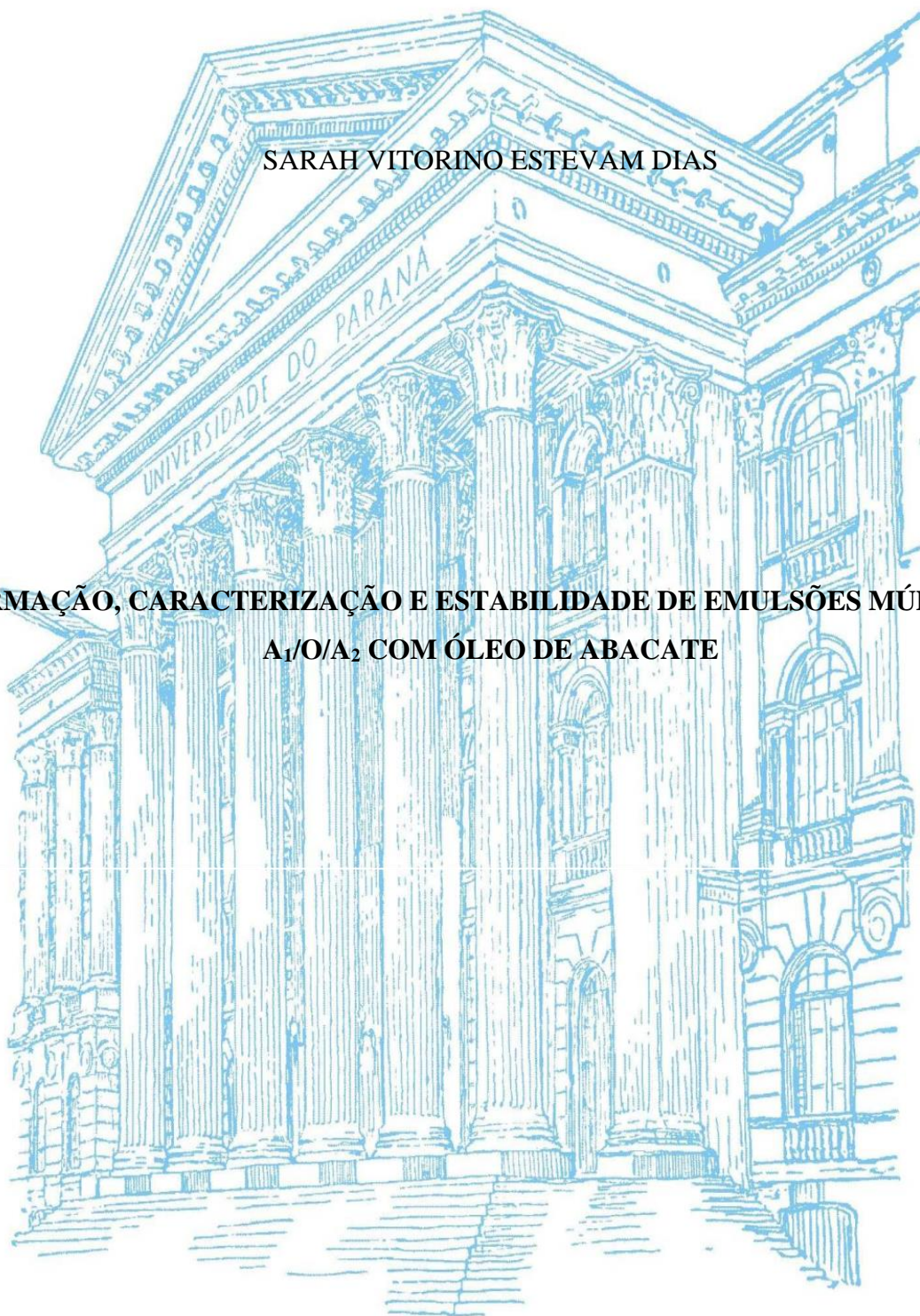


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARAH VITORINO ESTEVAM DIAS

**FORMAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE EMULSÕES MÚLTIPLAS  
A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> COM ÓLEO DE ABACATE**



CURITIBA

2016

SARAH VITORINO ESTEVAM DIAS

FORMAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE EMULSÕES MÚLTIPLAS  
A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> COM ÓLEO DE ABACATE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Agnes de Paula Scheer  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Ferreira Santos

CURITIBA  
2016

Dias, Sarah Vitorino Estevam

Formação, caracterização e estabilidade de emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  com óleo de abacate / Sarah Vitorino Estevam Dias. – Curitiba, 2016.

92 f. : il.; tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Agnes de Paula Scheer

Coorientador: Alexandre Ferreira Santos

Bibliografia: p. 85-90

1. Emulsões. 2. Óleo de abacate. 3. Estabilidade. I. Scheer, Agnes de Paula. II. Santos, Alexandre Ferreira. III. Título.

CDD


**SARAH VITORINO ESTEVAM DIAS**

**FORMAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE EMULSÕES MÚLTIPLAS A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> COM ÓLEO DE ABACATE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora:   
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. AGNES DE PAULA SCHEER  
Setor de Tecnologia, UFPR

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MICHELE CRISTIANE MESOMO  
CEDETEG, UNICENTRO

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 06 de junho de 2016.

*Dedico este trabalho à minha avó e madrinha Anézia Estevam, que durante esta trajetória de trabalho teve que partir, mas seu apoio e seu amor, sempre incondicionais, permanecerão eternos no meu coração.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, ofereço toda gratidão, por me proporcionar a dádiva de uma vida repleta de luz. Uma luz que me guia e me dá forças, mesmo quando tudo parece obscuro.

Aos meus pais, Lauro e Maria Luiza, e ao meu marido, Pedro, por serem em todas ocasiões meus alicerces e a demonstração real de apoio e de amor.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Agnes de Paula Scheer e ao meu co-orientador, Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Alexandre Ferreira Santos, pela colaboração e pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

À Luana Carolina Bosmuler Züge, pelo exemplo de comprometimento e por me guiar durante toda a execução da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rita Sierakowski e à Andressa Amado Martins pelo aprendizado obtido e pelo auxílio, sempre que necessário, com as análises reológicas. Da mesma maneira, gostaria de agradecer à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Joana Lea Meira Silveira e à Vivian Rotuno Moure, por me proporcionarem a realização das análises de espalhamento de luz de forma tão gentil. À Andrea e à Patricia, pela dedicação e disposição na realização das análises de calorimetria exploratória diferencial. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michele Spier por compartilhar a utilização do laboratório de microbiologia, sempre muito querida e atenciosa.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Charles Windson Isidoro Haminiuk e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Weinschutz pelas sugestões e estímulo à continuação do projeto durante a qualificação.

Às minhas queridas amigas, Nayara, Valeria e Cristina, por todo companheirismo, amizade e suporte nos momentos mais difíceis e também por me proporcionarem momentos tão divertidos. Aos meus amigos Anderson, Manoela, Isabel e Daniele pela conversa amiga e motivadora e por compartilharem seu tempo e conhecimento comigo.

Ao colegiado e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de alimentos pelo auxílio e compreensão.

À CAPES pelo suporte financeiro.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”*

*José de Alencar*

## RESUMO

A formação de uma emulsão múltipla ( $A_1/O/A_2$ ) apresenta maior complexidade devido à coexistência de duas barreiras interfaciais, criando a necessidade da utilização de tensoativos de natureza distintas. Para a formação da emulsão primária ( $A_1/O$ ) utiliza-se um de caráter lipofílico, e outro hidrofílico, para a emulsão externa ( $O/A_2$ ). Estas emulsões tem sido alvo de pesquisas que se concentram em encontrar métodos para torná-las viáveis. Além da utilização dos tensoativos, muitos estudos incorporam biopolímeros para aumentar a estabilidade. Este tipo de emulsão possui grande potencial na encapsulação, proteção e liberação de compostos bioativos e na formulação de produtos com reduzido teor calórico. Tendo este caráter de alimento funcional, neste trabalho, utilizou-se o óleo de abacate, o qual é rico em ácidos graxos monoinsaturados e quantidades apreciáveis de vitaminas lipossolúveis A, D e E. Portanto, este trabalho teve como um dos objetivos caracterizar o óleo de abacate e utilizá-lo na formação das emulsões múltiplas. E, como objetivos principais, verificou-se a influência da concentração dos agentes estabilizantes da emulsão primária: tensoativo lipofílico (poliglicerol poliricinoleato – PGPR) e gelatina (biopolímero), a utilização de dois tensoativos hidrofílicos distintos, os polissorbatos: Tween 40 e 80 e a influência da temperatura de armazenamento (4 e 25 °C), na estabilidade e caracterização das emulsões. A emulsão primária é composta por uma solução salina (2% m/m) acrescida de gelatina (3 e 4% m/m) dispersa na fase oleosa, contendo PGPR (6 e 5% m/m). Esta emulsão foi incorporada na fase aquosa externa onde é adicionado o tensoativo hidrofílico (2% m/m). O óleo de abacate foi caracterizado através de análises de umidade, densidade, teor de fosfolípidos, índice de iodo, acidez e perfil de ácidos graxos. As emulsões múltiplas foram caracterizadas através de microscopia, espalhamento de luz dinâmico, calorimetria exploratória diferencial, reologia, separação de fases e eficiência de encapsulação, sendo esta última para verificar a retenção do NaCl incorporado na fase aquosa interna. Os resultados da caracterização do óleo de abacate confirmaram sua boa qualidade e a maior fração lipídica como sendo o ácido graxo monoinsaturado oléico (52,9 %). A partir das imagens obtidas por microscopia verificou-se a morfologia das emulsões primárias e múltiplas, sendo possível aferir sobre a ordem de grandeza das gotas. Com as análises de espalhamento de luz foi obtido o diâmetro médio das gotas e o índice de dispersão, evidenciando que não houve diferenças significativas entre os tamanhos das gotas, o que indica estabilidade contra a coalescência para o período de 15 dias. Com a calorimetria exploratória diferencial foi validada a formação das emulsões múltiplas e verificou-se o desequilíbrio osmótico entre as fases aquosas devido a quantidade de NaCl adicionada. A partir das análises de reologia foi observado que a maior quantidade de gelatina (4%) e a utilização do Tween 40 atribuíram à emulsão múltipla maior viscosidade formando uma emulsão mais estável (100%) frente a separação de fases (*creaming*) nas duas temperaturas estudadas, para o período de 20 dias. Todas as emulsões apresentaram comportamento pseudoplástico e se apresentaram como soluções concentradas a 25°C. O Tween 40 também se mostrou melhor na avaliação da eficiência de encapsulação (92,57 %) para a emulsão mantida a 4°C e com maior quantidade de PGPR (6%), demonstrando que o PGPR é mais eficiente contra a difusão comparado à gelatina, para o período de 20 dias. Com isto, este trabalho fornece informações que podem ser utilizadas para otimização deste sistema e sua posterior aplicação na formulação de alimentos.

Palavras-chave: Emulsão múltipla. Óleo de abacate. PGPR. Tween 40. Tween 80. Estabilidade.

## ABSTRACT

Multiple emulsion formation ( $A_1/O/A_2$ ) presents greater complexity due to the coexistence of two interfacial barriers, creating the need to use surfactants of different nature. For the formation of the primary emulsion ( $A_1/O$ ) is used a lipophilic, and other hydrophilic, for external emulsion ( $O/A_2$ ). These emulsions have been the subject of researches that focus on finding methods to make them viable. Besides the use of surfactants, many works have incorporated biopolymers to increase stability. This kind of emulsion has great potential for the encapsulation, protection and release of bioactive compounds and product formulation with reduced calorie. Taking this character of functional food, in this study was used avocado oil, which is rich in monounsaturated fatty acids and appreciable amounts of liposoluble vitamins A, D and E. Therefore, this work had, as one of the goals, characterize the avocado oil and use it in the preparation of the multiple emulsions. And, as the main goals, was verified the influence of the stabilizers concentration of the primary emulsion: lipophilic surfactant (polyglycerol polyricinoleate – PGPR) and gelatin (biopolymer), the use of two different hydrophilic surfactants, polysorbates: Tween 40 and 80, and the influence of storage temperature (4 and 25 °C), in the characterization of these emulsions. Primary emulsion consists of a saline solution (2% w/w) plus gelatin (3 and 4% w/w) dispersed in the oily phase, containing PGPR (6 and 5% w/w). This one is incorporated in the external aqueous phase containing the hydrophilic surfactant (2% w/w). Avocado oil was characterized by analysis of moisture, density, phospholipid content, iodine value, acidity and fatty acid profile. Multiple emulsions were characterized by microscopy, dynamic light scattering, differential scanning calorimetry, rheology, phase separation and encapsulation efficiency, the latter was realized to verify NaCl retention, which was incorporated in the internal aqueous phase. The results of avocado oil characterization confirmed its good quality and the lipid fraction with greater amount as being the monounsaturated oleic acid (52.9%). From the images obtained by microscopy was verified the morphology of primary and multiple emulsions, being possible to check the order of magnitude of the droplets. With light scattering was obtained the average droplet diameter and the dispersion index. There were not significant differences between the droplets sizes, indicating stability against coalescence for 15 days. With differential scanning calorimetry was validated the formation of multiple emulsions and were observed the osmotic imbalance between the aqueous phases due to the amount of NaCl added. From the rheology it was observed that the larger amount of gelatin (4%) and the use of Tween 40 produced a multiple emulsion with higher viscosity and, as consequence, a more stable emulsion (100%) to the phase separation (creaming) at the two temperatures of this study, during 20 days. All emulsions exhibited pseudoplastic behavior and behaved as concentrated solutions at 25 °C. Tween 40 was also better in the evaluation of encapsulation efficiency (92.57%) to the emulsion kept at 4 °C and greater amount of PGPR (6%), demonstrating that the PGPR is more efficient against diffusion, compared to gelatin, for the period of 20 days. This study provides information that can be used to optimize this system and its subsequent application in the food formulation.

