6 Aditivos

A introdução de aditivos na formulação pode causar alterações na estabilidade das emulsões. Por conta disso, foram escolhidas as três amostras mais estáveis do planejamento (amostras 4, 6 e 8), para verificar como a introdução de três aditivos muito utilizados na formulação de emulsões em alimentos – ácido cítrico (1,6%), benzoato de sódio (0,4%) e sorbato de potássio (0,4%) – afetam suas estabilidades. As emulsões preparadas com esses aditivos podem ser observadas na *Figura 4.26*.

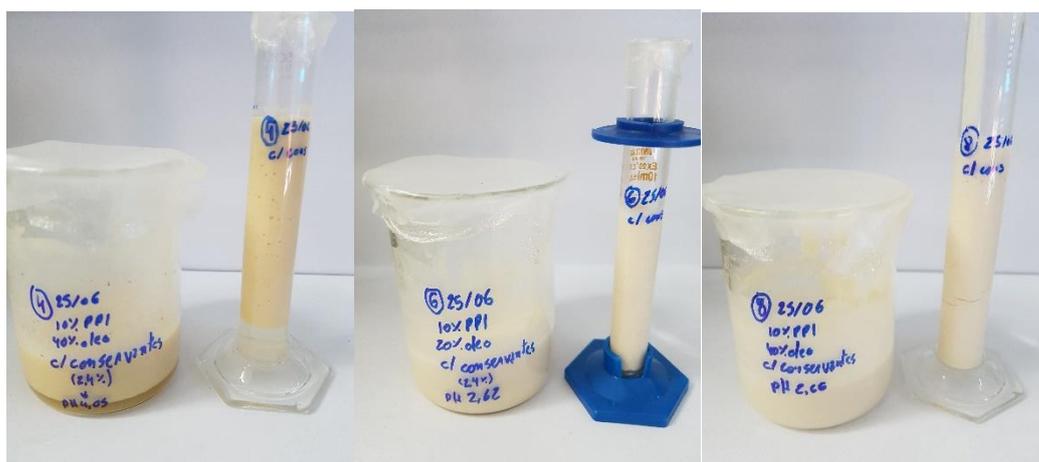


Figura 4.26 – Emulsões com aditivos após 15 dias: amostras 4, 6 e 8 (da esquerda para a direita)

Mediu-se também o potencial zeta dessas emulsões para ajudar a observar possíveis alterações. Os resultados para as estabilidades após 15 dias, assim como o potencial zeta das emulsões formadas, estão presentes na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 – Estabilidade e potencial zeta de emulsões com aditivos

Amostra	Variáveis			Estabilidade	Potencial Zeta (mV)	
	%PPI	%Óleo	pH		Média	Desvio
4	10	40	4,08	84,3%	2,07	0,99
6	10	20	2,62	96,1%	56,17	3,90
8	10	40	2,66	100%	60,71	2,17

Dessa forma pode-se perceber um queda considerável na estabilidade da amostra 4 e uma pequena queda na estabilidade da amostra 6.

Originalmente, a amostra 4 foi formulada com água Milli-Q, apresentando pH neutro, mas devido à adição de ácido cítrico, a nova emulsão apresentou pH 4,08, próximo ao pI do PPI, como pode ser evidenciado pela queda brusca no módulo do seu potencial zeta, de 49,73 (carregado negativamente) para 2,07 (carregado positivamente). Essa queda representa uma grande perda na capacidade de repulsão eletrostática entre as gotas, justificando a redução da estabilidade da amostra. Esse potencial zeta próximo de zero em pH 4,08, indica que possivelmente o ponto isoelétrico

dessa amostra de PPI deve estar localizado entre pH de 4,10 e 4,20, um pouco abaixo do encontrado na literatura (4,3).

A amostra 6, por sua vez, não apenas não mostrou indícios de perda de repulsão eletrostática, como apresentou um aumento no seu potencial zeta. Dessa forma, pode-se dizer que essa pequena variação na estabilidade se deu somente por variabilidade experimental, uma vez que essa diferença é próxima do erro relativo do planejamento experimental para a estabilidade.

A amostra 8 permaneceu com estabilidade máxima após a introdução dos aditivos, mesmo apresentando leve queda no seu potencial zeta, se mostrando, portanto, a amostra com estabilidade mais robusta.

4.7 Encapsulamento de α -tocoferol

4.7.1 Estabilidade

A composição escolhida para se estudar a capacidade de encapsulamento da vitamina E foi a da amostra 8, que se mostrou totalmente estável tanto na ausência quanto na presença de aditivos.

À composição da emulsão 8, foi adicionada a quantidade de 0,5% $m_{vitE}/m_{\text{óleo}}$, na fase oleosa. Foram medidos o índice de estabilidade após 15 dias e o potencial zeta das emulsões produzidas. Os resultados estão presentes na *Tabela 4.20*:

Tabela 4.20 – Estabilidade das emulsões com α -tocoferol

Composição				Estabilidade	Potencial Zeta (mV)
%PPI	%Óleo	%Vit E	pH		
10	39,8	0,2	2,50	100%	58,61 ± 1,68

Esse resultado demonstra que a adição do composto ativo não ocasionou qualquer instabilidade no sistema, apesar de uma pequena diminuição no potencial zeta das emulsões. Uma possibilidade para essa redução é que as moléculas do nutriente interagem com as proteínas presentes na superfície da gota, alterando levemente sua conformação e reduzindo a carga efetiva exposta para a fase aquosa.

4.7.1 Quantidade encapsulada

Para avaliar a quantidade devidamente encapsulada, primeiramente foi feita uma curva de calibração para concentração de vitamina E pela absorção de UV com comprimento de onda de 296nm, apresentada no Anexo F.

Dessa forma, a média e desvio das quantidades encapsuladas nas emulsões são apresentadas na *Tabela 4.21*:

Tabela 4.21 – Quantidade encapsulada de α -tocoferol

α-tocoferol	
Média	Desvio
97,90%	1,21%

Sendo assim, pode-se notar que foi possível realizar o encapsulamento de praticamente todo o nutriente adicionado nas emulsões. Portanto, é possível afirmar que a barreira mecânica conferida pela presença do PPI nas gotas da emulsão foi capaz de reter o nutriente na fase óleo, pois mesmo após 15 dias não houve variação relevante na quantidade encapsulada.

4.8 Considerações Finais

Com as análises da nanocelulose, foi possível constatar que a utilização desse tipo de material proveniente de rejeitos industriais pode acarretar em dificuldades na tentativa de prever seu comportamento e, por não se ter informações precisas da sua

procedência, é difícil afirmar exatamente a origem de determinados empecilhos à sua utilização. Para o caso específico da amostra utilizada, pode-se afirmar que ela não é adequada para a utilização como estabilizante de emulsões.

Com a análise da isoterma de compressão do isolado proteico de ervilha, pode-se averiguar que este forma um filme denso e elástico na superfície, que consegue acompanhar as deformações da gota e reduz a tensão superficial. Pelas análises das propriedades interfaciais (tensão e reologia), foi possível confirmar a formação desse filme tensoativo, com características mais elásticas do que viscosas, dando indícios que este composto seria um bom estabilizante para emulsões, devido ao impedimento estérico.

Estes indícios foram confirmados, uma vez que foram obtidas amostras estabilizadas com sucesso utilizando este agente emulsificante. Mesmo com a diferença de densidades entre a fase aquosa e a fase oleosa, alcançou-se a estabilidade dessas amostras sem a necessidade da utilização de agentes de peso.

As respostas obtidas pela realização do planejamento de experimentos revelam uma correlação relativamente alta da estabilidade das emulsões com o módulo do potencial zeta. Assim sendo, através de análises dessa propriedade, que são relativamente rápidas, é possível tentar prever a estabilidade de uma nova formulação que utilize os componentes das emulsões estudadas.

A análise da tensão superficial mostrou que tensões superficiais mais elevadas indicaram a formação de emulsões mais estáveis e estão diretamente associadas à intensificação das propriedades reológicas das emulsões. Nas emulsões mais instáveis, a tensão superficial se aproximava daquela da fase oleosa, indicando a ocorrência de uma separação, mesmo que mínima.

O potencial zeta demonstrou que com o uso do PPI os efeitos eletrostáticos são determinantes para a estabilização dessas emulsões. Como esperado, foi possível notar que as emulsões com maiores módulos de potencial zeta foram as que permaneceram mais estáveis, e que nas amostras mais próximas ao ponto isoelétrico da proteína (menores módulos de potencial zeta) ocorreram as maiores instabilidades.

Quanto ao tamanho de gotas das emulsões, foi observado que maiores quantidades de proteína e em pH neutro é possível formar gotas menores e com distribuição mais estreita, desfavorecendo a ocorrência de coalescência e amadurecimento de Ostwald. Notou-se ainda a possibilidade de formação de emulsões múltiplas em determinadas condições.

O estudo das propriedades reológicas confirmou que as emulsões apresentam comportamento pseudoplástico. Além disso, essas propriedades indicaram a formação de uma rede viscoelástica de proteínas nas amostras com níveis elevados de PPI e óleo que auxilia na estabilização do sistema, de modo que o isolado proteico, além de ter se mostrado um bom emulsificante, pode também ser utilizado como agente gelificante em emulsões concentradas. Além disso, foi possível observar que os efeitos de reologia não são lineares, sendo necessário um novo planejamento para obtenção de um modelo que incorpore tais efeitos.

Ao se realizar estudos com sistemas modelo, deve-se sempre levar em consideração como a adição de outros componentes, como conservantes, pode afetar a estabilidade do sistema. Ao se testar a introdução de alguns aditivos nos sistemas modelo mais estáveis se verificou que embora um deles tenha apresentado uma desestabilização considerável, as demais se mostraram mais robustas e mantiveram uma alta estabilidade.

O encapsulamento de vitamina E na fase oleosa da emulsão foi feito com sucesso (>95%).

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

O maior entendimento dos fenômenos interfaciais de emulsões, a partir de estudos que possibilitem gerar correlações entre suas estabilidades, propriedades físico-químicas e formulações, é importantíssimo para garantir maior qualidade e segurança do produto final, assim como para se reduzir o caráter empírico que envolve essa área do conhecimento no ambiente industrial.

A amostra de nanocelulose utilizada se mostrou inviável para utilização na estabilização do sistema analisado. O isolado proteico de ervilha se mostrou uma opção viável de agente emulsificante, ao estabilizar completamente algumas amostras por mais de 2 meses.

Foi possível observar que o filme interfacial formada pelo PPI é denso e elástico, contribuindo para o aumento do impedimento estérico entre as gotas.

Foi observada grande importância do impedimento eletrostático para a estabilização das emulsões, inclusive pela obtenção da alta correlação entre o módulo do potencial zeta e o índice de estabilidade das amostras analisadas no planejamento experimental.

Quanto ao encapsulamento, o objetivo foi satisfatoriamente alcançado, uma vez que foram obtidas emulsões estáveis com alto grau de encapsulamento de vitamina E (>95%).

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Algumas sugestões para trabalhos futuros são: analisar os mecanismos de desestabilização presentes no sistema em análise de turbidez utilizando um Turbiscan; fazer análise periódicas da reologia para observar sua relação com mecanismos de

desestabilização; analisar se a medida da tensão superficial pelo método de gota pendente apresentaria alguma correlação com a estabilidade das emulsões; fazer um novo planejamento que incluía contribuições não lineares para análise de propriedades reológicas; utilizar a emulsão concentrada para formulação de produto refrigerante (emulsão diluída) e analisar estabilidade características sensoriais deste produto; e testar o encapsulamento de outros compostos ativos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA. **Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação - balanço do setor de alimentos e bebidas.** Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/tmp_2.aspx?id=319>. Acesso em: 24 jul. 2019.

ABIR. **Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcolólicas.** Disponível em: <<https://abir.org.br/>>. Acesso em: 24 jul. 2019.

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces.** 6th. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

ALMEIDA, T. C. A. **Avaliação da estabilidade de emulsões concentradas em bebidas.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

ALUKO, R. E.; MOFOLASAYO, O. A.; WATTS, B. M. Emulsifying and foaming properties of commercial yellow pea (*Pisum sativum* L.) seed flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9793–9800, 2009.

AMEH, S. J.; OBODOZIE-OFOEGBU, O. Essential oils as flavors in carbonated Cola and Citrus soft drinks. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.** [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 111–121.

AMINE, C. et al. Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. **Food hydrocolloids**, v. 39, p. 180–186, 2014.

ANDRADE, D. R. M. et al. Assessment of Nano Cellulose from Peach Palm Residue as Potential Food Additive: Part II: Preliminary Studies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5641–5650, 2015.

ARNEODO, C. et al. **Interfacial Tension Behavior of Citrus Oils Against Phases Formed by Complex Coacervation of Gelatin.** Flavor Encapsulation. **Anais...** Washington: ACS Symposium Series, 1988

BAJAJ, P. R.; TANG, J.; SABLANI, S. S. Pea Protein Isolates: Novel Wall Materials for Microencapsulating Flaxseed Oil. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 12, p. 2418–2428, 2015.

BARAC, M. et al. Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 12, p. 4973–4990, 2010.

BUFFO, R. .; REINECCIUS, G. .; OEHLERT, G. . Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 1, p. 53–66, 2001.

BUFFO, R. A.; REINECCIUS, G. A. Shelf-life and mechanisms of destabilization in dilute beverage emulsions. p. 7–12, 2001.

BUTT, H.-J.; GRAF, K.; KAPPL, M. **Physics and Chemistry of Interfaces Physics.** [s.l.] Wiley, 2003.

CAPRON, I.; ROJAS, O. J.; BORDES, R. Behavior of nanocelluloses at interfaces.

Current Opinion in Colloid and Interface Science, v. 29, p. 83–95, 2017.

CARRILLO, C. A.; NYPELÖ, T. E.; ROJAS, O. J. Cellulose nanofibrils for one-step stabilization of multiple emulsions (W/O/W) based on soybean oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 166–173, 2015.

CHAO, D.; ALUKO, R. E. Modification of the structural, emulsifying, and foaming properties of an isolated pea protein by thermal pretreatment. **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 357–366, 2018.

CHEN, M. et al. Study on the emulsifying stability and interfacial adsorption of pea proteins. **Food Hydrocolloids**, 2018a.

CHEN, X. et al. Coencapsulation of (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Quercetin in Particle-Stabilized W/O/W Emulsion Gels: Controlled Release and Bioaccessibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 14, p. 3691–3699, 2018b.

CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**. 2nd. ed. [s.l.] Addison-Wesley, 1978.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDPUCRS, 2007.

DICKINSON, E. Protein-stabilized emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 22, p. 59–74, 1994.

DIFTIS, N. G.; BILIADERIS, C. G.; KIOSSEOGLOU, V. D. Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate – dextran mixture. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 1025–1031, 2005.

DONSÌ, F. et al. Development of novel pea protein-based nanoemulsions for delivery of nutraceuticals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10653–10660, 2010.

DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Biological Activities and Safety of Citrus spp . Essential Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, n. Table 1, p. 1–25, 2018.

FÉLIX, M. et al. A Comprehensive Approach from Interfacial to Bulk Properties of Legume Protein-Stabilized Emulsions. **Fluids**, v. 4, n. 65, p. 1–11, 2019.

FLAVORS&BOTANICALS. **O panorama do mercado de alimentos no Brasil em 2018**. Disponível em: <<https://www.duasrodas.com/blog/tendencias/o-panorama-do-mercado-de-alimentos-no-brasil-em-2018/>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

FRANCO, J. M. et al. Influence of pH and Protein Thermal Treatment on the Rheology of Pea Protein-Stabilized Oil-in-Water Emulsions. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 9, p. 975–984, 2000.

FUJISAWA, S.; TOGAWA, E.; KURODA, K. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions and their applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 18, n. 1, p. 959–971, 2017.

FUSTIER, P. et al. Protein-Protein Multilayer Oil-in-Water Emulsions for the Microencapsulation of Flaxseed Oil: Effect of Whey and Fish Gelatin Concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 42, p. 9239–9250, 2015.

GARREC, D. A. et al. Designing colloidal structures for micro and macro nutrient content and release in foods. **Faraday Discussions**, v. 158, p. 37–49, 2012.

GASPAR, R. B. **Avaliação da estabilidade de emulsões para bebidas**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

GASPAR, R. B.; NELE, M.; FERRAZ, H. C. Encapsulation of α -tocopherol and β -carotene in concentrated oil-in-water beverage emulsions stabilized with whey protein isolate. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 89–95, 2017.

GHARSALLAOUI, A. et al. Interfacial and emulsifying characteristics of acid-treated pea protein. **Food Biophysics**, v. 4, n. 4, p. 273–280, 2009.

GHARSALLAOUI, A. et al. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2211–2221, 2012.

GIRARD-EGROT, A. P.; GODOY, S.; BLUM, L. J. Enzyme association with lipidic Langmuir – Blodgett films : Interests and applications in nanobioscience. **Advances in Colloid and Interfaces Science**, v. 116, p. 205–225, 2005.

GÓMEZ H., C. et al. Vegetable nanocellulose in food science: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 178–186, 2016.

GONZALES, F. G. **Vitamina E**. Disponível em: <<http://www.medicinabiomolecular.com.br/biblioteca/pdfs/Nutrientes/nu-0142.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2019.

GRIGA, M.; HORÁČEK, J.; KLENOTICOVÁ, H. Protein patterns associated with *Pisum sativum* somatic embryogenesis. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. August, p. 201–211, 2007.

HANN, R. A. Molecular Structure and Monolayer Properties. In: ROBERTS, G. (Ed.). **Langmuir-Blodgett Films**. New York: Springer, 1990.

HAO, Z. et al. Rheological properties and gel characteristics of polysaccharides from fruit-bodies of *Sparassis crispa*. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 2283–2295, 2018.

HARTLAND, S. **Surface and Interfacial Tension: Measurement, Theory and Applications**. Zurich: Marcel Dekker, 2004.

IKA. **Ultra-Turrax T 25 digital**. Disponível em: <<https://www.ika.com/pt/Produtos-Lab-Eq/Dispersadores-csp-177/T-25-digital-ULTRA-TURRAX-cpdt-3725000/>>. Acesso em: 28 jul. 2019.

JI, J. et al. Preparation and stabilization of emulsions stabilized by mixed sodium caseinate and soy protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 156–165, 2015.

JIN, T. C.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Z. **Crystal Structure of the Korean pine (*Pinus koraiensis*) vicilin**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/structure/4LEJ>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Gluten Hydrolysates. 2014.

KALASHNIKOVA, I. et al. New pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. **Langmuir**, v. 27, n. 12, p. 7471–7479, 2011.

KALASHNIKOVA, I. et al. Modulation of Cellulose Nanocrystals Amphiphilic Properties to Stabilize Oil / Water Interface. **Biomacromolecules**, n. 13, p. 267–275, 2012.

KALASHNIKOVA, I. et al. Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. **Soft Matter**, v. 9, n. 3, p. 952–959, 2013.

KARACA, A. C.; LOW, N.; NICKERSON, M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2742–2750, 2011.

KARGAR, M. et al. Investigation into the potential ability of Pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 366, n. 1, p. 209–215, 2012.

KHARAT, M.; ZHANG, G.; MCCLEMENTS, D. J. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: Impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. **Food Research International**, v. 111, n. March, p. 178–186, 2018.

KOOCHEKI, A. et al. Influence of Alyssum homolocarpum seed gum on the stability and flow properties of O/W emulsion prepared by high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2416–2424, 2009.

LAM, A. C. Y. et al. Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. **Food Reviews International**, v. 34, n. 2, p. 126–147, 2016.

LAM, A. C. Y. et al. Physicochemical and functional properties of protein isolates obtained from several pea cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 89–97, 2017.

LANGVIN, D. Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. **Advances in Colloid and Interfaces Science**, v. 88, p. 209–222, 2000.

LANI, N. S. et al. Isolation , Characterization , and Application of Nanocellulose from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber as Nanocomposites. **Journal of Nanomaterials**, v. 2014, p. 9, 2014.

LAW, K.-Y.; ZHAO, H. **Surface Wetting: Characterization, Contact Angle and Fundamentals**. [s.l.] Springer, 2016.