Keywords: Multiple emulsion. Avocado oil. PGPR. Tween 40. Tween 80. Stability.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DIFERENTES TIPOS DE INSTABILIDADE EM EMULSÕES .....	21
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM TENSOATIVO .....	23
FIGURA 3: ESTABILIZAÇÃO DAS GOTÍCULAS DE ÓLEO COM TENSOATIVO NÃO- IÔNICO POR IMPEDIMENTO ESTÉRICO .....	24
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO PGPR (FRAÇÃO CORRESPONDENTE A UMA MOLÉCULA DE TRI-GLICEROL TRI-RICINOLEATO).....	25
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DO TWEEN 40.....	26
FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DO TWEEN 80.....	26
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA EMULSÃO $A_1/O/A_2$ .....	28
FIGURA 8: INSTABILIDADE EM EMULSÕES MÚLTIPLAS .....	30
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE EMULSÃO MÚLTIPLA (A/O/A) .....	31
FIGURA 10: CURVA TÍPICA DE DSC PARA EMULSÕES $A_1/O/A_2$ .....	36
FIGURA 11: CURVAS DE FLUXO PARA DIFERENTES TIPOS DE FLUIDOS.....	38
FIGURA 12: CURVAS DE VISCOSIDADE PARA DIFERENTES TIPOS DE FLUIDOS .....	39
FIGURA 13: COMPORTAMENTO REOLÓGICO DOS FLUIDOS DEPENDENTES DO TEMPO .....	40
FIGURA 14: RELAÇÃO ENTRE A TENSÃO E A DEFORMAÇÃO PARA UM TESTE OSCILATÓRIO .....	41
FIGURA 15: METODOLOGIA PARA FORMAÇÃO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS $A_1/O/A_2$ UTILIZANDO ÓLEO DE ABACATE.....	50
FIGURA 16: MICROSCOPIA EMULSÃO PRIMÁRIA EP01 – 6% DE PGPR E 3% DE GELATINA (a) E EP02 – COM 5% DE PGPR E 4% DE GELATINA (b) COM APROXIMAÇÃO DE 1000X.....	57
FIGURA 17: MICROSCOPIAS DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS COM APROXIMAÇÃO DE 50X CONTENDO 1% (a) e 2% (b) DE TWEEN 40 .....	58
FIGURA 18: MICROSCOPIA EMULSÃO MÚLTIPLA COM APROXIMAÇÃO DE 1000X EVIDENCIANDO AS GOTAS DA FASE AQUOSA INTERNA .....	58

FIGURA 19: MICROSCOPIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM0140 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM0180 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM0240 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM0280 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) COM APROXIMAÇÃO DE 100X APÓS 24 HORAS .....	59
FIGURA 20: MICROSCOPIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) COM APROXIMAÇÃO DE 100X APÓS 2 SEMANAS.....	60
FIGURA 21: MICROSCOPIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) COM APROXIMAÇÃO DE 100X APÓS 2 SEMANAS.....	61
FIGURA 22: DISTRIBUIÇÃO TAMANHO DE GOTAS DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d); APÓS 24 HORAS E 2 SEMANAS. ....	62
FIGURA 23: CURVAS DE DSC DAS EMULSÕES PRIMÁRIAS: EP01 (6% PGPR E 3% DE GELATINA) E EP02 (5% DE PGPR E 4% DE GELATINA).....	64
FIGURA 24: CURVAS DE DSC DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM0140 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM0180 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM0240 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM0280 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d).....	65

FIGURA 25: CURVAS DE DSC DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM0140, EM0180, EM0240 E EM0280 COM ÊNFASE NA REGIÃO REFERENTE AO PICO II. ....	66
FIGURA 26: CURVAS DE VISCOSIDADE DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d).....	68
FIGURA 27: CURVAS DE FLUXO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d). ....	69
FIGURA 28: DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS DOS FATORES TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA (EP), TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO (TS) E TEMPERATURA (T) PARA O ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA $k_{ow}$ .....	71
FIGURA 29: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA $k_{ow}$ EM FUNÇÃO DOS FATORES EP (TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA) E TS (TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO). ....	72
FIGURA 30: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA $k_{ow}$ EM FUNÇÃO DOS FATORES T (TEMPERATURA) E EP (TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA). ....	73
FIGURA 31: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA $k_{ow}$ EM FUNÇÃO DOS FATORES T (TEMPERATURA) E TS (TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO). ....	73
FIGURA 32: VARREDURA DE FREQUÊNCIA DA EP01 – 6% DE PGPR E 3% DE GELATINA (a) E EP02 – 5% DE PGPR E 4% DE GELATINA (b) A 25°C .....	74
FIGURA 33: VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN	

80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d).....	75
FIGURA 34: VOLUME DE FASE SEPARADA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) APÓS 20 DIAS.....	76
FIGURA 35: VOLUME DE FASE SEPARADA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d). APÓS 20 DIAS.....	77
FIGURA 36: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl <i>VERSUS</i> CONDUTIVIDADE ELÉTRICA PARA A FAIXA DE 100 A 1000 PPM A 25°C	78
FIGURA 37: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NaCl DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) PARA O PERÍODO DE 20 DIAS .....	80
FIGURA 38: DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS DOS FATORES TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA (EP), TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO (TS) E TEMPERATURA (T) PARA A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO ....	82

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DOS TENSOATIVOS DE ACORDO COM SEU GRUPO POLAR .....	23
TABELA 2: ESCALA HLB PARA TENSOATIVOS NÃO-IÔNICOS .....	24
TABELA 3: METODOLOGIAS UTILIZADAS POR DIFERENTES AUTORES PARA FORMAÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA.....	32
TABELA 4: MODELOS REOLÓGICOS PARA AJUSTE DE CURVAS DE FLUXO .....	40
TABELA 5: ESTUDOS REALIZADOS UTILIZANDO EMULSÕES MÚLTIPLAS PARA ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS .....	43
TABELA 6: PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA PREPARO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS .....	49
TABELA 7: TEOR DE UMIDADE, DENSIDADE, ACIDEZ, TEOR DE FOSFOLÍPÍDEOS E ÍNDICE DE IODO DO OACR.....	54
TABELA 8: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PARA O OACR EM ESTUDO COMPARADO AOS DADOS OBTIDOS POR OUTROS AUTORES .....	56
TABELA 9: VALORES MÉDIOS DE SPAN E $D_{4,3}$ PARA AS EMULSÕES MÚLTIPLAS APÓS 24 HORAS E 2 SEMANAS .....	63
TABELA 10: CALOR LATENTE DE CONGELAMENTO E FASE AQUOSA RETIDA NA EMULSÃO PRIMÁRIA PARA AS EMULSÕES PRIMÁRIAS ATRAVÉS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL .....	67
TABELA 11: PARÂMETROS DE AJUSTE DO MODELO DE OSTWALD-DE-WAELLE ...	70
TABELA 12: ANOVA PARA O MODELO DE ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA .....	72
TABELA 13: ESTABILIDADE AO CREAMING MONITORADA NO PERÍODO DE 20 DIAS. ....	77
TABELA 14: CONDUTIVIDADE DAS DIFERENTES FASES QUE FORMAM A EMULSÃO MÚLTIPLA .....	79
TABELA 15: VALORES DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NaCl PARA O PERÍODO DE 20 DIAS.....	81

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
3.1 EMULSÕES.....	20
3.2 ESTABILIDADE.....	21
3.3 ESTABILIZANTES.....	22
3.3.1 Tensoativos.....	23
3.4 EMULSÕES MÚLTIPLAS .....	26
3.4.1 Estabilidade em emulsões múltiplas .....	28
3.4.2 Metodologia para formação de emulsões múltiplas .....	30
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS.....	33
3.5.1 Microestrutura.....	33
3.5.1.1 Microscopia.....	33
3.5.1.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	33
3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	35
3.5.3 Reologia.....	37
3.5.3.1 Reologia em estado estacionário.....	38
3.5.3.2 Reologia em estado dinâmico (ensaios oscilatórios) .....	40
3.5.4 Estabilidade macroscópica.....	42
3.5.5 Eficiência de encapsulação .....	43
3.6 FASE OLEOSA .....	43
3.6.1 Óleo de abacate.....	44

<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
4.1 MATERIAL .....	46
4.2 MÉTODOS....	46
4.2.1 Caracterização do óleo de abacate comercial refinado.....	46
4.2.1.1 Umidade .....	46
4.2.1.2 Densidade.....	47
4.2.1.3 Acidez .....	47
4.2.1.4 Índice de iodo.....	47
4.2.1.5 Teor de fosfolipídeos .....	47
4.2.1.6 Perfil de ácidos graxos .....	48
4.2.2 Formação da emulsão múltipla.....	48
4.2.3 Caracterização das emulsões múltiplas .....	51
4.2.3.1 Microscopia.....	51
4.2.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	51
4.2.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	51
4.2.4 Reologia.....	52
4.2.4.1 Separação das fases .....	52
4.2.4.2 Eficiência de encapsulação .....	52
4.2.4.3 Análise estatística.....	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO ÓLEO DE ABACATE .....	54
5.1.1 Perfil de ácidos graxos.....	55
5.2 FORMAÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA.....	56
5.2.1 Formação da emulsão primária.....	56
5.2.2 Efeito da concentração de Tween 40 na formação da emulsão múltipla.....	57
5.3 MICROSCOPIA E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTA .....	59

5.4	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	64
5.5	REOLOGIA .....	67
5.5.1	Reologia em estado estacionário .....	67
5.5.2	Reologia oscilatória .....	74
5.6	SEPARAÇÃO DAS FASES ( <i>CREAMING</i> ).....	76
5.7	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO .....	78
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Uma emulsão simples consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis, no qual um deles é disperso em outro na forma de gotículas. Tem-se como exemplos de emulsões alimentares diversos produtos do cotidiano, como a maionese, manteiga, leite, molho para salada e sorvete. Uma emulsão múltipla, ou também chamada de emulsão dupla, possui estas mesmas características, porém há mais de uma fase dispersa.

O estudo das emulsões múltiplas apresenta maior complexidade, comparado à uma emulsão simples, pois nelas coexistem duas barreiras interfaciais distintas, uma entre a fase aquosa interna ( $A_1$ ) e a fase oleosa (O) e outra entre essa mesma fase oleosa, dispersa na fase aquosa externa contínua ( $A_2$ ). Sendo assim, também haverá a necessidade de utilizar tensoativos de natureza distintas. Para a formação da emulsão primária ( $A_1/O$ ) utiliza-se um tensoativo de caráter lipofílico, e outro hidrofílico, para a emulsão externa ( $O/A_2$ ) (MCCLEMENTS et al., 2007). Neste trabalho será abordada exclusivamente a formação do primeiro tipo de emulsão múltipla,  $A_1/O/A_2$ .

Nesta pesquisa, como tensoativo lipofílico, foi utilizado o poliglicerol poliricinoleato (PGPR), o qual é amplamente empregado e sua eficácia comprovada na manutenção da estabilidade de emulsões A/O (USHIKUBO; CUNHA, 2014). E como tensoativos hidrofílicos foram utilizados os polissorbatos: Tween 80, por ser o mais encontrado para este tipo de aplicação (O/A), e o Tween 40, ainda pouco utilizado.

Por se tratar de um sistema termodinamicamente instável, a utilização comercial de emulsões múltiplas, para fins alimentícios, ainda não é encontrada. Por isso, inúmeras pesquisas se concentram em encontrar métodos eficientes para tornar a emulsão múltipla viável. Uma das opções para aumentar a estabilidade é a adição de biopolímeros nas fases aquosas, tanto interna quanto externa. Os biopolímeros também são estudados como forma de reduzir a quantidade de PGPR, pois sua utilização é regulada e sua presença pode produzir um sabor não agradável quando adicionado em concentrações acima de 5% m/m. Embora concentrações superiores sejam normalmente requeridas para estabilização das emulsões por um período longo de tempo (DICKINSON, 2011). Desta forma, neste trabalho, como um dos objetivos, foi testada se uma maior quantidade de gelatina comercial, utilizada como biopolímero, frente à redução do PGPR produz emulsões múltiplas com estabilidade e características semelhantes às formuladas com reduzido teor de gelatina e maior quantidade de PGPR.