LIANG, Y. et al. Effects of globular protein type and concentration on the physical properties and flow behaviors of oil-in-water emulsions stabilized by micellar casein-globular protein mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 89–98, 2016.

MA, H. et al. Fabrication and characterization of cellulose nanofiber based thin-film nanofibrous composite membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 454, p. 272–282, 2014.

MALVERN, I. W. **A Basic Introduction to Rheology** WorcestershireMalvern Instruments Limited, , 2016.

MARTÍNEZ, I.; RISCARDO, M. A.; FRANCO, J. M. Effect of salt content on the rheological properties of salad dressing-type emulsions stabilized by emulsifier blends. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1272–1281, 2007.

MATSUMIYA, K. et al. Food Hydrocolloids Evaluation of long-term stability of milk beverages by a novel method for rapid determination of aggregation forces between colloidal particles. **Food hydrocolloids**, v. 34, p. 177–183, 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Protein-stabilized emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 305–313, 2004.

MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,

v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques**. 3rd. ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2016.

MENDES, A. N. et al. Evaluation of surfactant activity and emulsifying of Pea protein isolate (*Pisum sativum* L .) obtained by the spray dryer. 2018.

MIRHOSSEINI, H. et al. Modeling the Relationship between the Main Emulsion Components and Stability, Viscosity, Fluid Behavior,-Potential, and Electrophoretic Mobility of Orange Beverage Emulsion Using Response Surface Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 7659–7666, 2007.

MIRHOSSEINI, H. et al. Modeling the physicochemical properties of orange beverage emulsion as function of main emulsion components using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 512–520, 2009.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; TAHERIAN, A. R. Effect of glycerol and vegetable oil on physicochemical properties of Arabic gum-based beverage emulsion. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 1, p. 19–28, 2008.

NASCIMENTO, R. F. DO et al. **Uso de bioadsorventes lignocelulósicos na remoção de poluentes de efluentes aquosos**. Fortaleza: [s.n.].

NICOLINI, J. V. **BIOSENSORES BASEADOS EM NANOTUBOS DE TITANATO E PEROXIDASE PARA DETECÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**. [s.l.] UFRJ, 2013.

NIU, F. et al. Characterization of structure and stability of emulsions stabilized with cellulose macro/nano particles. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, n. July, p. 314–319, 2018.

NOBUTA, K. et al. Characterization of cellulose nanofiber sheets from different refining processes. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 403–414, 2016.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes : aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais Dietary reference intakes : application of tables in nutritional studies. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 741–760, 2006.

PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett films: An-introduction**. Durham: Cambridge University Press, 1996.

PIERUCCI, A. P. T. R. et al. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 6, p. 654–662, 2006.

PIERUCCI, A. P. T. R. et al. Comparison of a -tocopherol microparticles produced with different wall materials : pea protein a new interesting alternative. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. May, p. 201–213, 2007.

PITKÄNEN, M. et al. Nanofibrillar cellulose e in vitro study of cytotoxic and genotoxic properties. **TAPPI - International conference on nanotechnology for the forest products industry**, 2010.

PRATHAPAN, R. et al. Modulating the zeta potential of cellulose nanocrystals using salts and surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 509, p. 11–18, 2016.

RAIKOS, V.; DUTHIE, G.; RANAWANA, V. Comparing the efficiency of different

food-grade emulsifiers to form and stabilise orange oil-in-water beverage emulsions: influence of emulsifier concentration and storage time. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 348–358, 2017.

REINER, S. J.; REINECCIUS, G. A.; PEPPARD, T. L. A comparison of the stability of beverage cloud emulsions formulated with different gum acacia- and starch-based emulsifiers. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, 2010.

REZVANI, E.; SCHLEINING, G.; TAHERIAN, A. R. Assessment of physical and mechanical properties of orange oil-in-water beverage emulsions using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 82–88, 2012.

RISCARDO, M. A.; FRANCO, J. M.; GALLEGOS, C. Influence of Composition of Emulsifier Blends on the Rheological Properties of Salad Dressing-type Emulsions. **Food Sci Tech Int**, v. 9, p. 53–63, 2003.

RIZVI, S. et al. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. **Sultan Qaboos University Med Journal**, v. 14, n. May, p. 157–165, 2014.

SALAS, C. et al. Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 383–396, 2014.

SANTOS, J. et al. Relationship of rheological and microstructural properties with physical stability of potato protein-based emulsions stabilized by guar gum. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 109–114, 2015.

SCHRAMM, G. **A Practical Approach to Rheology and Rheometry**. 2nd. ed. Karlsruhe: Gebrueder HAAKE GmbH, 2000.

SHARIF, H. R. et al. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 2–16, 2018.

SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 4th. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6th. ed. [s.l.] Thomson Brooks/Cole, 2007. v. 152

SOLEIMANPOUR, M.; KOOCHIKI, A.; KADKHODAEI, R. 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. **FRIN**, v. 50, n. 1, p. 457–466, 2013.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2nd. ed. East Lansing: Freeman Press, 1996.

STRÖM, G.; ÖHGREN, C.; ANKERFORS, M. Nanocellulose as an additive in foodstuff. **Inventia**, n. June, p. 1–28, 2013.

SZTERK, A.; ROSZKO, M.; GÓRNICKA, E. Chemical stability of the lipid phase in concentrated beverage emulsions colored with natural β -carotene. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 4, p. 483–491, 2013.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interfaces Science**, v. 109, p. 227–258, 2004.

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

TAHERIAN, A. R. et al. Rheology and stability of beverage emulsions in the presence and absence of weighting agents: A review. **Food Biophysics**, v. 3, n. 3, p. 279–286, 2008.

TAHERIAN, A. R.; FUSTIER, P.; RAMASWAMY, H. S. Effect of added oil and modified starch on rheological properties, droplet size distribution, opacity and stability of beverage cloud emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 687–696, 2006.

TAHERIAN, A. R.; FUSTIER, P.; RAMASWAMY, H. S. Effects of added weighting agent and xanthan gum on stability and rheological properties of beverage cloud emulsions formulated using modified starch. **Journal of Food Process Engineering**, v. 30, n. 2, p. 204–224, 2007.

TANDANG-SILVAS, M. R. G. et al. **Crystal structure of pea prolegumin, an 11S seed globulin from *Pisum sativum* L.** Disponível em: <<http://www.rcsb.org/structure/3KSC>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

TARDY, B. L. et al. Nanocellulose–surfactant interactions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 29, p. 57–67, 2017.

TESCH, S.; GERHARDS, C.; SCHUBERT, H. Stabilization of emulsions by OSA starches. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 167–174, 2002.

THEIVASANTHI, T. et al. Synthesis and characterization of cotton fiber-based nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 832–836, 2018.

TURBAK, A. F.; SNYDER, F. .; SANDBERG, K. R. **US 4.341.807 Washington, DC: US: Patent and Trademark Office**, 1982.

VARTIAINEN, J. et al. Health and environmental safety aspects of friction grinding and spray drying of microfibrillated cellulose. **Cellulose**, v. 18, n. 3, p. 775–786, 2011.

WEIGEL, F. et al. Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability. **Food Chemistry**, v. 242, n. July 2017, p. 395–403, 2018.

WEISS, J.; HERRMANN, N.; MCCLEMENTS, D. J. Ostwald ripening of hydrocarbon emulsion droplets in surfactant solutions. **Langmuir**, v. 15, n. 20, p. 6652–6657, 1999.

WINUPRASITH, T.; SUPHANTHARIKA, M. Microfibrillated cellulose from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind: Preparation, characterization, and evaluation as an emulsion stabilizer. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 383–394, 2013.

WINUPRASITH, T.; SUPHANTHARIKA, M. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by microfibrillated cellulose from mangosteen rind. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 690–699, 2015.

WULANDARI, W. T.; ROCHLIADI, A.; ARCANA, I. M. **Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse**. 10th Joint

Conference on Chemistry. **Anais...**2016

YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Food Hydrocolloids Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. **Food hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 712–720, 2013.

YERRAMILI, M.; LONGMORE, N.; GHOSH, S. Improved stabilization of nanoemulsions by partial replacement of sodium caseinate with pea protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 99–111, 2017.

ZAPATA, A. M. O.; RODRÍGUEZ-BARONA, S.; GÓMEZ, G. I. G. Rheological characterization and stability study of an emulsion made with a dairy by-product enriched with omega-3 fatty acids Caracterização reológica e estudo da estabilidade de uma emulsão preparada com subproduto de indústria de laticínios enriquecido. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 23–30, 2015.

ZHAO, S. et al. The stability of three different citrus oil-in-water emulsions fabricated by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 269, p. 577–587, 2018.

ANEXO A – Técnicas de Caracterização

Difração de raios-X (DRX)

O DRX é uma ferramenta que fornece informações sobre espécies cristalinas presentes em um material, sendo muito importante para a determinação de sua microestrutura. Também pode ser utilizado em estudos de análise química, medidas de tamanho de partícula e estresse ou determinação da orientação de um cristal ou um conjunto de cristais. (CULLITY, 1978)

Assim como em outras formas de radiação eletromagnética, quando um feixe de raio-X passa pela superfície cristalina de uma amostra de material em um certo ângulo θ , o vetor elétrico da radiação interage com os elétrons nos átomos desse material, ocorrendo o espalhamento, ou difração de parte desse feixe de radiação. A parte que não espalhou penetra na segunda camada de átomos, onde novamente tem uma fração difratada e o restante passa para a terceira camada, como pode-se observar na *Figura A.1*. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007)

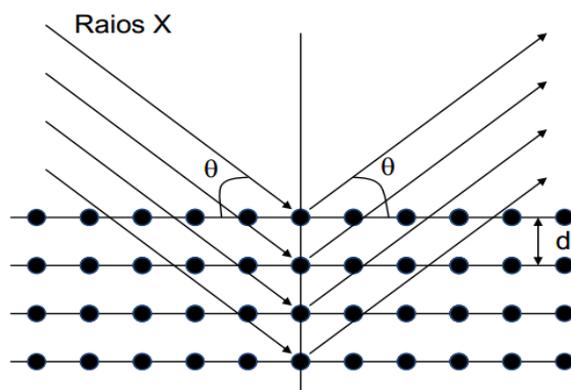


Figura A.1 - Difração de raios-X por um cristal (NICOLINI, 2013)

Em um material onde os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço e o espaçamento entre camadas é aproximadamente da mesma ordem do comprimento de onda da radiação, característico de estruturas cristalinas, o fenômeno de difração de

raios-X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg, conforme a Eq. 26: (CULLITY, 1978; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007)

$$n \lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad \text{Eq. 26}$$

Em que h, k, l são os índices de Miller do plano cristalográfico (hkl) considerado, d_{hkl} é a distância entre dois planos adjacentes, θ é o ângulo entre o feixe incidente e o plano considerado, λ é o comprimento de onda característico da radiação incidente e n define a ordem de reflexão.