A pesquisa das emulsões múltiplas é importante pois as mesmas possuem diversas aplicações e benefícios, entre eles destacam-se a encapsulação, proteção e liberação de compostos bioativos e produção de produtos com reduzido teor calórico (JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013). Essas aplicações tornam as emulsões múltiplas com potencial de utilização em alimentos funcionais.

Com o intuito de aumentar o valor nutricional desta emulsão, uma alternativa para a fase oleosa é a utilização do óleo de abacate. Este é rico em ácidos graxos monoinsaturados, essenciais para alimentação humana e relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares, além de possuir quantidade apreciável de vitaminas lipossolúveis A, D e E. Suas características são muito semelhantes ao óleo de oliva, o qual já é amplamente utilizado na culinária brasileira (TANGO; TURATTI, 1992).

Tendo em vista uma maior preocupação da população com hábitos de vida mais saudáveis, o que inclui uma dieta composta por alimentos funcionais e mais ricos do ponto de vista nutricional, a preparação destas emulsões múltiplas tem como destaque a utilização do óleo de abacate, o qual ainda é pouco empregado neste tipo de aplicação, mesmo com suas características benéficas à saúde humana, servindo de estímulo para sua maior utilização. Este trabalho também estudou a formação e caracterização de emulsões múltiplas com diferentes concentrações de agentes estabilizantes e com reduzido teor de gordura, devido à dispersão da fase aquosa no interior da fase oleosa, podendo ser utilizadas para encapsulação de compostos.

Apesar de seu grande potencial de aplicação, as emulsões múltiplas ainda têm sido pouco estudadas no Brasil. E esta pesquisa se mostra como o início dos esforços aplicados a este tipo específico de emulsão dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência das concentrações de tensoativo lipofílico (PGPR) e de gelatina comercial, bem como a utilização de tensoativos hidrofílicos distintos (Tween 40 e 80) na formação e caracterização de emulsões múltiplas utilizando como fase oleosa o óleo de abacate.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o óleo de abacate através de análises de umidade, densidade, teor de fosfolípidos, índice de iodo, acidez e perfil de ácidos graxos.
- Avaliar a morfologia das emulsões formadas através de microscopia óptica e obter as distribuições dos tamanhos de gota, utilizando o recurso de espalhamento dinâmico de luz, para o período de 24 horas e 2 semanas (emulsões mantidas a 4 e 25°C) após o preparo.
- Validar a formação das emulsões múltiplas, determinar os calores latentes de congelamento e a quantidade de fase aquosa interna retida nas emulsões primárias através da análise de calorimetria exploratória diferencial.
- Estudar o comportamento reológico das emulsões múltiplas formadas, para as temperaturas de 4 e 25°C e ajustar os modelos reológicos às curvas de fluxo.
- Realizar testes de reologia oscilatória, a 4 e 25°C, para determinação do comportamento viscoelástico das amostras.
- Avaliar a estabilidade macroscópica das emulsões múltiplas através da visualização da separação de fases, para o período de 20 dias nas temperaturas de 4 e 25°C.
- Avaliar a eficiência de encapsulação através de medidas de condutividade, verificando a liberação de NaCl, adicionado à fase aquosa interna da emulsão para o período de 20 dias nas temperaturas de 4 e 25°C.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 EMULSÕES

Emulsões fazem parte de um tipo específico de dispersão coloidal, onde ambas as fases, dispersa e contínua são líquidas. Este sistema também é caracterizado por ser composto por gotas de um fluido imerso em outro, no qual é imiscível. Sendo assim, as emulsões são amplamente utilizadas para misturas envolvendo água e óleo, como por exemplo: maionese, leite, margarina e molho de salada, porém há outras formas de emulsão, sem caráter alimentício, como algumas tintas compostas por partículas poliméricas aglutinantes dispersas em água (HUNTER; WHITE; CHAN, 1989; BOOM, 2008).

As emulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A) onde a fase dispersa, neste caso, o óleo, é formada por gotas em uma fase contínua, a água. Mas também há emulsões do tipo água em óleo (A/O). Devido à imiscibilidade entre essas fases há uma tensão interfacial causada pela diferença de coesão entre as moléculas dos dois meios. O balanço de energia para formação da emulsão é dado pela Equação 1 (KAWAGUCHI, 2015).

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S \cdot T + \sigma \cdot \Delta A \quad (1)$$

Durante a formação da emulsão a temperatura (T) é considerada constante, o que anula o termo da variação da entalpia ( $\Delta H$ ). A variação de área ( $\Delta A$ ), devido a formação das gotículas para produção da fase dispersa é muito maior comparado à variação da entropia ( $\Delta S$ ), a qual também pode ser considerada desprezível. Sendo assim, comumente, a quantidade de energia necessária para criação da interface é descrita pela Equação 2.

$$\Delta G = \sigma \cdot \Delta A \quad (2)$$

Sendo  $\Delta G$  (J) a energia livre de Gibbs,  $\sigma$  é a tensão interfacial ( $J/m^2$ ) e A é área da interface criada ( $m^2$ ).

A Equação 2 é útil para compreender a origem da instabilidade em emulsões, sob a ótica da termodinâmica. Essa quantidade de energia, expressada como energia livre de Gibbs, sempre

será positiva, com exceção de poucos casos onde a formação de emulsão é espontânea, os quais fogem do escopo do trabalho. Nos demais casos o processo de emulsificação precisa de energia para quebrar a fase, que será dispersa em pequenas gotículas. O sistema tende a minimizar essa quantidade de energia, sendo assim, uma das formas é a coalescência, ou seja, a fusão das gotas, diminuindo a área interfacial e a energia como consequência. No entanto a presença de substâncias na interface, como emulsificantes, diminuem a tensão interfacial, atuando como uma barreira contra a coalescência, tornando o sistema mais estável (HUNTER; WHITE; CHAN, 1989; BOOM, 2008; KAWAGUCHI, 2015).

### 3.2 ESTABILIDADE

De acordo com McClements (2005) a estabilidade de uma emulsão pode ser definida como sua habilidade em resistir a mudanças com o tempo. Há diversos mecanismos físico-químicos que provocam alteração nas propriedades da emulsão, conforme apresentado na FIGURA 1.

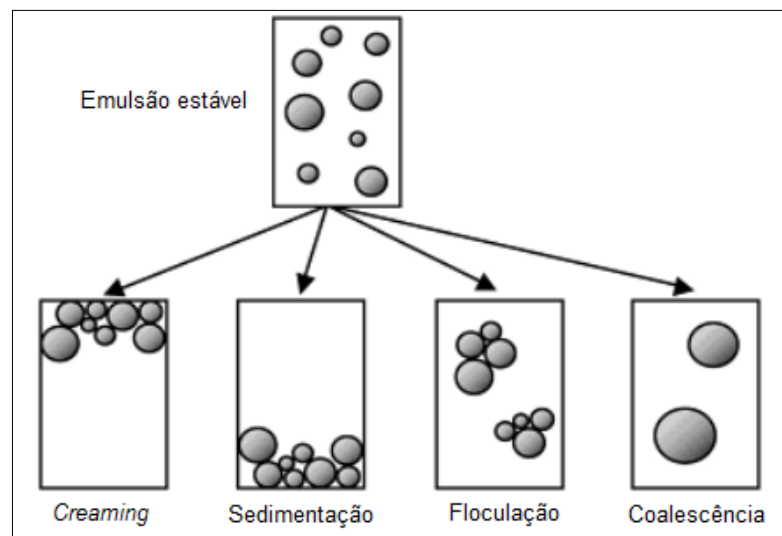


FIGURA 1: DIFERENTES TIPOS DE INSTABILIDADE EM EMULSÕES  
 FONTE: ADAPTADO DE MCCLEMENTS (2005)

O processo de *creaming* pode acontecer de maneira rápida ou lenta e é o contrário da sedimentação, já que as gotas permanecem aglomeradas na superfície do sistema. Este processo pode ser acelerado por centrifugação. No entanto, também pode ser retardado caso a viscosidade

do meio dispersante seja alta ou se for possível diminuir a diferença relativa entre as densidades do meio disperso e dispersante (HUNTER; WHITE; CHAN, 1989; TADROS, 2013).

Outro fenômeno presente é a floculação, caracterizada pela agregação das gotas. Ela ocorre nos casos em que não há repulsão suficiente para que as gotas permaneçam separadas. A floculação é um dos fatores que aumenta a velocidade de *creaming*, além dos agregados se movimentarem com maior rapidez eles também carregam outras partículas menores no caminho.

Finalmente, a coalescência é o processo no qual duas ou mais gotas se unem formando uma única gota maior. Este mecanismo pode levar a quebra da emulsão, produzindo duas fases, claramente separadas, com mínima área interfacial, processo também conhecido por *oiling-off* (HUNTER; WHITE; CHAN, 1989; TADROS, 2013; MCCLEMENTS, 2005). A coalescência inicia-se através de uma pressão aplicada sobre a área interfacial das gotículas deformando-as de modo que a área interfacial aumente, diminuindo sua força e então rompendo o filme que as separam (MYERS, 2006).

As emulsões também podem sofrer com o fenômeno conhecido como maturação de Ostwald. Nele, pequenas gotas são incorporadas as maiores, através de um processo de difusão, sem ruptura do filme interfacial, fazendo com que estas cresçam ainda mais. A força motriz para que isto ocorra é a diferença de potencial químico entre as gotas de diferentes tamanhos. Se a fase dispersa possuir uma solubilidade considerável com a fase contínua, a maturação de Ostwald poderá ocorrer a taxas significativas (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2013).

### 3.3 ESTABILIZANTES

O uso dos agentes estabilizantes é necessário para aumentar a estabilidade das emulsões. Para que isso ocorra, o emulsificante deverá ser adsorvido rapidamente e com força suficiente para resistir à dessorção durante as colisões das gotas. De modo geral, há quatro classes de estabilizantes: eletrólitos inorgânicos, tensoativos, macromoléculas e finas partículas sólidas que aderem à interface, devido à energia superficial (*pickering*). Neste trabalho o foco será a utilização de tensoativos, os quais são adsorvidos entre as duas fases imiscíveis formando uma barreira contra a coalescência (HUNTER; WHITE; CHAN, 1989).

### 3.3.1 Tensoativos

Como característica os tensoativos apresentam moléculas que possuem afinidade com ambas as fases. Parte desta molécula é hidrofóbica, possuindo maior afinidade com a fase oleosa, enquanto outra parte é hidrofílica e possui maior afinidade com o meio aquoso, como mostra a FIGURA 2.

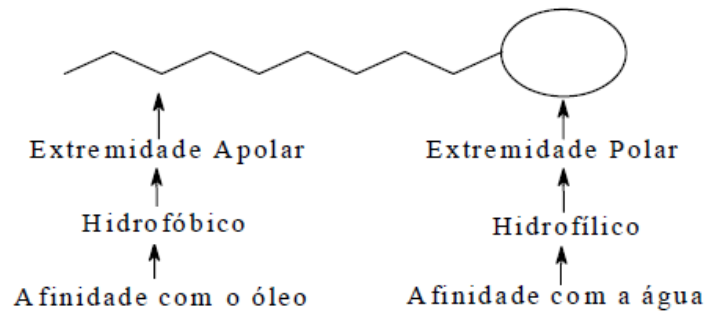


FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM TENSOATIVO  
 FONTE: GUARACIARA et al. (2006)

Os tensoativos são adsorvidos nas interfaces orientando-se de maneira que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o grupo apolar para a fase oleosa, formando um filme molecular que reduz a tensão interfacial. A extremidade hidrofóbica, normalmente, é composta por uma longa cadeia carbônica, já a hidrofílica deve ser formada por um grupo iônico ou altamente polar. Sendo assim, os tensoativos podem ser classificados de acordo com a natureza deste grupo hidrofílico, como apresentado na TABELA 1 (ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DOS TENSOATIVOS DE ACORDO COM SEU GRUPO POLAR

Classificação	Descrição
<b>Catiônicos</b>	Grupo polar com carga positiva, por exemplo, sais de amônio quaternários ( $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$ ) e aminas de cadeia longa ( $\text{RNH}_3^+\text{Cl}^-$ )
<b>Aniônicos</b>	Grupo polar com carga negativa, por exemplo, sabões ( $\text{RCOO}^-\text{Na}^+$ )
<b>Zwiteriônicos</b>	Grupos com carga positiva e negativa podem estar presentes, por exemplo, sulfobetaina ( $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ )
<b>Não-iônicos</b>	Não apresenta carga iônica, por exemplo, alcoóis polietoxilados ( $\text{R}(\text{OC}_2\text{H}_4)_x\text{OH}$ )

FONTE: ROSEN; KUNJAPPU (2012)

Para os tensoativos não-iônicos a razão entre os grupos hidrofílicos e hidrofóbicos do tensoativo é medida pelo balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), um conceito introduzido por

Griffith (1949) e amplamente utilizado para correlacionar o comportamento dos tensoativos em diferentes situações. Um alto valor de HLB terá a tendência em produzir uma curvatura a favor do sistema O/A, enquanto o oposto ocorrerá para baixos valores de HLB (HUNTER; WHITE; CHAN, 1989).