Dessa forma, pode-se observar por esta equação que as direções para as quais ocorre a difração são determinadas pela geometria da estrutura cristalina. (CULLITY, 1978)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O MEV é uma técnica para caracterização de amostras sólidas, que possibilita uma rápida análise da morfologia e de características microestruturais destas. Uma de suas características é a grande profundidade de campo, resultando em imagens tridimensionais das amostras. (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007)

Diferente dos microscópios ópticos convencionais, o MEV utiliza um feixe de elétrons, em vez de fótons, permitindo que se obtenha uma resolução muito maior, na ordem de nanômetros. Isso ocorre devido à relação entre o comprimento de onda de um elétron e sua energia, de modo que pode-se obter um comprimento de onda extremamente curto quando submetido a uma diferença de potencial grande o suficiente. Dessa forma, pode-se controlar a profundidade das imagens da amostra pela variação da tensão elétrica empregada. (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007)

A imagem da amostra é obtida pelo escaneamento da superfície por um feixe fino de elétrons, em uma série de linhas paralelas. Esses feixes interagem com a amostra produzindo diversos sinais (por exemplo, a reflexão de uma parcela dos feixes) que

podem ser detectados e então fotografados. (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; SHAW, 1992)

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Ao serem submetidas a uma fonte de radiação na região do infravermelho em uma certa faixa ($100-10,000\text{ cm}^{-1}$), moléculas orgânicas absorvem essa energia, convertendo-a em energia de vibração molecular. A espectroscopia na região do infravermelho se baseia na quantificação da frequência vibracional das moléculas presentes na amostra, levando em conta que diferentes ligações químicas apresentam frequências específicas, uma vez que cada uma absorve em um comprimento de onda diferente. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)

As mudanças nos níveis de energia rotacional correspondem à mudança do nível de energia vibracional, de modo que se obtêm um espectro na forma de bandas. Essas bandas são características de cada ligação química, persistindo com pouca variação em diversas moléculas diferentes. Isso permite que se obtenha informações estruturais de moléculas desconhecidas pela comparação com as diversas coleções de espectros de frequências características de grupos funcionais na literatura. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)

Microscopia Óptica e DLS

Como já comentado, pode-se utilizar diversas técnicas para medição do tamanho de partículas, em especial a microscopia óptica e o espalhamento dinâmico de luz (DLS).

A microscopia óptica consiste na utilização de lentes de aumento e incidência de luz para que se consiga visualizar e então fotografar a microestrutura da emulsão. Com essa imagem pode-se medir o diâmetro das gotas desse espaço amostral e se obter o diâmetro médio e a distribuição. No entanto, por ser restrita pelo comprimento de onda da luz utilizada, essa técnica não consegue mensurar confiavelmente o tamanho de

gotas nanométricas, nesse caso sendo necessária a utilização de outras técnicas. (MCCLEMENTS, 2016)

As técnicas de espalhamento dinâmica de luz (DLS) utilizam a equação de Stokes-Einstein (Eq. 17) para calcular o tamanho das gotas a partir de medidas do coeficiente de difusão translacional das gotas, podendo analisar partículas com diâmetros entre 3nm e 3 μ m. (MCCLEMENTS, 2016)

Essas técnicas se baseiam nas flutuações de intensidade da dispersão da luz pelas partículas, que mudam de posição por conta do movimento Browniano. A velocidade com que as partículas se movem dependem do seu tamanho, sendo que quanto menor a partícula, mais rápidas as flutuações. Os equipamentos contêm um *software* com um modelo matemático que os possibilitam a determinação da distribuição de tamanhos de gotas a partir da comparação do espalhamento medido contra aquele previsto pelo modelo, de acordo com as características das partículas presentes. (MCCLEMENTS, 2007)

ANEXO B – Imagens das Emulsões

Emulsões após 15 dias

Nas Figuras B.1 a B.3, pode-se observar todas as amostras de emulsões de 1 a 11 após 15 dias de repouso.



Figura B.1 – Imagens de emulsões após 15 dias: amostras em pH neutro 1 a 4 (de cima para baixo, da esquerda para a direita)

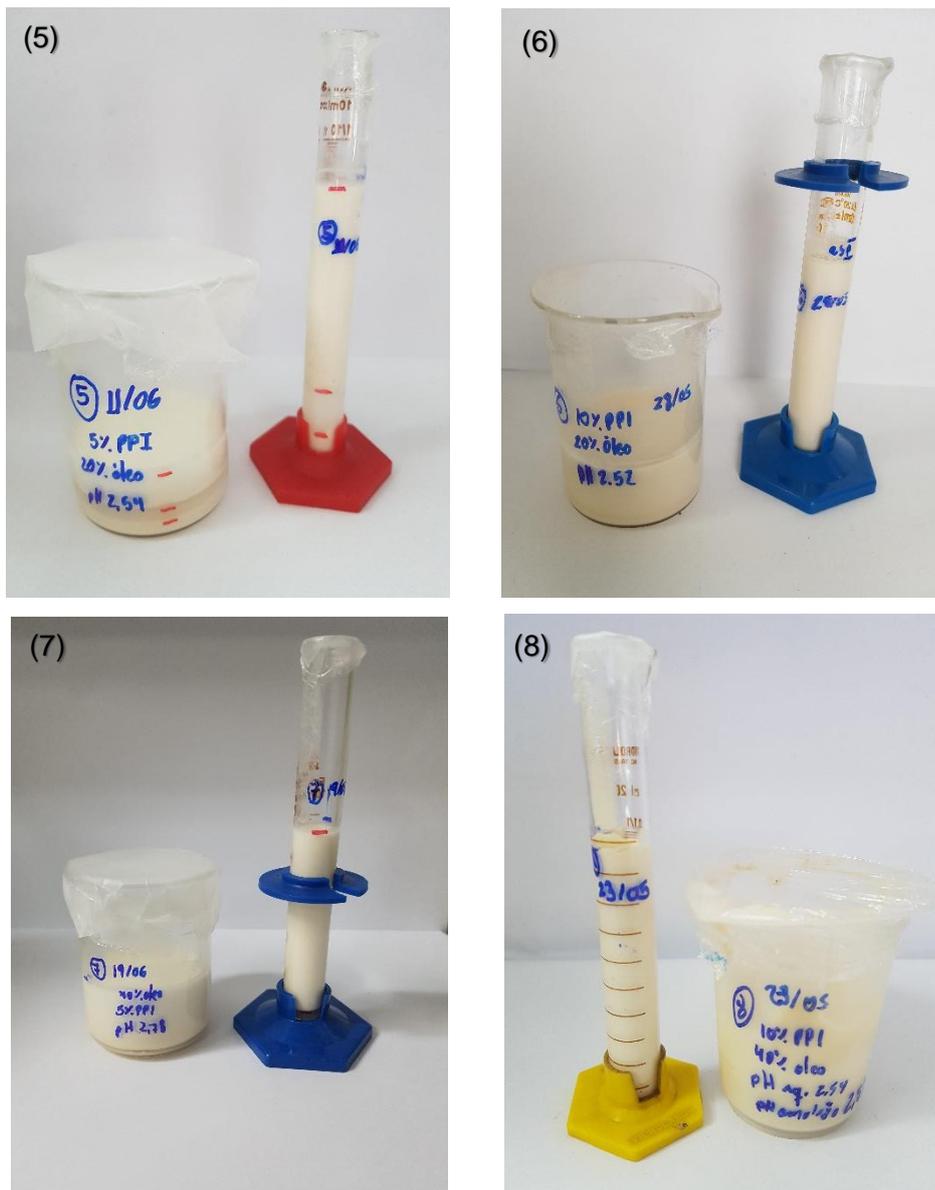


Figura B.2 – Imagens de emulsões após 15 dias: amostras em pH ácido 5 a 8 (de cima para baixo, da esquerda para a direita)

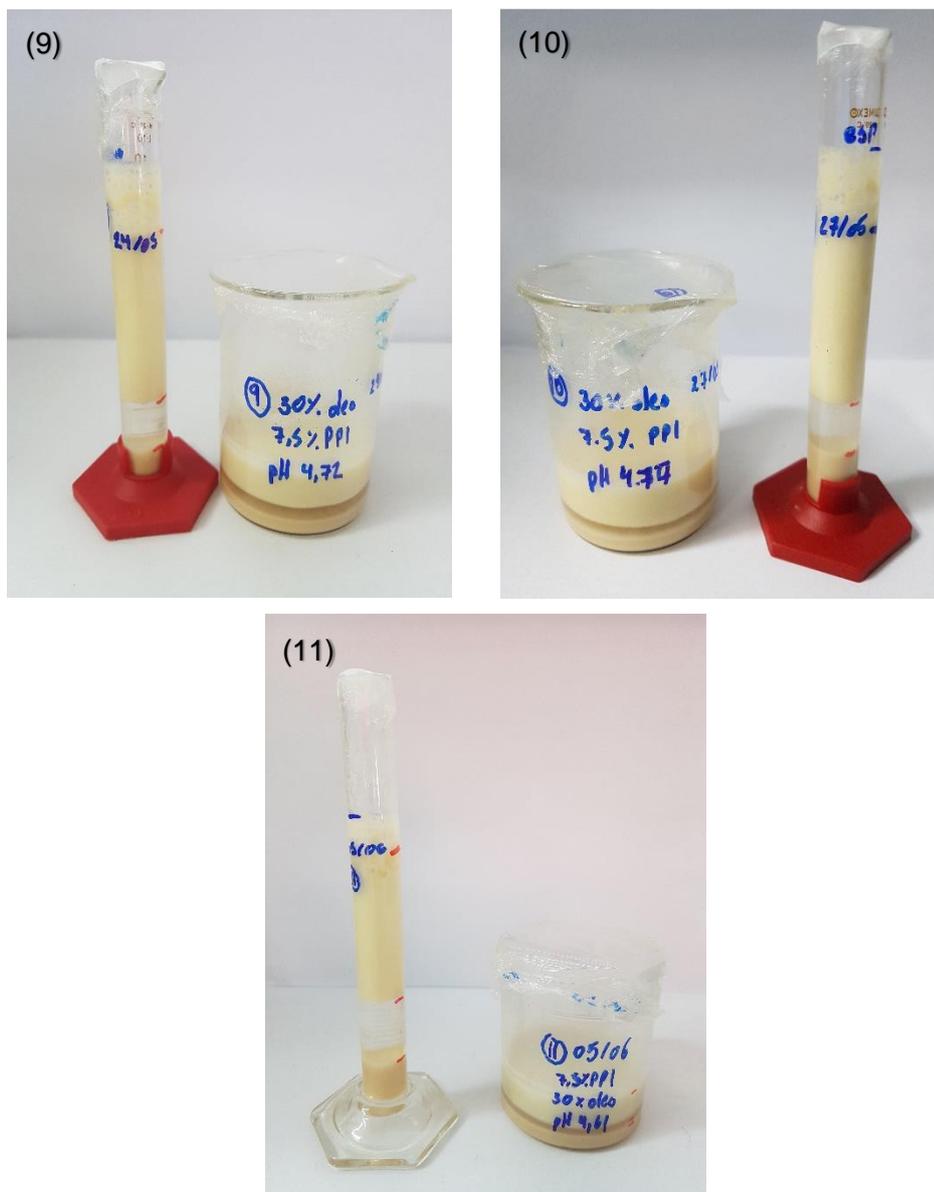


Figura B.3 – Imagens de emulsões após 15 dias: amostras do ponto central 9 a 11 (de cima para baixo, da esquerda para a direita)

ANEXO C – Histogramas dos diâmetros de gotas das emulsões

Nas *Figura C.1 a Figura C.11*, pode-se observar os histogramas das distribuições de diâmetro de gotas das amostras de emulsões 1 a 11.