Os valores de HLB não são bem definidos devido a diferentes formas de obtê-los, porém uma média pode ser obtida observando o comportamento do tensoativo em diferentes sistemas, através da experiência do uso dos mesmos, como mostra a TABELA 2.

TABELA 2: ESCALA HLB PARA TENSOATIVOS NÃO-IÔNICOS

HLB	Aplicação
4-6	A/O emulsificante
7-9	Agente molhante
8-18	O/A emulsificante
13-15	Detergente
10-18	Solubilizante

FONTE: ADAPTADO DE CHEMMUNIQUE (2004)

Estes números indicam a percentagem hidrofílica do tensoativo, sendo que o número 20 corresponde a 100% de característica hidrofílica. O que indica que a natureza do tensoativo irá definir o tipo de emulsão que será formada.

A estabilização de emulsões por tensoativos não iônicos ocorre pelo impedimento estérico de suas moléculas que apresentam partes polares muito longas, como mostra a FIGURA 3, para um exemplo de uma emulsão de óleo em água (DALTIM, 2012).

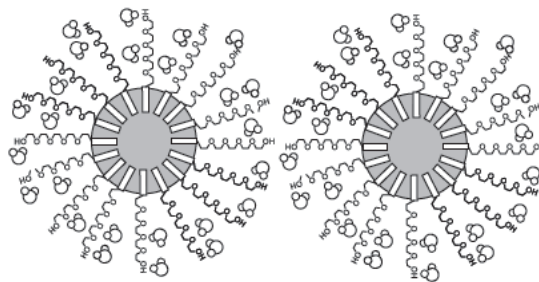


FIGURA 3: ESTABILIZAÇÃO DAS GOTÍCULAS DE ÓLEO COM TENSOATIVO NÃO-IÔNICO POR IMPEDIMENTO ESTÉRICO  
FONTE: DALTIM (2012)

Neste trabalho foram utilizados apenas tensoativos não iônicos. Entre as vantagens na utilização de um tensoativo não-iônico estão sua menor sensibilidade a eletrólitos e ao pH da solução (MYERS, 2006).

Emulsões que contem aditivos para estabilizá-las, como os citados anteriormente, podem permanecer estáveis por horas, dias ou meses. Nestes sistemas a movimentação das gotas e a colisão entre elas continuam, porém, a barreira interfacial é forte o suficiente para prevenir a coalescência (MYERS, 2006).

As emulsões múltiplas ( $A_1/O/A_2$ ) apresentam duas barreiras interfaciais, sendo necessário para sua formação tensoativos de natureza distintas. Um tensoativo lipofílico para a formação da emulsão primária ( $A_1/O$ ), e outro hidrofílico, para a emulsão externa ( $O/A_2$ ).

Como tensoativo lipofílico foi utilizado o poliglicerol poliricinoleato (PGPR), o qual também é o mais utilizado na formulação de emulsões múltiplas com grau alimentício. Este emulsificante sintético tem se mostrado altamente eficaz na produção de emulsões finas e estáveis do tipo A/O, possuindo valor de HLB entre 2 e 4 (BRENNTAG FOOD & NUTRITION EUROPE, 2011; DICKINSON, 2011).

Na indústria de alimentos o PGPR é tradicionalmente utilizado como modificador da viscosidade do chocolate, com intuito de melhorar suas características de processamento, reduzir o teor de gordura e o custo de fabricação. Ele é sintetizado através da reação do poliglicerol com óleo de mamona, sua estrutura química é mostrada na FIGURA 4 (HASENHUETTL; HARTEL, 2008).

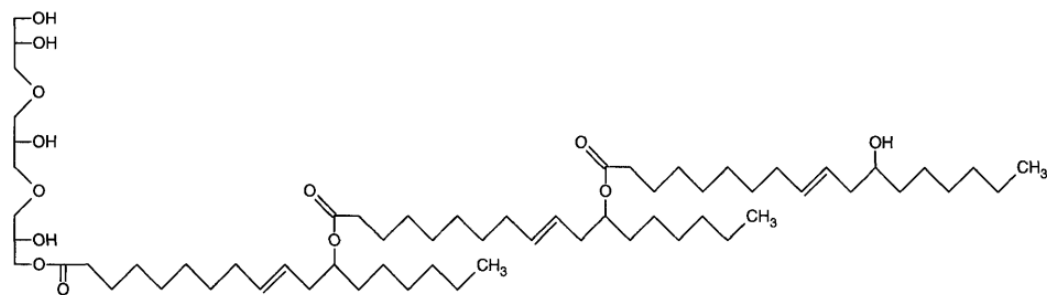


FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO PGPR (FRAÇÃO CORRESPONDENTE A UMA MOLÉCULA DE TRIGLICEROL TRI-RICINOLEATO)

FONTE: FDA (2008)

Já como tensoativos hidrofílicos, utilizou-se neste trabalho o monopalmitato de polioxietileno sorbitano, comumente conhecido como Tween 40 (FIGURA 5) e o monooleato de polioxietileno sorbitano, Tween 80, também chamado de polissorbitato 80 (FIGURA 6).

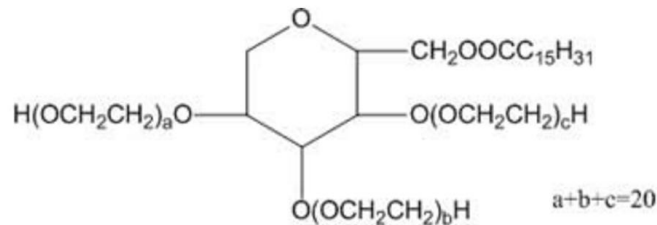


FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DO TWEEN 40  
 FONTE: IRON GROUP INC. (2011)

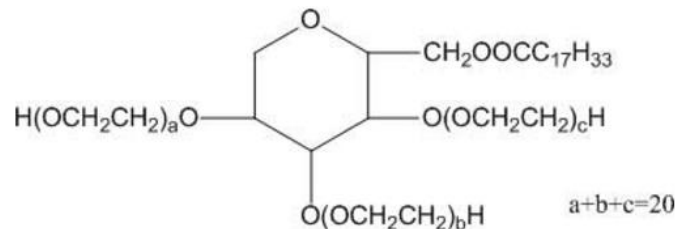


FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DO TWEEN 80  
 FONTE: IRON GROUP INC. (2011)

Estes emulsificantes fazem parte do grupo dos polisorbatos, compostos produzidos a partir da modificação de ésteres de sorbitano com a adição de óxido de etileno. Os ésteres de sorbitano possuem baixo HLB e assim são considerados lipofílicos, mas a adição do óxido de etileno, em média de 20 mols por mol de éster sorbitano, forma uma longa cadeia fortemente polarizada, tornando estes polisorbatos altamente hidrofílicos, tanto que o valor de HLB do Tween 40 é de 15,6 e do Tween 80 é 15,0 (COTTREL; PEIJ, 2004).

### 3.4 EMULSÕES MÚLTIPLAS

Uma emulsão múltipla é definida pela dispersão de gotas, dentro das quais há gotas ainda menores de uma diferente fase. Há dois possíveis tipos de emulsão múltipla: água-óleo-água (A/O/A) ou óleo-água-óleo (O/A/O). No primeiro caso a estrutura consiste de pequenas gotas de água dentro de gotas maiores de óleo que são dispersas em uma fase aquosa contínua. O segundo sistema é composto por gotas de água, que contém gotículas de óleo, dispersas em um meio oleoso

(JIAO; BURGESS, 2008). Neste trabalho o foco foi o primeiro caso, para este sistema água-óleo-água, a nomenclatura das fases é geralmente dada como  $A_1/O/A_2$  de modo a diferenciar a fase interna ( $A_1$ ) da fase externa ( $A_2$ ).

Devido a sua estrutura, uma emulsão múltipla possibilita a liberação controlada de substâncias químicas, que inicialmente estão encapsuladas nas gotas internas, a partir de um estímulo externo, por exemplo: o contato com boca, estômago ou intestino. Porém a emulsão múltipla também pode agir como meio para proteger essas substâncias químicas, geralmente compostos funcionais, que permanecem encapsulados dentro da fase interna, evitando sua degradação química por impossibilitar a reação das mesmas com outros compostos. A indústria farmacêutica e cosmética ainda são as maiores áreas de pesquisa e aplicação, pois a emulsão múltipla é um potencial veículo para drogas e ativos (vacinas, enzimas, vitaminas, hormônios) que podem ser liberadas no organismo (PAYS et al., 2002; MCCLEMENTS et al., 2007; DICKINSON, 2011).

Na área alimentícia as pesquisas se concentram na utilização das emulsões múltiplas para encapsular compostos bioativos e reduzir calorias de produtos, os quais já existem como emulsões simples de O/A (maionese, molho de salada, sobremesas). Neste último caso a redução calórica acontece pela inserção de gotículas de água na fase oleosa, reduzindo a quantidade de gordura e calorias, com a vantagem de manutenção das propriedades físico-químicas e sensoriais (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007).

Jiménez-Colmenero (2013) sintetizou as pesquisas realizadas sobre as aplicações das emulsões múltiplas no desenvolvimento de alimentos funcionais. O autor esclarece a importância da pesquisa sobre compostos ativos na nutrição humana, os quais são capazes de reduzir o risco de doenças. Assim, a emulsão múltipla tem se apresentado com grande potencial de aplicação, já que atualmente há uma preocupação maior na busca de alimentos mais saudáveis e com maior valor nutricional. O autor também cita a utilização da emulsão múltipla para redução de calorias e as pesquisas desenvolvidas nesta área, além da aplicação das pesquisas voltadas à encapsulação de compostos funcionais, como: minerais, carotenoides, vitaminas, micro-organismos, lactoferrina, compostos fenólicos, aminoácidos, óleos.

### 3.4.1 Estabilidade em emulsões múltiplas

Uma das maiores dificuldades da indústria alimentícia é a formação de uma emulsão múltipla estável, usando estabilizantes com grau alimentício, diferentes dos tradicionalmente aplicados na indústria farmacêutica e cosmética, o que dificulta sua aplicação apesar das vantagens descritas anteriormente. Esse tipo de emulsão é altamente suscetível a quebrar durante o estoque ou quando expostas a forças mecânicas, temperatura, desidratação, entre outros (MCCLEMENTS et al., 2007).

A FIGURA 7 exemplifica a estrutura de uma emulsão  $A_1/O/A_2$  (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007).

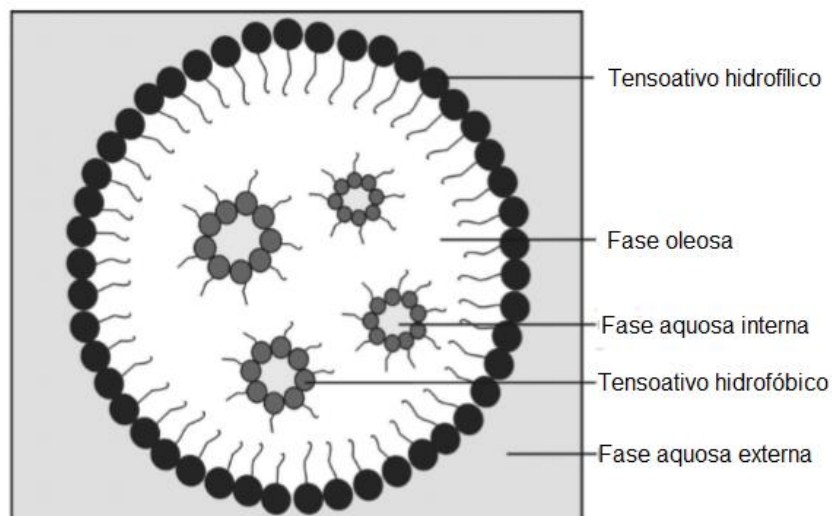


FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA EMULSÃO  $A_1/O/A_2$   
 FONTE: ADAPTADO DE KOVÁCS et al. (2005)

Para obtenção de uma emulsão múltipla estável, é necessário que a emulsão primária apresente alta estabilidade, para isso a mesma deve ser composta por pequenas gotículas, de aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , ou menor. A formação de uma emulsão com gotas tão pequenas é dependente não só pelo tipo e quantidade de tensoativo adicionado e pela intensidade de agitação, mas também pelo aumento da viscosidade do meio, podendo ser este último alcançado através da adição de biopolímeros, os quais também são responsáveis por formar um filme interfacial rígido (GARTI, 1996; MUSCHIOLIK, 2007).