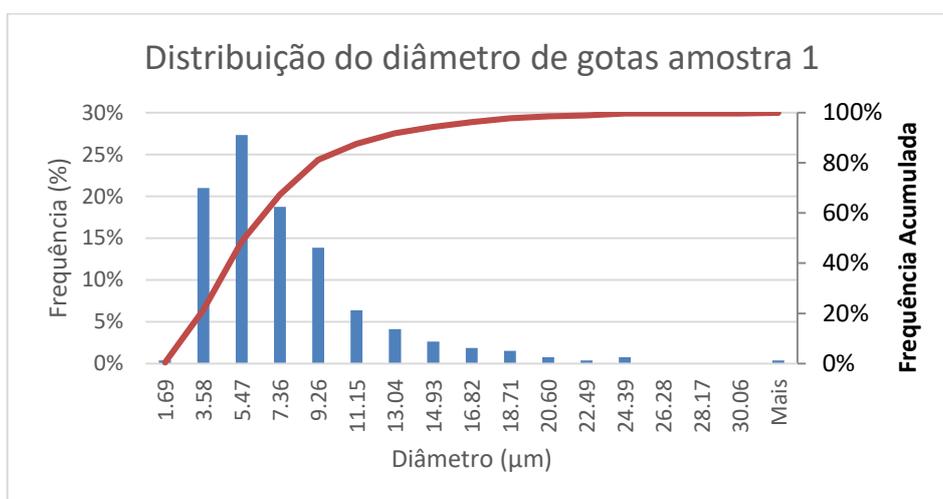


Figura C.1 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 1

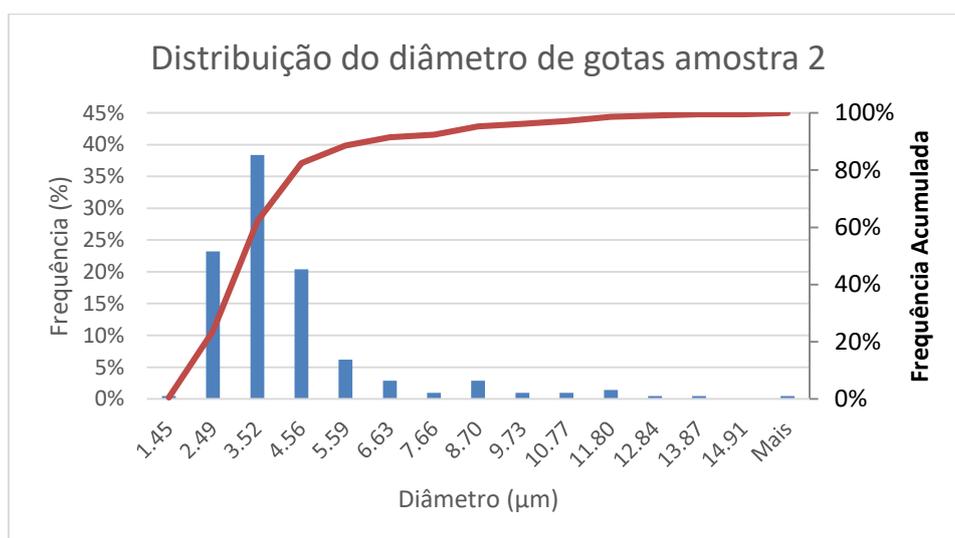


Figura C.2 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 2

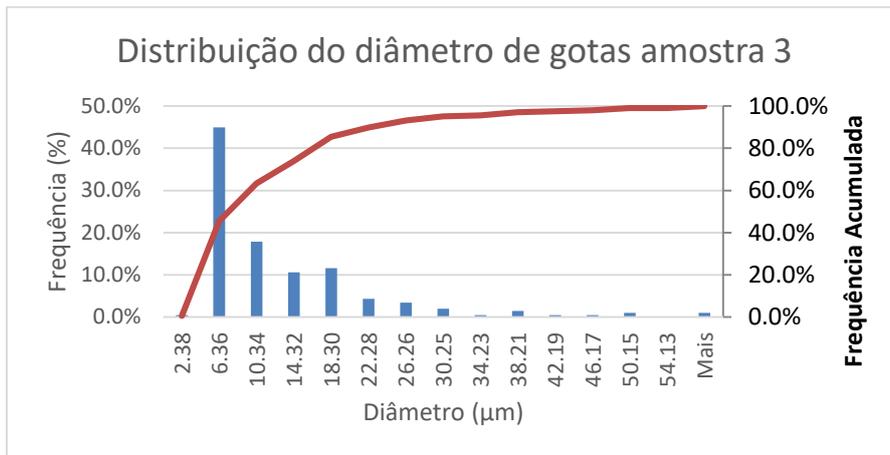


Figura C.3 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 3

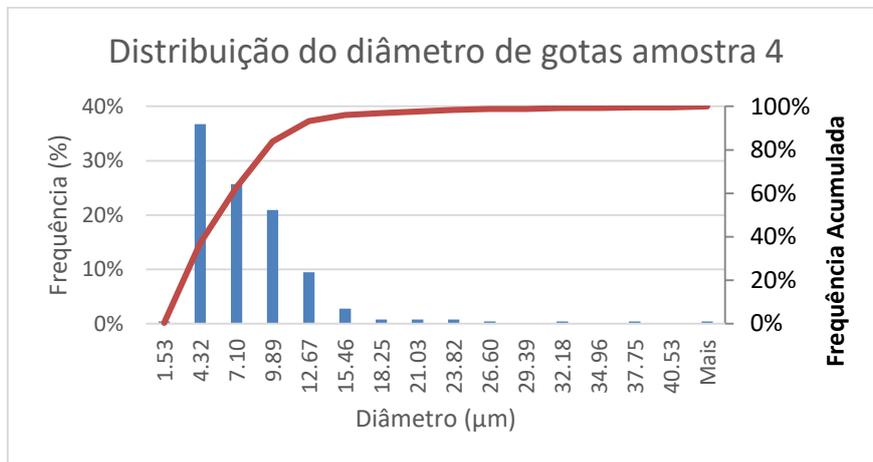


Figura C.4 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 4

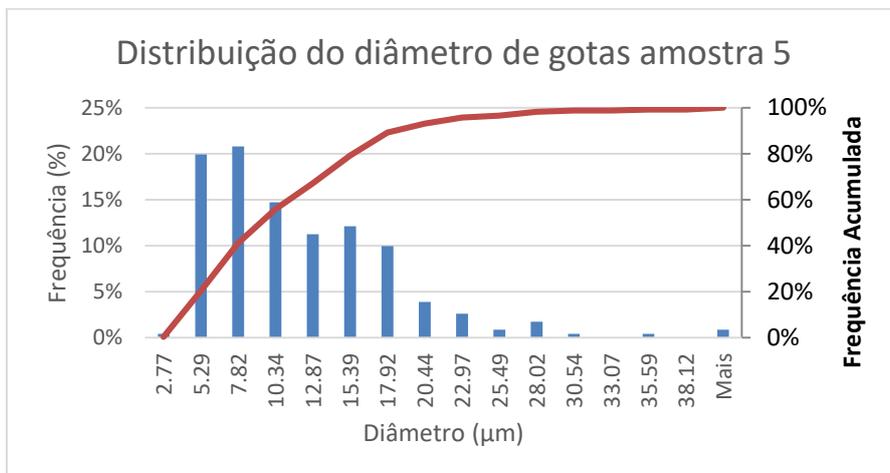


Figura C.5 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 5

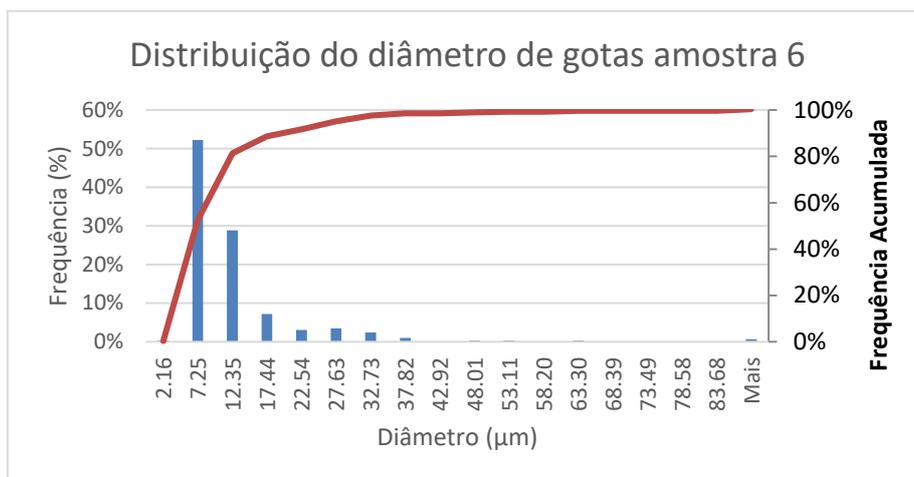


Figura C.6 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 6

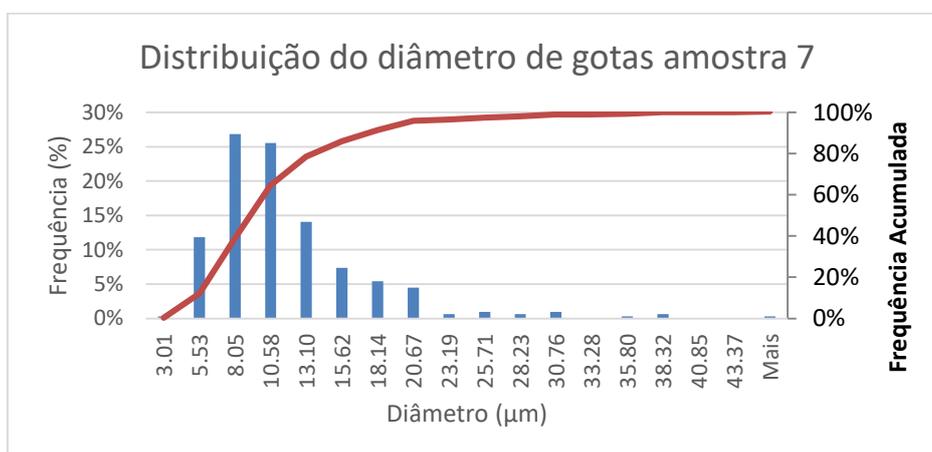


Figura C.7 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 7

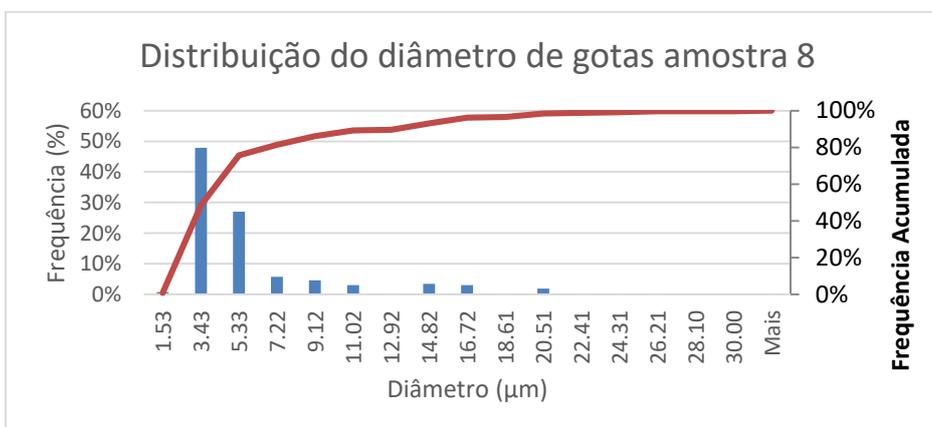


Figura C.8 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 8

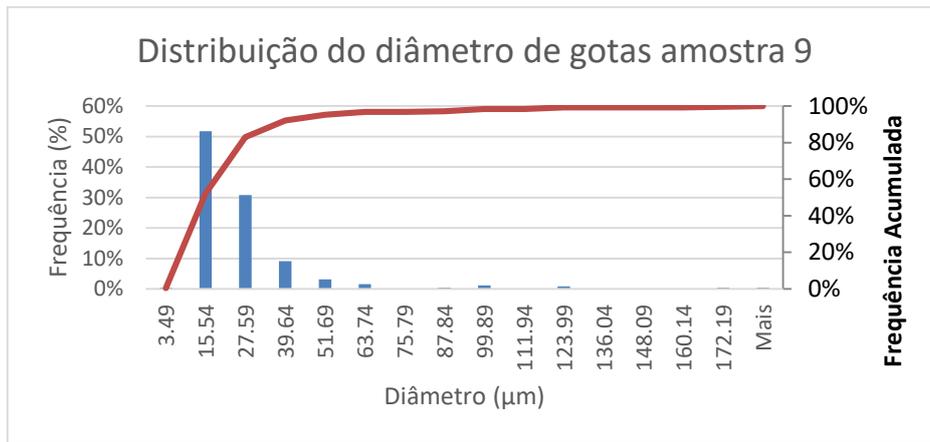


Figura C.9 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 9

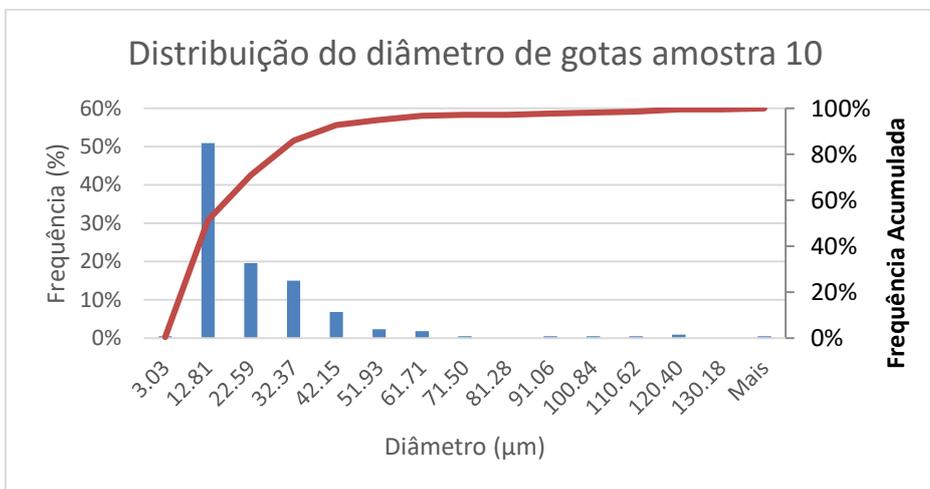


Figura C.10 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 10

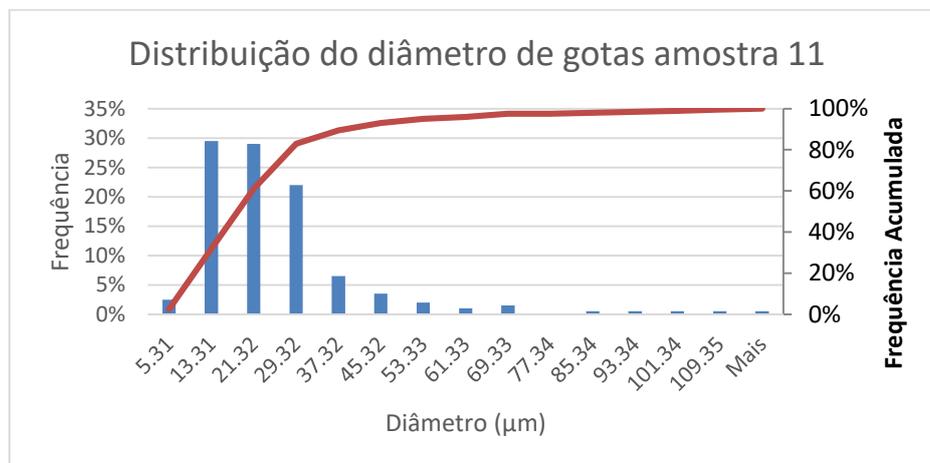


Figura C.11 – Distribuição de diâmetros de gotas da amostra 11

ANEXO D – Matriz Correlação

Na *Tabela D.1* pode-se ver a matriz correlação das variáveis do planejamento de experimentos:

Tabela D.1 – Matriz correlação das variáveis do planejamento de experimentos

	(1)	(2)	(3)	Estabilidade	Tensão Superficial	Potencial Zeta	Diâmetro médio de Gotas	Módulo Potencial Zeta	Tensão Mucilagem	Visc [0,1/s]	G' [1 rad/s]	G'' [1 rad/s]	Visc Mucilagem [1/s]
(1)% PPI	1.000	0.000	0.000	0.582	0.843	0.036	-0.233	0.057	0.667	0.477	0.494	0.518	0.415
(2)% Óleo	0.000	1.000	0.000	0.436	0.225	-0.018	0.042	0.317	-0.084	0.453	0.669	0.609	0.332
(3)pH	0.000	0.000	1.000	-0.192	0.092	-0.971	-0.150	-0.191	0.239	0.283	-0.049	0.079	0.315
Estabilidade	0.582	0.436	-0.192	1.000	0.800	0.259	-0.522	0.691	0.600	0.400	0.515	0.485	0.394
Tensão Superficial	0.843	0.225	0.092	0.800	1.000	0.009	-0.570	0.492	0.696	0.603	0.637	0.651	0.523
Potencial Zeta	0.036	-0.018	-0.971	0.259	0.009	1.000	-0.069	0.349	-0.194	-0.258	0.111	-0.028	-0.301
Diâmetro médio de Gotas	-0.233	0.042	-0.150	-0.522	-0.570	-0.069	1.000	-0.812	-0.422	-0.218	-0.258	-0.260	-0.242
Módulo Potencial Zeta	0.057	0.317	-0.191	0.691	0.492	0.349	-0.812	1.000	0.181	0.182	0.348	0.301	0.178
Tensão Mucilagem	0.667	-0.084	0.239	0.600	0.696	-0.194	-0.422	0.181	1.000	0.620	0.361	0.459	0.714
Visc [0,1/s]	0.477	0.453	0.283	0.400	0.603	-0.258	-0.218	0.182	0.620	1.000	0.847	0.931	0.960
G' [1 rad/s]	0.494	0.669	-0.049	0.515	0.637	0.111	-0.258	0.348	0.361	0.847	1.000	0.979	0.705
G'' [1 rad/s]	0.518	0.609	0.079	0.485	0.651	-0.028	-0.260	0.301	0.459	0.931	0.979	1.000	0.822
Visc Mucilagem [0,1/s]	0.415	0.332	0.315	0.394	0.523	-0.301	-0.242	0.178	0.714	0.960	0.705	0.822	1.000

ANEXO E – Gráficos dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular

As Figuras E.1 a E.11 apresentam os gráficos dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular dos testes oscilatórios da reologia.