A adição de uma quantidade significativa de tensoativo lipofílico na fase oleosa, irá aumentar a estabilidade da emulsão primária, porém o PGPR, o qual se apresenta como o tensoativo preferido para este tipo de emulsão, é sintético e sua utilização regulada. Neste sentido, a adição de macromoléculas, como os biopolímeros, se consagram na formação da emulsão múltipla, produzindo emulsões mais estáveis e permitindo reduzir a quantidade de tensoativo sintético na formulação, como mostra o trabalho realizado por Su et al. (2006), onde foi possível reduzir a quantidade de PGPR pela adição de caseinato de sódio, mantendo a eficiência da emulsão.

Dickinson (2011) menciona em seu trabalho pesquisas, realizadas por outros autores, que incorporaram os biopolímeros na formação da emulsão múltipla, enfatizando como eles tem sido agregados com sucesso nas fases aquosas interna e externa, aumentando sua estabilidade e eficiência. Como benefícios da utilização dos biopolímeros estão a baixa susceptibilidade à difusão, comparados a emulsificantes de baixa massa molecular, e a formação de uma estrutura de rede estabilizante para a fase aquosa. Entre os biopolímeros utilizados destacam-se: gelatina (WEISS et al., 2005; SAPEI et al., 2012), caseinato de sódio (FECHNER et al., 2007; O'REGAN; MULVIHILL, 2010), proteína do soro do leite (SURH et al., 2007; HERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2013), goma acácia (SU et al., 2008), goma xantana, locusta e carragena (BENNA-ZAYANI et al., 2008).

A gelificação da fase aquosa interna de emulsões múltiplas ainda tem sido objeto de estudos recentes como uma forma de aumentar a estabilidade de emulsões múltiplas (PEREZ-MORAL et al., 2014; OPPERMANN et al., 2015).

As instabilidades que ocorrem nas emulsões múltiplas são as mesmas de uma emulsão simples: *creaming*, sedimentação, floculação, coalescência e maturação de Ostwald, porém, elas ainda apresentam a difusão como um processo que pode ocasionar sua ruptura. A FIGURA 8 ilustra como ocorre a difusão e também a coalescência nas emulsões múltiplas, evidenciando que a mesma acontece tanto para as gotas de água quanto as de óleo. Os glóbulos de óleo são permeáveis a diferentes espécies químicas permitindo, em muitos casos, a migração da fase interna para a externa ou vice-versa, com ou sem o rompimento da barreira que separa as fases (PAYS et al., 2002; MCCLEMENTS et al., 2007; DICKINSON, 2011).

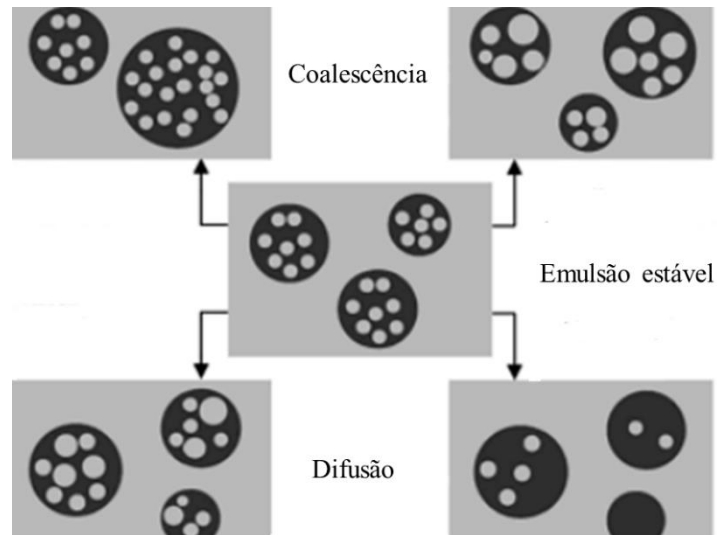


FIGURA 8: INSTABILIDADE EM EMULSÕES MÚLTIPLAS  
 FONTE: ADAPTADO DE ASERIN (2008)

A difusão entre as fases aquosas ocorre devido a diferença de pressão osmótica entre as fases. Naturalmente a fase aquosa externa apresenta maior pressão osmótica comparada à fase interna, devido seu maior conteúdo, sendo assim, a presença de pequena quantidade de sal na fase aquosa interna pode ser responsável por equilibrar o balanço osmótico, como mostra o trabalho de Rosano et al. (1998), evitando a quebra prematura da emulsão. Porém, se houver uma grande quantidade de sal e, como consequência, uma alta pressão osmótica na fase aquosa interna, a água da fase externa passará para dentro da fase aquosa interna, produzindo um inchaço destas gotículas (*swelling*), o que pode levar ao posterior rompimento e liberação do seu conteúdo. O contrário também ocorre, se a pressão da fase aquosa externa for maior, haverá a difusão da água da fase aquosa interna para a externa (*shrinkage* ou *water leakage*). Se este desequilíbrio osmótico for alto a difusão se torna rápida o suficiente ao ponto de romper as gotas de óleo, liberando a fase aquosa encapsulada, a qual será dispersa instantaneamente na fase aquosa externa (JIAO; BURGESS, 2008).

### 3.4.2 Metodologia para formação de emulsões múltiplas

Emulsões do tipo  $A_1/O/A_2$  são normalmente formadas usando o procedimento de duas etapas, como mostrado na FIGURA 9. O primeiro passo é obter a emulsão primária  $A_1/O$  pela homogeneização da água e do óleo com um emulsificante solúvel em óleo, em seguida, a emulsão

múltipla  $A_1/O/A_2$  é obtida pela homogeneização de  $A_1/O$  em uma solução aquosa contendo um emulsificante solúvel em água (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007).

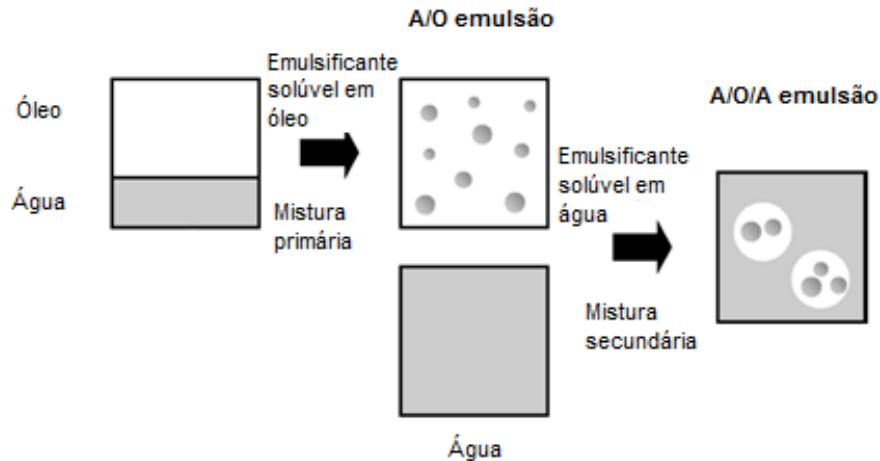


FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE EMULSÃO MÚLTIPLA (A/O/A)  
 FONTE: ADAPTADO DE MCCLEMENTS; DECKER; WEISS (2007)

Os métodos de homogeneização podem ser os mesmos já consagrados para formação de uma emulsão simples, como: misturadores de alto cisalhamento, moinhos coloidais, homogeneizadores de alta pressão, ultrassônicos e de membrana. As condições de homogeneização da segunda etapa devem ser menos intensas que a primeira para evitar o rompimento das gotículas da fase aquosa interna dentro do glóbulo de óleo. O tamanho das gotas de ambas as fases irá variar de acordo com as condições de homogeneização, como o tempo e intensidade, além da influência exercida pelo tipo e concentração do emulsificante. Outro fator que também irá alterar as propriedades da emulsão múltipla é a relação entre as concentrações de água e óleo da emulsão primária ( $A_1/O$ ) e entre a quantidade desta emulsão e da solução aquosa externa (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007).

Existem diversas metodologias para formação de emulsões múltiplas, porém, dentre as metodologias que utilizam o método de duas etapas e misturadores de alta taxa de cisalhamento, podem ser citados os trabalhos apresentados na TABELA 3.

TABELA 3: METODOLOGIAS UTILIZADAS POR DIFERENTES AUTORES PARA FORMAÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA

Autor	Fase aquosa interna	Fase oleosa	A1:O	Preparo emulsão primária	Fase aquosa externa	A1/O:A2	Preparo emulsão múltipla
<b>Pawlik, Cox e Norton (2010)</b>	NaCl	PGPR ao óleo de girassol. Agitação por 5 min	-	10.000 rpm por 10 min. Após o preparo a emulsão foi armazenada a 4-8°C	Glucose e Tween 20. Homogeneização por 5 min.	-	10.000 rpm por 2 minutos
<b>Sapei, Naqvi e Rousseau (2012)</b>	Gelatina (0-10% m/m) e NaCl (0-8% m/m). Hidratação por 30 min. Aquecimento a 65°C por 25 min	6% m/m PGPR ao óleo de canola. Aquecimento a 65°C por 25 min	40: 60 (% m/m)	27.000 rpm por 3 minutos. Após o preparo a emulsão foi armazenada a 4°C	1% m/m de polissorbato 80	20: 80 (% m/m)	10.000 rpm por 2 minutos. A emulsão foi armazenada a 4°C
<b>Iqbal et al. (2013)</b>	20% m/m de isolado proteico de soro de leite	6% m/m PGPR ao óleo de soja. Aquecimento a 50°C	40: 60 (% m/m)	Misturador de alta taxa de cisalhamento por 2 minutos	1% m/m de polissorbato 80	1:1	Mesmo agitador, mas em uma baixa velocidade
<b>Perez-Moral et al. (2015)</b>	1% m/m de alginato	3,5% m/m PGPR ao óleo de girassol	40:60 (% m/m)	18.000 rpm por 30 s. 22.000 rpm por mais 30 s	2% m/m de Lecitina de soja. Homogeneização a 170 rpm a 30°C por 2h	20: 80 (% m/m)	Mesmo agitador, mas em uma baixa velocidade

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS

Uma grande variedade de técnicas analíticas tem sido utilizada para caracterizar as propriedades de emulsões múltiplas. Estas técnicas são fundamentais no monitoramento da emulsão em seus níveis microscópico e macroscópico. Neste sentido, os conhecimentos teóricos são aliados as análises experimentais, fornecendo informações que podem ser utilizadas na pesquisa e desenvolvimento de alimentos com qualidade superior. Dentre as propriedades das emulsões, neste trabalho serão avaliadas: estabilidade, microestrutura, eficiência de encapsulação, calorimetria exploratória diferencial e reologia.

#### 3.5.1 Microestrutura

A partir de algumas técnicas, como a microscopia e o espalhamento de luz dinâmico, é possível obter informações sobre a estrutura, dimensões e organização das gotas que formam as emulsões.

##### 3.5.1.1 Microscopia

A microscopia fornece informações sobre a estrutura das emulsões através de imagens, as quais são de fácil compreensão, além da simplicidade de preparação da amostra e reprodutibilidade.

Teoricamente, o limite mínimo de resolução de um microscópio ótico é de  $0,2 \mu\text{m}$ , porém, abaixo de  $1 \mu\text{m}$ , o movimento Browniano dessas pequenas partículas pode produzir imagens foscas, o que dificulta a utilização desta técnica para estruturas menores que este limite. Todavia, a microscopia fornece informações valiosas da distribuição do tamanho de gotas e a visualização dos fenômenos de floculação e coalescência, o que permite aferir sobre a estabilidade microscópica da emulsão (MCCLEMENTS, 2005).

##### 3.5.1.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A realização da técnica consiste na diluição da amostra em uma concentração apropriada, antes de ser adicionada a uma cubeta de acrílico. O laser de hélio-neônio ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) é direcionado

para a amostra, onde é difratado pelas gotas da emulsão. A intensidade desta luz espalhada é medida como uma função do ângulo de espalhamento, utiliza-se normalmente um único ângulo, o ângulo reto ( $\theta = 90^\circ$ ). A análise da luz espalhada é normalizada para uma função de autocorrelação de primeira ordem (Equação 3) (MURPHY, 1997; MCCLEMENTS, 2005).

$$f(t_D) = \exp(-Dq^2t_D) \quad (3)$$

Onde:

$t_D$ : tempo de decaimento;

$D$ : coeficiente de difusão transacional;

$q$ : vetor de espalhamento, dado pelo Equação 4.

$$q = \frac{4\pi n_{\text{ref}}}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (4)$$

Onde:

$n_{\text{ref}}$ : índice de refração do solvente;

$\lambda$ : comprimento de onda da luz incidente.

A técnica de DLS permite avaliar o tamanho de partículas pela obtenção do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) calculado através do valor do coeficiente de difusão transacional ( $D$ ) utilizando a Equação de Stokes-Einstein (Equação 5).

$$D = \frac{kT}{6\pi\mu R_h} \quad (5)$$

Sendo:

$k$ : constante de Boltzman;

$T$ : temperatura absoluta;

$\mu$ : viscosidade do meio.

Estas relações são aplicadas para esferas monodispersas com tamanhos de partículas inferiores ao comprimento de onda do raio incidente. Para partículas maiores ou polidispersas a função de autocorrelação é dada pela soma das contribuições de vários tamanhos de partículas e modos de difusão, sendo a interpretação de  $D$  menos direta (MURPHY, 1997).

A técnica de DLS permite a obtenção da distribuição do tamanho de gota (DTG) das emulsões. Para analisar as DTGs é aplicado o cálculo de diâmetro equivalente  $D_{4,3}$  ( $\mu\text{m}$ ), conhecido como diâmetro médio volumétrico ou diâmetro médio de Brouckere, obtido pela Equação 6 e o índice de dispersão, ou *span*, obtido pela Equação 7.

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (6)$$

Sendo  $n_i$  a fração de partículas correspondentes às gotas de diâmetro  $d_i$  ( $\mu\text{m}$ ).

$$\text{span} = \frac{D(v, 0,9) - D(v, 0,1)}{D(v, 0,5)} \quad (7)$$

Nesta última equação  $D$  corresponde aos diâmetros de diferentes percentis da amostra, sendo assim,  $D(v,0,9)$ ,  $D(v,0,1)$  e  $D(v,0,5)$  indicam que 90%, 10% e 50%, respectivamente, da amostra possui gotas menores que estes diâmetros.

### 3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de DSC mede a quantidade de energia necessária para estabelecer uma diferença de temperatura nula entre a amostra e o material de referência, os quais passarão por aquecimento ou resfriamento a uma taxa controlada. Sendo assim, para manter as duas panelas, onde ficam as amostras, na mesma temperatura, uma quantidade de energia equivalente deve ser fornecida para a amostra ou para a referência. Os dados obtidos pelo DSC fornecem informações sobre a quantidade de energia absorvida (endotérmico) ou liberada (exotérmico) pela amostra em função da temperatura, podendo ser correlacionadas a alterações físico-químicas que ocorrem na amostra (MCCLEMENTS, 2005).

Para emulsões múltiplas, o DSC irá fornecer a curva com os fluxos de calor correspondentes a cristalização da água presente na fase aquosa interna e externa. Por isso são esperados a formação de dois picos, como mostra a FIGURA 10. Sendo o maior pico correspondente a água da fase aquosa externa e o menor da fase aquosa interna.

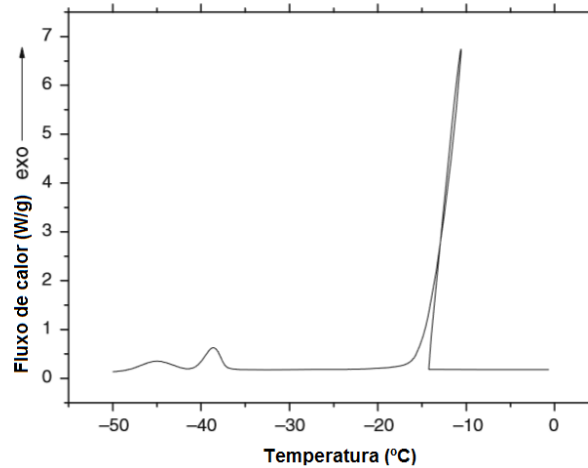


FIGURA 10: CURVA TÍPICA DE DSC PARA EMULSÕES  $A_1/O/A_2$   
 FONTE: ADAPTADO DE SCHUCH, KÖHLER E SCHUCHMANN (2013)

O calor latente de congelamento ( $\Delta h_c$ ) é obtido através da quantidade de calor ( $\Delta H$ ), dada pela área dos picos, e pela quantidade de massa da amostra ( $m$ ) utilizada na análise, a partir da Equação 8.

$$\Delta h_c = \frac{\Delta H}{m} \quad (8)$$

A técnica de DSC também pode ser utilizada para determinar a eficiência de formação da emulsão múltipla após preparação, como mostra o trabalho realizado por Oppermann et al. (2015). Esta eficiência, ou fração da fase aquosa interna retida na emulsão primária (FR), é obtida através da relação entre a quantidade de água presente na fase aquosa interna da emulsão múltipla com a quantidade de água dispersa, originalmente incorporada, na emulsão primária, como demonstra a Equação 9.

$$FR = \frac{m_{A_1/O/A_2}}{m_{A_1/O}} = \frac{\frac{\Delta H_{A_1/O/A_2}}{X_{A_1/O/A_2}}}{\frac{\Delta H_{A_1/O}}{X_{A_1/O/A_2}}} \quad (9)$$

Sendo:

$m_{A_1/O/A_2}$ : massa de água presente na fase aquosa interna da emulsão múltipla;

$m_{A_1/O}$ : massa de água dispersa na fase oleosa da emulsão primária;

$\Delta H_{A_1/O/A_2}$ : variação de entalpia referente à cristalização da água presente na fase aquosa interna da emulsão múltipla;

$\Delta H_{A_1/O}$ : variação de entalpia referente à cristalização da água dispersa na fase oleosa da emulsão primária;

$x_{A_1/O/A_2}$ : fração mássica da fase aquosa interna na emulsão múltipla;

$x_{A_1/O}$ : fração mássica da fase aquosa na emulsão primária.

### 3.5.3 Reologia

O estudo da reologia dos alimentos é essencial para a aceitabilidade dos mesmos, compreendendo uma diversa área de aplicação dentro da indústria: projeto de equipamentos, formulação de produtos, controle de qualidade, tempo de vida de prateleira, avaliação da textura e sua influência na percepção sensorial. Em especial, a reologia de emulsões, as quais possuem vasta aplicação em produtos alimentícios, sempre foi muito estudada pelos cientistas tanto do ponto de vista teórico quanto experimental, motivados muitas vezes pelo interesse industrial. A abordagem clássica da reologia se aplica também as emulsões, porém elas possuem algumas peculiaridades, pois fatores como fração e viscosidade da fase dispersa, distribuição do tamanho de gota e o filme interfacial produzido pela adição de emulsificantes irão gerar características distintas nos parâmetros de fluxo (STEFFE, 1996; TADROS, 1994).

De modo geral, a reologia mede a deformação de um corpo sob a influência de uma tensão, podendo este corpo ser sólido, líquido ou gasoso. Mas ao contrário dos sólidos ideais, nos fluidos ideais (líquidos e gases) a deformação é irreversível, pois o resultado da aplicação de uma tensão sobre eles é o escoamento. A deformação de fluidos pode ser realizada de três modos distintos: cisalhamento, extensão e compressão. O cisalhamento é o mais comum, mas todos eles podem ser realizados utilizando testes estacionários ou dinâmicos. A reologia em estado estacionário é definida desta maneira pois os ensaios de tensão e deformação são realizados com velocidade angular constante, ao contrário do que ocorre na reologia dinâmica com deformação oscilatória (STEFFE, 1996).

### 3.5.3.1 Reologia em estado estacionário

A reologia em estado estacionário segue a lei básica da viscosimetria, determinada empiricamente por Newton, dada pela Equação 10 (BIRD et al., 2002).

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (10)$$

$\tau$ : tensão de cisalhamento (Pa)

$\mu$ : viscosidade (Pa.s)

$\dot{\gamma}$ : taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ )

A relação entre a tensão e taxa de cisalhamento irá definir o comportamento do fluido. A disposição gráfica dessas grandezas irá produzir a denominada curva de fluxo (FIGURA 11) ou a curva de viscosidade (FIGURA 12).

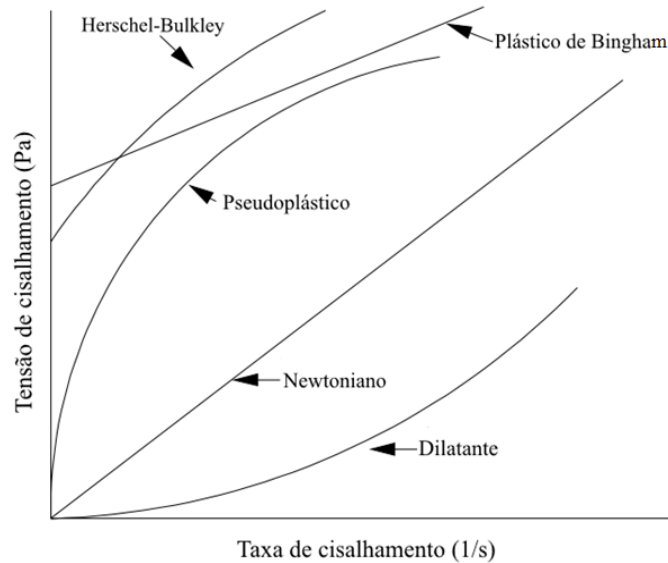


FIGURA 11: CURVAS DE FLUXO PARA DIFERENTES TIPOS DE FLUIDOS  
 FONTE: ADAPTADO DE STEFFE (1996)

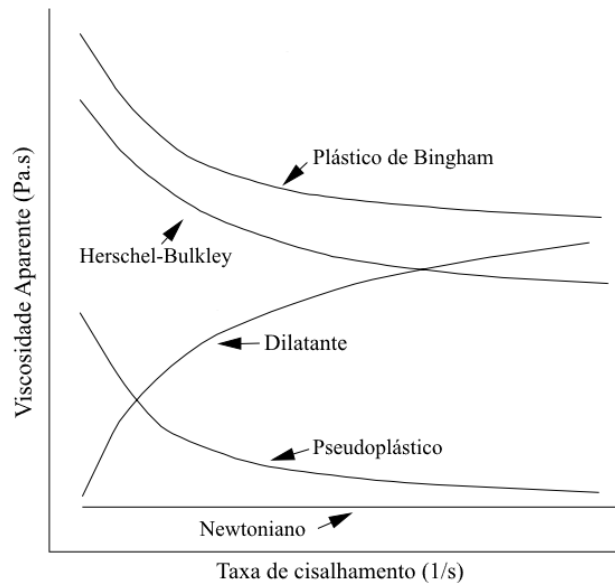


FIGURA 12: CURVAS DE VISCOSIDADE PARA DIFERENTES TIPOS DE FLUIDOS  
 FONTE: ADAPTADO DE STEFFE (1996)

Como mostrado na FIGURA 11, a curva de fluxo para um fluido Newtoniano, apresenta uma linha reta, desde a origem, com uma dada inclinação. Este ângulo de inclinação é constante e correspondente a viscosidade do material. Sendo assim, fluidos Newtonianos não alteram sua viscosidade com o aumento da tensão e da taxa de cisalhamento para uma dada temperatura, devido a este comportamento, os mesmos são chamados de fluidos ideais. Porém, nem todos os fluidos apresentam este comportamento, estes são chamados, por consequência, fluidos não Newtonianos (SCHRAMM, 2000).

Dentre os fluidos não Newtonianos, os materiais descritos como Plástico de Bingham e de Herschel-Bulkley apresentam uma tensão inicial, ou seja, a tensão mínima sob a qual o fluido deve ser exposto para início do fluxo. O comportamento pseudoplástico é definido pelo decaimento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, ao contrário do que ocorre com os dilatantes (STEFFE, 1996; SCHRAMM, 2000).

Estes materiais são representados por modelos matemáticos, que visam descrever seu comportamento reológico através do ajuste de curvas. Estes modelos também são aplicados na indústria, pois facilitam a identificação do produto e seu controle de qualidade. Alguns dos modelos reológicos, dentre muitos que existem, estão dispostos na TABELA 4, contendo as Equações 11, 12 e 13 (BARNES et al., 1989; SCHRAMM, 2000).

TABELA 4: MODELOS REOLÓGICOS PARA AJUSTE DE CURVAS DE FLUXO

Modelo	Equação	
Ostwald-De-Waele (Lei da potência)	$\tau = k_{ow}(\dot{\gamma})^n$	(11)
Herschel-Bulkey	$\tau = \tau_0 + k_{hb}(\dot{\gamma})^n$	(12)
Casson	$\tau^{0,5} = k_0 + k_{cs}(\dot{\gamma})^{0,5}$	(13)

$k_{ow}$ ,  $k_{hb}$  e  $k_{cs}$ : índices de consistência;

$\tau_0$ : tensão de cisalhamento inicial (Pa);

$k_0$ : constante de Casson;

$n$ : índice de comportamento dos modelos.