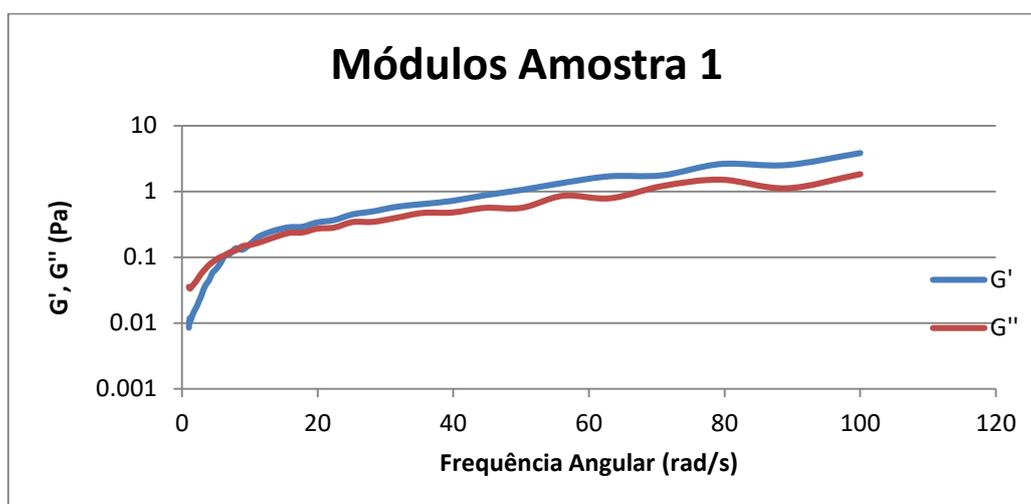


Figura E.1 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 1

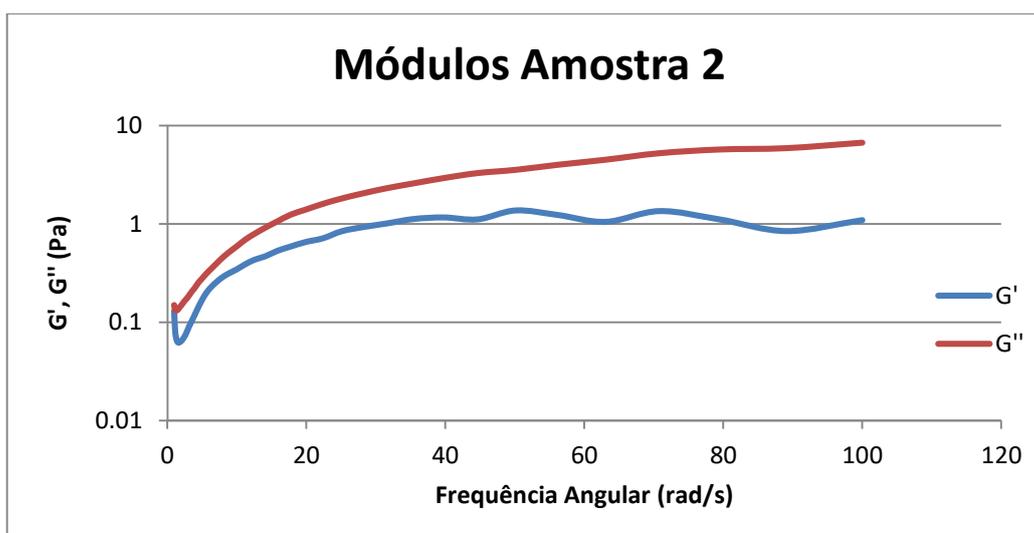


Figura E.2 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 2

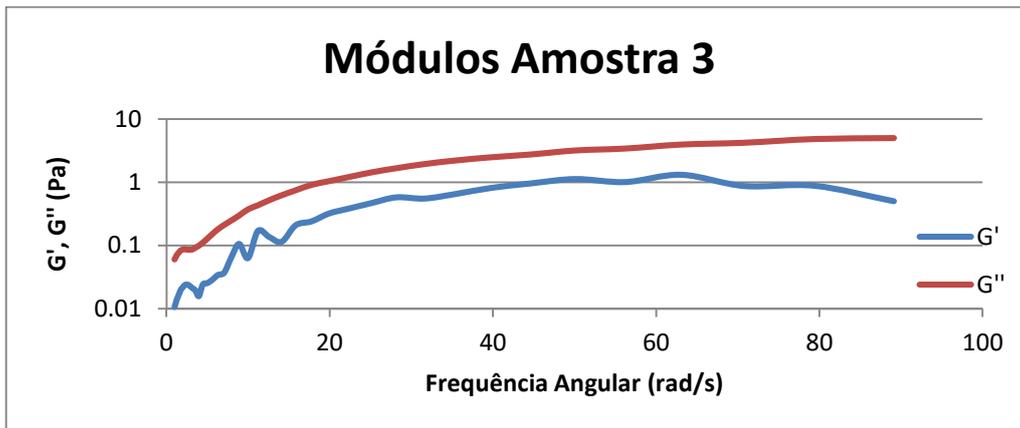


Figura E.3 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 3

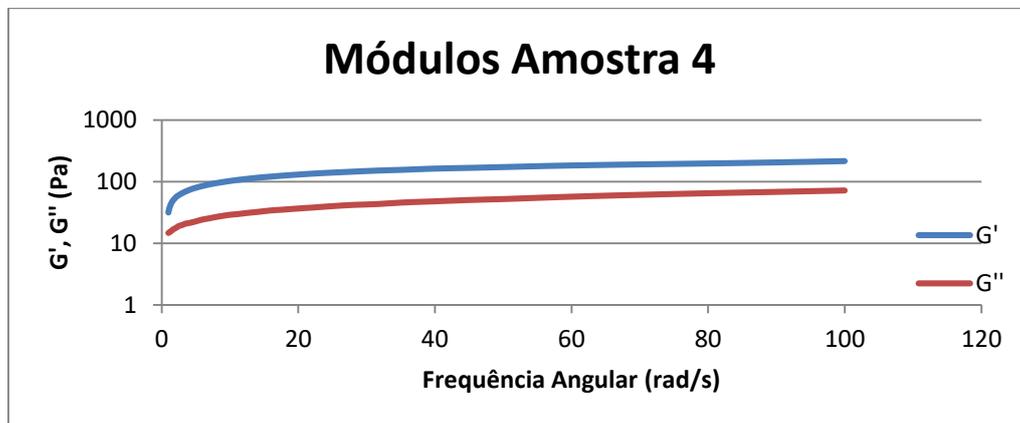


Figura E.4 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 4

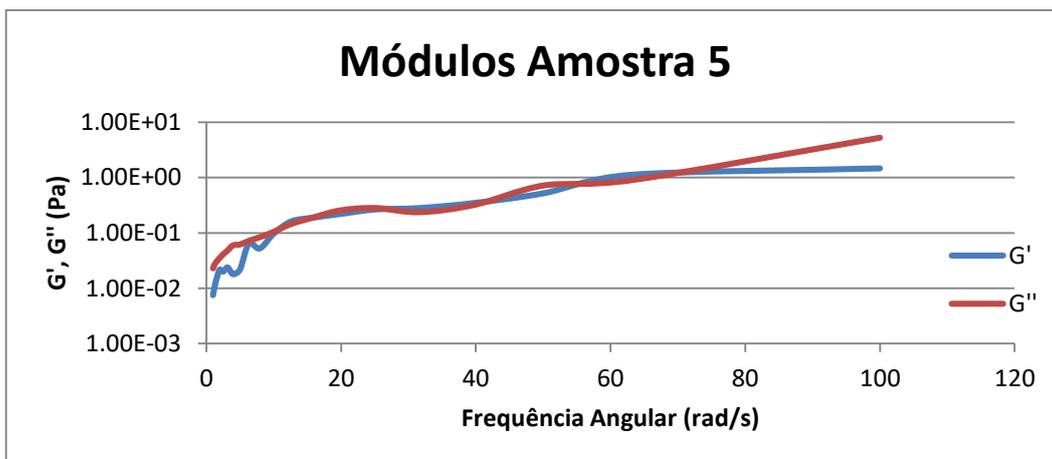


Figura E.5 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 5

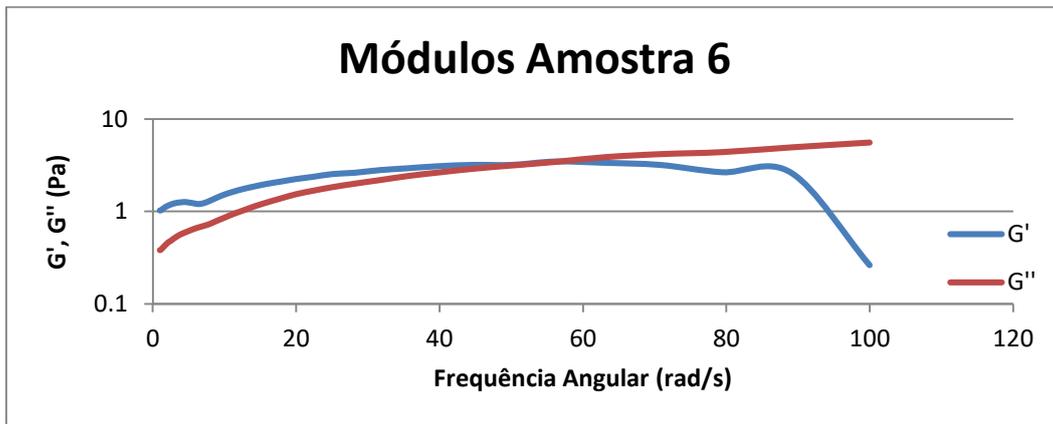


Figura E.6 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 6

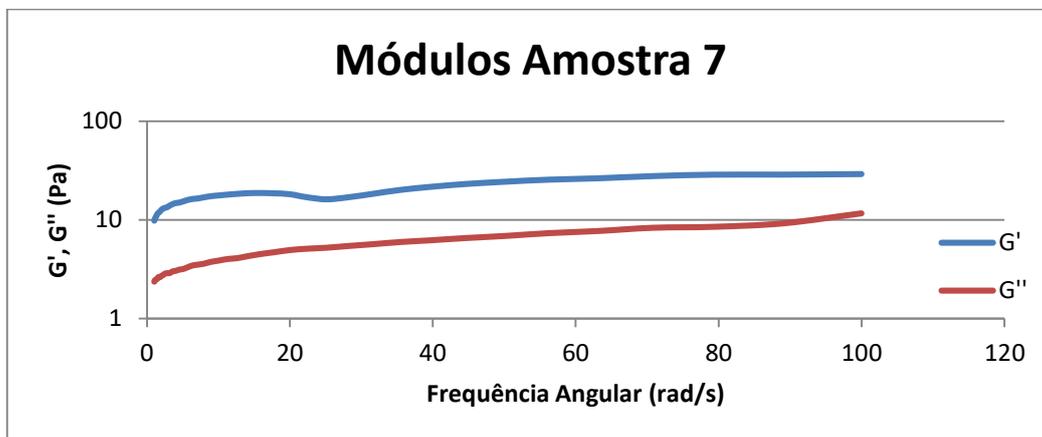


Figura E.7 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 7

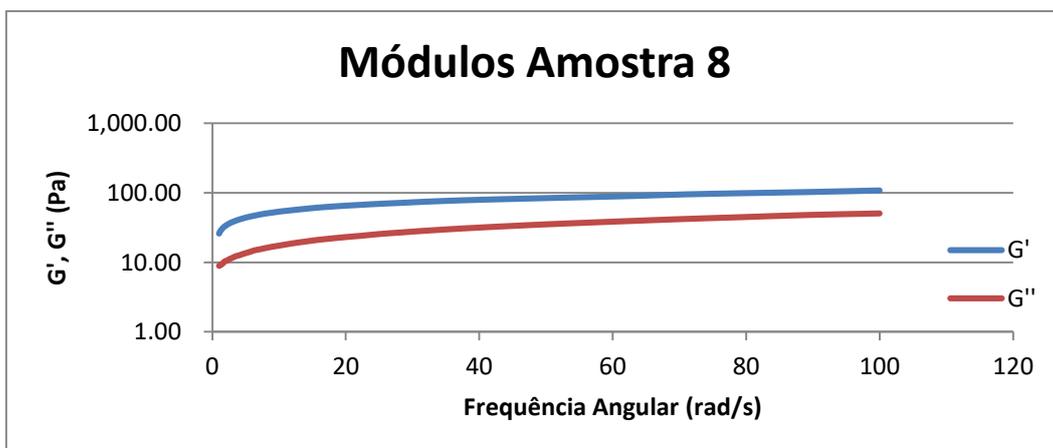