Além da classificação apresentada anteriormente, estes mesmos fluidos podem ser ordenados com relação a sua dependência ao tempo, entre independentes ou dependentes do tempo. Ao contrário dos fluidos que não apresentam alterações do comportamento reológico com o tempo, os dependentes exibem diminuição (tixotrópicos) ou aumento (reopéticos) da tensão de cisalhamento, ou da viscosidade aparente, com o decorrer do tempo, para dada taxa de cisalhamento, como mostrado na FIGURA13. Estas alterações podem ser reversíveis ou não. (BARNES et al., 1989)

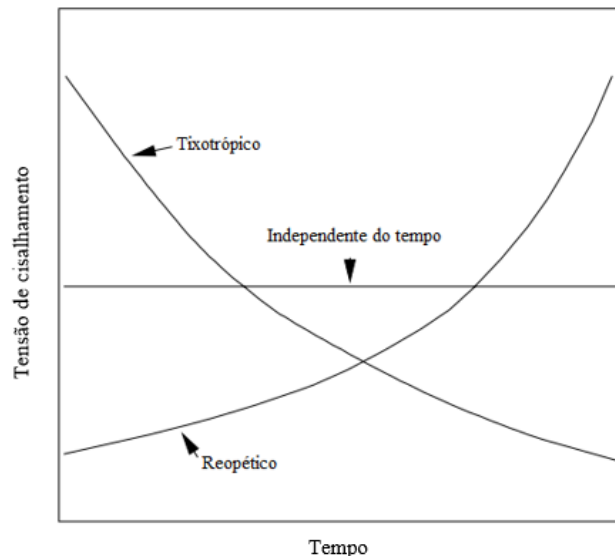


FIGURA 13: COMPORTAMENTO REOLÓGICO DOS FLUIDOS DEPENDENTES DO TEMPO  
 FONTE: ADAPTADO DE STEFFE (1996)

### 3.5.3.2 Reologia em estado dinâmico (ensaios oscilatórios)

As análises reológicas estáticas utilizam movimentos rotacionais que podem afetar a estrutura das emulsões, quebrando sua barreira interfacial. Deste modo, uma alternativa é utilizar o movimento oscilatório, o qual deve ser pequeno suficiente para não quebrar nenhuma estrutura.

Esta tensão oscilatória, de amplitude conhecida é aplicada e é medida a deformação causada. A relação entre a tensão e a deformação é mostrada na FIGURA 14 (JIAO; BURGESS, 2008).

Outra vantagem do teste oscilatório é determinar o comportamento viscoelástico, definição reológica para fluidos que apresentam tanto o comportamento líquido (viscoso) quanto o sólido (elástico). A viscoelasticidade é observada principalmente em fluidos onde ocorrem interação entre cadeias moleculares longas (STEFFE, 1996; SCHRAMM, 2000).

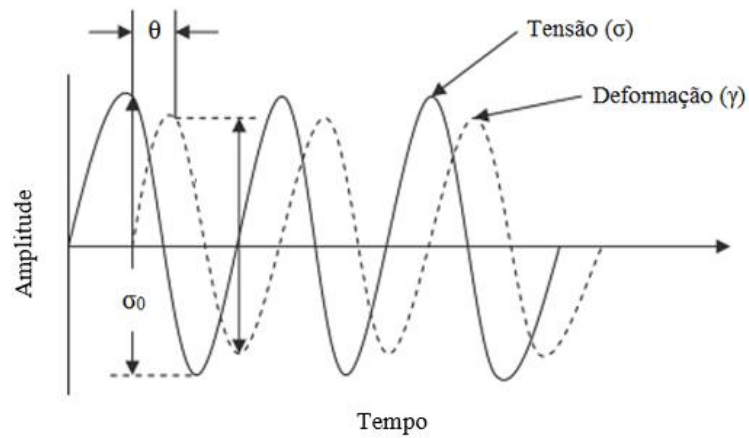


FIGURA 14: RELAÇÃO ENTRE A TENSÃO E A DEFORMAÇÃO PARA UM TESTE OSCILATÓRIO  
 FONTE: ADAPTADO DE JIAO; BURGESS (2008)

O módulo viscoelástico, ou módulo complexo,  $G^*$ , é dado pela Equação 14.

$$G^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \quad (14)$$

Sendo:

$\sigma_0$ : amplitude da tensão;

$\gamma_0$ : amplitude da deformação.

O módulo viscoelástico pode ser dividido em outros dois módulos (Equação 15).

$$G^* = G' + G'' \quad (15)$$

Sendo:

$G'$ : módulo de armazenamento;

$G''$ : módulo de perda.

O módulo de armazenamento ( $G'$ ) indica a presença de um estoque temporário de energia durante o teste, recuperada posteriormente, este termo representa o caráter elástico da amostra. Já o módulo de perda ( $G''$ ) representa a perda irreversível da energia utilizada para início do fluxo (SCHRAMM, 2000). Estes módulos são funções da frequência, podendo também ser expressos em termos da amplitude e da mudança de fase ( $\delta$ ), como mostra as Equações 16 e 17.

$$G' = \left( \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cos \delta \quad (16)$$

$$G'' = \left( \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \sen \delta \quad (17)$$

Desta forma, outra maneira utilizada para descrever o comportamento viscoelástico é através da Equação 18, pois relaciona diretamente perda e o armazenamento de energia.

$$\tan \theta = \frac{G''}{G'} \quad (18)$$

A determinação da viscoelasticidade de um material consiste numa varredura de frequência, dada uma tensão constante. Este é o método mais comum de teste oscilatório pois mostra a variação simultânea do comportamento elástico e viscoso com o aumento da frequência. Varreduras de frequência são muito úteis na comparação de diferentes produtos alimentícios ou na comparação do efeito de vários ingredientes e processos de tratamento na viscoelasticidade (HAMINIUK, 2007).

#### 3.5.4 Estabilidade macroscópica

A estabilidade visual de uma emulsão é definida quando não há separação visível de fases com o tempo, com a ocorrência da separação pode-se afirmar que houve a quebra da emulsão. A separação de fases pode ser acompanhada naturalmente com o decorrer do tempo. A quantidade de *creaming* ou separação de fases observado fornece informações sobre o grau de estabilidade da emulsão e a eficiência do emulsificante (MCCLEMENTS, 2005).

### 3.5.5 Eficiência de encapsulação

Uma das principais aplicações das emulsões múltiplas é a encapsulação de compostos, sendo assim, a eficiência de encapsulação, ou em alguns casos, a liberação dos compostos encapsulados, é uma técnica muito adotada no estudo deste tipo de emulsão. Entre os estudos que realizaram esta análise pode-se citar alguns, contidos na TABELA 5.

TABELA 5: ESTUDOS REALIZADOS UTILIZANDO EMULSÕES MÚLTIPLAS PARA ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS

<b>Autor</b>	<b>Compostos encapsulados</b>	<b>Técnica</b>
Rodríguez-Huezo et al. (2004)	Oleoresinas de pimenta vermelha (carotenoides)	Espectrofotometria
Fechner et al. (2007)	Vitamina B <sub>12</sub>	Espectrofotometria
Benichou et al. (2007)	Glucose	Glucometria
Lutz et al. (2009)	Ascorbato de sódio e Cloreto de sódio	Condutivimetria
Bonnet et al. (2009)	Cloreto de magnésio	Absorção atômica de chama
Sapei et al. (2012)	Cloreto de sódio	Condutivimetria
Matos et al. (2015)	Resveratrol e Vitamina B <sub>12</sub>	RP-HPLC/UV-Vis

Neste trabalho, assim como Lutz et al. (2009) e Sapei et al. (2009), foi adicionado NaCl na fase aquosa interna e acompanhado a liberação do mesmo para fase aquosa externa através de análises de condutividade elétrica. Esta técnica é simples e fornece rapidamente bons resultados que permitem avaliar a liberação do conteúdo salino, verificando a eficiência de encapsulação da emulsão formada.

### 3.6 FASE OLEOSA

A fase oleosa é muito importante para a estabilidade da emulsão múltipla, pois quanto menor for sua solubilidade em água, menor será a difusão entre as fases aquosas interna e externa. De modo geral os óleos minerais produzem emulsões mais estáveis, já que são mais apolares comparados aos óleos vegetais, porém, para aplicações em emulsões com grau alimentício, os óleos vegetais são aplicados predominantemente (GARTI, 1997).

Neste trabalho foi utilizado óleo de abacate como fase oleosa, o qual possui características muito importantes do ponto de vista nutricional.

### 3.6.1 Óleo de abacate

México, República Dominicana, Nova Zelândia, Chile, Estados Unidos e África do Sul, são os principais produtores de abacate. Esta fruta possui ampla adaptação a diferentes condições de solo, porém seu cultivo se dá em zonas de clima tropical e subtropical. A participação brasileira no mercado mundial ainda é muito restrita, principalmente pela baixa produtividade e qualidade dos frutos. Isto decorre da falta de condições adequadas de manejo, de assistência técnica especializada, de problemas de logística ao longo da cadeia de comercialização e de uma política nacional para a expansão da cultura. Além disto, os hábitos alimentares do brasileiro são muito restritivos com relação ao consumo desta fruta (TANGO; TURATTI, 1992; SILVA; CANTUARIAS-ÁVILES, 2014)

Com a intensificação das pesquisas sobre esta fruta na última década, o Brasil possui grande potencial de expansão do abacate tanto no mercado interno como no externo, mas para que isso se concretize em médio prazo, é preciso desenvolver campanhas internas de marketing para divulgação de novos modos de consumo da fruta (SILVA; CANTUARIAS-AVILÉS, 2014).

Por apresentar alto valor nutricional, o abacate tem sido aproveitado para outras aplicações, como a produção de óleos comerciais, sendo uma das possibilidades de expansão do seu consumo. Os frutos do abacateiro possuem elevados teores de matéria graxa na polpa, constituindo-se em uma matéria prima de interesse para a extração de óleo. O principal obstáculo para obtenção do óleo é o teor de umidade, que na polpa fresca varia de 64 a 85%, afetando o rendimento de extração, a qualidade do óleo e o seu custo de produção. A elevada proporção de casca e caroço também encarecem o custo de transporte (TANGO; TURATTI, 1992).

O óleo de abacate pode ser usado como um ingrediente funcional devido sua alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados, além de quantidades significativas de compostos benéficos, como as vitaminas lipossolúveis (A, D e E) e fitoesteróis. O óleo de abacate caracteriza-se por apresentar teores elevados dos ácidos graxos monoinsaturados: oléico e palmitoléico, sendo o último não encontrado, ou em pequenas quantidades em outros óleos. Entre os principais triacilgliceróis componentes deste óleo também estão o linoléico e o linolênico, além de teor relativamente elevado do ácido graxo saturado palmítico e menor conteúdo do ácido esteárico (saturado). A proporção dos diferentes ácidos graxos no óleo de abacate de uma mesma variedade

é influenciada pelo grau de maturação do fruto, pela localização da cultura e pelo clima (TANGO; TURATTI, 1992).

Como mostra a pesquisa realizada por Berasategi et al. (2012) o óleo de abacate apresenta características semelhantes ao óleo de oliva, ambos possuem fitoesteróis, que possuem ação antioxidante, e uma grande fração do ácido graxo moinsaturado oléico. Estes fatores fazem com estes óleos possuam maior estabilidade térmica comparado a outros óleos vegetais. Ainda de acordo com este estudo, o óleo de oliva apresenta quantidade significativamente maior da fração moinsaturada comparada ao óleo de abacate, porém, em contrapartida o óleo de abacate possui quantidade muito maior de fitoesteróis. Outra vantagem apresentada pelo óleo de abacate é que sua menor fração monoinsaturada é compensada pelo maior conteúdo de poliinsaturados, sendo possível destacar a presença de grande quantidade do ácido linoléico (ômega 6), considerado um ácido graxo essencial.

O óleo de abacate possui alto valor comercial, mas ainda é usado principalmente pela indústria farmacêutica e de cosméticos. O aumento da produção poderia incentivar o seu refino e utilização para fins comestíveis. No trabalho apresentado por Danieli (2006) foi desenvolvido um estudo qualitativo e funcional do óleo de abacate para sua utilização como matéria prima na indústria alimentícia. Este ainda sugere sua incorporação para uso comestível como substituto do óleo de oliva, ou mesclar os dois óleos com a finalidade de diminuir custos de importação do azeite de oliva no Brasil.

Há diversos trabalhos em outros países relacionados a formação de emulsão múltipla com fins alimentícios. No Brasil, este tipo de emulsão ainda não é muito estudado, porém há trabalhos como os de Morais (2008) e Pianovski et al. (2008) que tiveram como objetivo formar emulsões múltiplas utilizando como fase oleosa óleo de canola e óleo de pequi, respectivamente. Mas de modo específico, para o óleo de abacate, o mesmo não foi aplicado em pesquisas desse gênero, o que pode ser devido ao fato do mesmo não ser comercializado em larga escala e ainda ser pouco utilizado, diferentemente como acontece com outros exemplares de óleos vegetais.