Figura E.8 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 8

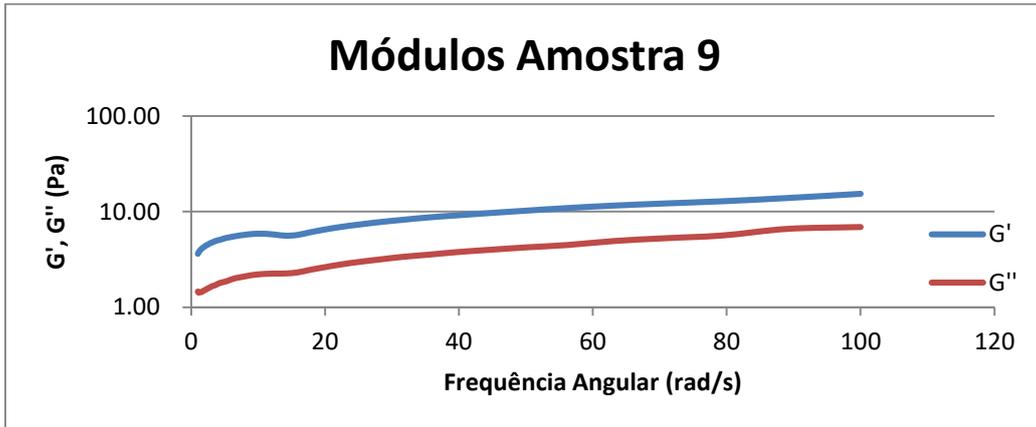


Figura E.9 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 9

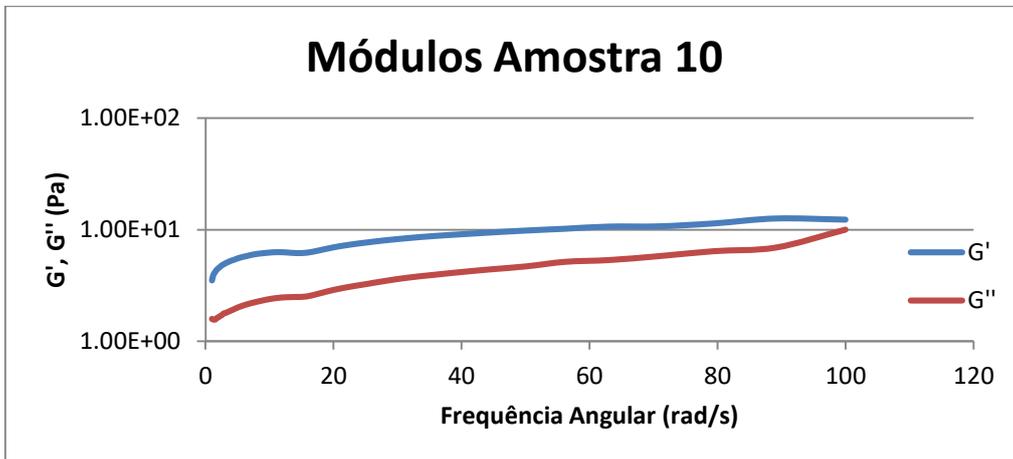


Figura E.10 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 10

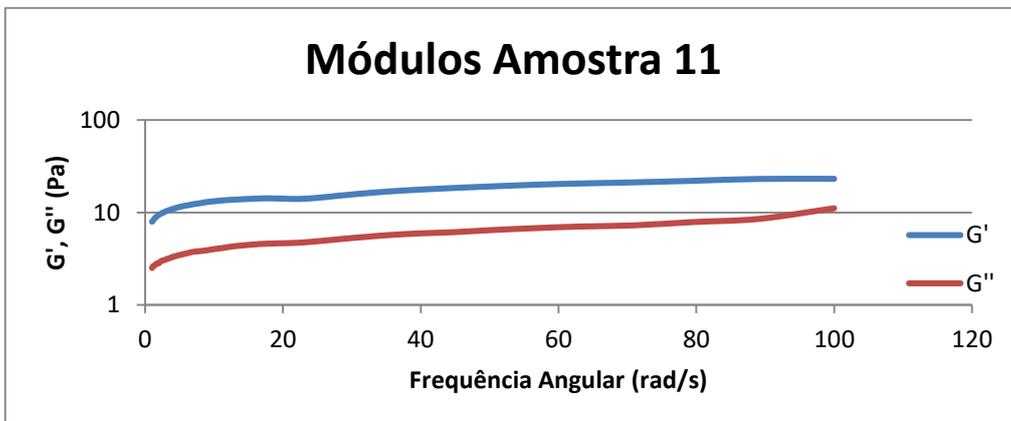


Figura E.11 – Gráfico da variação dos módulos elástico e viscoso em função da frequência angular para a amostra 11

ANEXO F – Curva de calibração do encapsulamento

Na *Figura F.1* a seguir está representada a curva de calibração para o encapsulamento de α -tocoferol extraído e diluído com diclorometano. Absorção avaliada por espectrofotometria no UV-Vis, em comprimento de onda de 296nm.

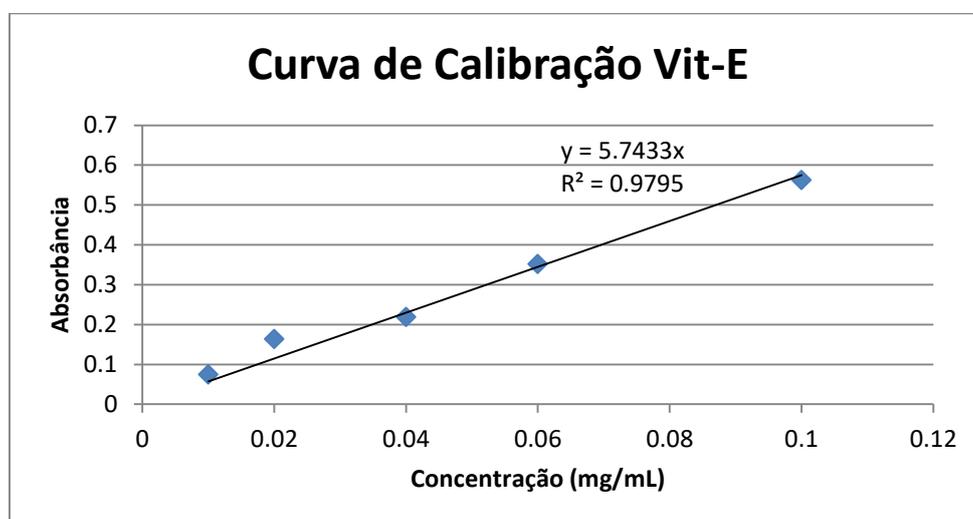


Figura F.1 – Curva de calibração do encapsulamento