O presente trabalho apresenta uma alternativa de utilização do óleo de abacate ao incorporá-lo na formação de emulsões múltiplas, além de trazer a caracterização deste sistema.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Para formação das emulsões primárias ( $A_1/O$ ) foi utilizado, como fase oleosa, óleo de abacate comercial refinado (OACR), obtido no comércio local. A fase aquosa interna contém NaCl (adquirido de Neon Reagentes Analíticos, Brasil) e gelatina (sem sabor, em pó e incolor) adquirida no mercado local. Como estabilizante desta emulsão primária foi utilizado o tensoativo lipofílico poliglicerol poliricinoleato – PGPR (SGS Agricultura e Indústria Ltda).

Para formação das emulsões múltiplas ( $A_1/O/A_2$ ), na fase aquosa externa, foram adicionados os tensoativos hidrofílicos Tween 40 (Sigma Aldrich, Estados Unidos) ou Tween 80 (Neon Reagentes Analíticos, Brasil). Para as fases aquosas utilizou-se água deionizada (Permuton DE 3500, Brasil)

### 4.2 MÉTODOS

A seguir é apresentada a metodologia utilizada para caracterização do óleo de abacate comercial refinado (OACR): análises de umidade, densidade, índice de iodo, acidez, teor de fosfolipídeos e perfil de ácidos graxos. São apresentados também o desenvolvimento da metodologia de preparo das emulsões primárias (EPs) e múltiplas (EMs) seguido da descrição das análises realizadas para caracterização das mesmas.

#### 4.2.1 Caracterização do óleo de abacate comercial refinado

##### 4.2.1.1 Umidade

O teor de umidade do óleo de abacate foi medido através de um titulador volumétrico Karl Fischer V30 (Mettler Toledo, EUA) seguindo metodologia proposta pelo IAL (2008). Para solubilização do óleo de abacate em metanol seco, foi utilizado clorofórmio como cossolvente. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.2.1.2 Densidade

A densidade do óleo de abacate refinado foi determinada utilizando o densímetro DMA 5000 M (Anton Paar, Áustria). As medidas foram coletadas em triplicata à temperatura controlada de 25°C.

#### 4.2.1.3 Acidez

A acidez de um óleo é uma medida importante para verificar o estado de conservação do óleo relacionado à presença de ácidos graxos livres. A metodologia seguida para determinação da acidez foi proposta por IAL (2008) que consiste na titulação, com solução alcalina padronizada (hidróxido de sódio), da acidez da amostra contida em uma solução de éter-álcool. O resultado é expresso em gramas de ácido oléico por 100 gramas de amostra. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.2.1.4 Índice de iodo

A análise de índice de iodo foi realizada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). O índice de iodo, que mede a quantidade de insaturações de um óleo, é obtido em número de gramas de iodo absorvido por 100g de amostra. A determinação deste índice foi realizada pelo método de Wijs, segundo procedimento encontrado em IAL (2008). A análise foi realizada em duplicata.

#### 4.2.1.5 Teor de fosfolipídeos

A determinação do teor de fosfolipídeos foi realizada de acordo com a metodologia oficial AOCS Ca 12-55 (2009). Esse método determina o fósforo ou o conteúdo equivalente fosfolipídico através da queima da amostra em presença de óxido de zinco, seguida por medida espectrofotométrica, em comprimento de onda de 650 nm, a qual baseia-se na formação de um complexo ácido fosfomolibdico azul.

#### 4.2.1.6 Perfil de ácidos graxos

A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA). A preparação de metil ésteres de ácidos graxos seguiu metodologia AOCS Ce 2-66 (1997). Os ésteres obtidos foram analisados em cromatógrafo a gás com detector de ionização por chama (CG) Varian® CP3900, com coluna capilar, CPsil 88 (100 m comp. x 0,25 mm d.i. x 0,2 µm espessura do filme), seguindo método oficial AOCS Ce 1F-96 (1998).

#### 4.2.2 Formação da emulsão múltipla

No desenvolvimento da metodologia para formação da emulsão múltipla (EM) foram realizados vários testes preliminares. Na formação da emulsão primária (EP) foram testados previamente outros tensoativos, como o Span 20, Span 80 e Tween 85, em diferentes concentrações e tempos de agitação, porém nenhum dos testes resultou em emulsões do tipo A/O.

A partir da metodologia baseada na pesquisa desenvolvida por Sapei, Naqvi e Rousseu (2011) foram obtidos resultados satisfatórios ao utilizar como tensoativo lipofílico o PGPR e a gelatina como biopolímero, permitindo também a encapsulação do NaCl na fase aquosa interna. Estes testes evidenciaram a eficácia e a reprodutibilidade da metodologia para a formação da EP, a qual é do tipo água em óleo com tamanhos de gotas pequenos (na ordem de 1 µm ou menor), característica importante para manutenção da estabilidade.

Para formação da EP foi testado o efeito da adição de maior quantidade de gelatina na fase aquosa interna e verificado se ela seria eficiente na substituição de parte da quantidade de PGPR. Também foi comparada a utilização do Tween 40 com o Tween 80 (tensoativos hidrofílicos) na formação da EM e seu comportamento em diferentes temperaturas de armazenagem (4 e 25°C).

Deste modo, o preparo das emulsões múltiplas foi baseado na metodologia de planejamento de experimentos, apresentado na TABELA 6, seguindo um plano fatorial 2<sup>3</sup>, tendo como fatores: tipo de emulsão primária, tipo de tensoativo hidrofílico e temperatura, avaliados em dois níveis, (+1) e (-1).

Mantendo a concentração de PGPR e gelatina em 9%, a emulsão primária Tipo I (EP01) possui 6% de PGPR e 3% de gelatina (nível +1) e a emulsão primária Tipo II (EP02) diminui a concentração de PGPR para 5% e substitui por gelatina, aumentando sua quantidade para 4% (nível

-1). Teste anterior para formação da emulsão primária contendo 4% de PGPR e 5% de gelatina não formou emulsão A/O.

Para determinar a concentração de tensoativo hidrofílico na formação da EM foi avaliada a aplicação do Tween 40 na fase aquosa externa, testando duas concentrações: 1 e 2% (m/m), para a EP01. Foi verificada a influência da quantidade superior deste tensoativo na maior estabilidade da emulsão múltipla, definindo a concentração em 2% (m/m). Para comparar o Tween 40 (nível +1) com o Tween 80 (nível -1) foi utilizado a mesma concentração de ambos no preparo de todas as amostras.

Nas caracterizações que se fizeram pertinentes foi estudada a influência da temperatura de armazenamento na manutenção da estabilidade das emulsões múltiplas, também avaliados em dois níveis, a 4°C (nível -1) e a 25°C (nível +1).

TABELA 6: PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA PREPARO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS

Amostra	Identificação	PGPR (%)	Gelatina (%)	Tipo emulsão primária	Tipo tensoativo hidrofílico	Temperatura (°C)
1	EM014004	6	3	I	Tween 40	4
2	EM014025	6	3	I	Tween 40	25
3	EM018004	6	3	I	Tween 80	4
4	EM018025	6	3	I	Tween 80	25
5	EM024004	5	4	II	Tween 40	4
6	EM024025	5	4	II	Tween 40	25
7	EM028004	5	4	II	Tween 80	4
8	EM028025	5	4	II	Tween 80	25

A identificação das amostras foi gerada a partir da nomenclatura EM, caracterizando as amostras como emulsões múltiplas, seguida do código 01 ou 02, diferenciando-as em relação ao tipo de emulsão primária. Os valores seguintes, 40 ou 80, identificam qual emulsificante foi utilizado, Tween 40 ou Tween 80, respectivamente, e, por fim, 04 ou 25 indica a temperatura de armazenamento da amostra. Para os ensaios de microscopia e DLS realizados 24 horas após o preparo da amostra, os quais ocorreram antes da separação e armazenamento das amostras nas temperaturas distintas, bem como a análise de DSC, onde há uma rampa de temperatura, na nomenclatura das emulsões, foi suprimido o último código referente as temperaturas de 4 e 25°C, já que não são aplicáveis nestes casos.

O método de preparo das EMs está apresentado de modo esquemático na FIGURA 15. A metodologia pode ser dividida em quatro etapas, a Etapa I corresponde a preparação das fases aquosa interna e oleosa, a Etapa II consiste na formação da emulsão primária, a Etapa III é a

preparação da fase aquosa externa e, por fim, a Etapa IV é a preparação da emulsão múltipla. Todas as concentrações são mássicas e as concentrações dos aditivos das fases aquosas e oleosa são em relação a quantidade de água e óleo, respectivamente. Todas as amostras foram caracterizadas a fim de comparar as formulações distintas.

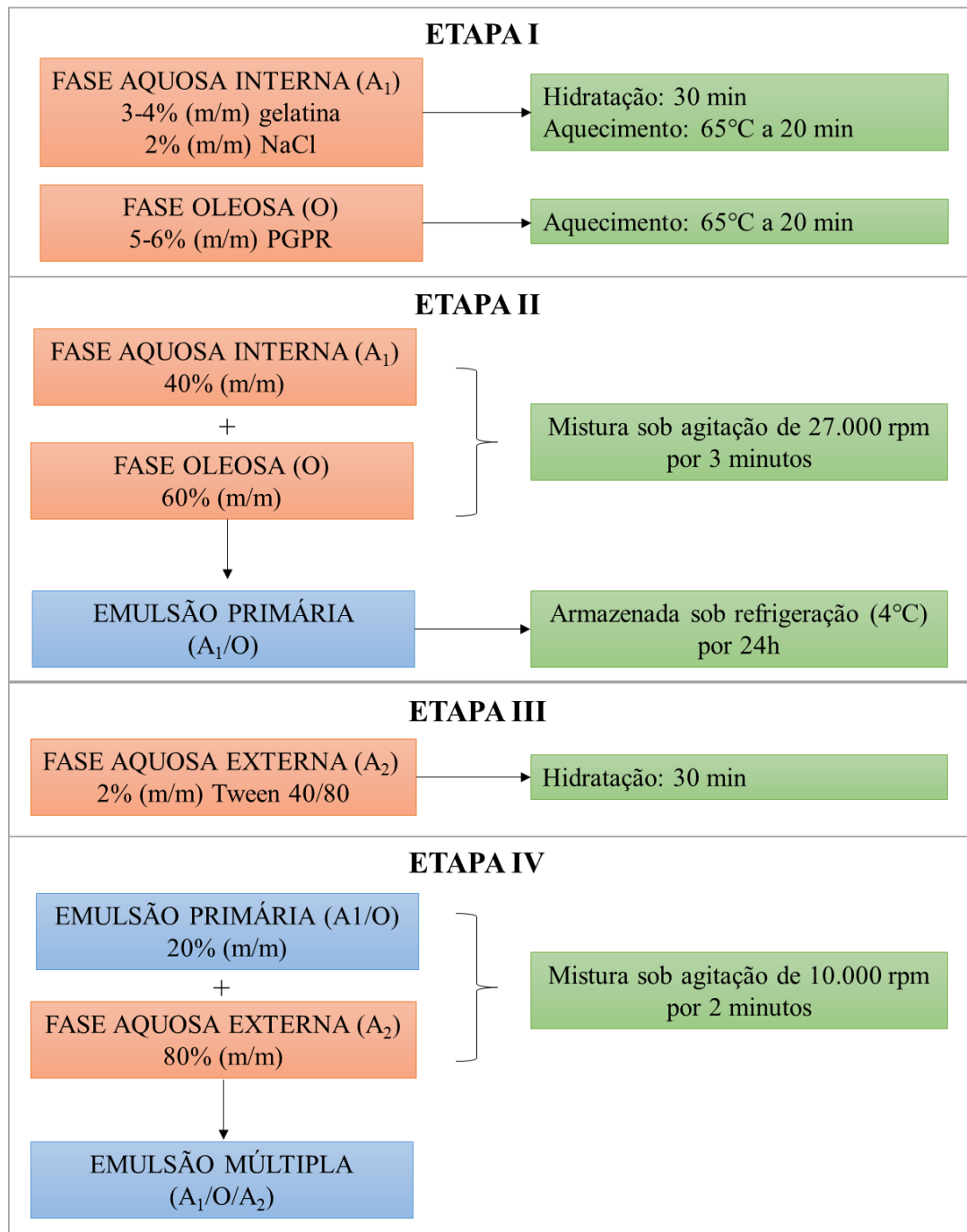


FIGURA 15: METODOLOGIA PARA FORMAÇÃO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS  $A_1/O/A_2$  UTILIZANDO ÓLEO DE ABACATE.

### 4.2.3 Caracterização das emulsões múltiplas

#### 4.2.3.1 Microscopia

Para avaliar as características das emulsões formadas foram realizadas análises de microscopia óptica, utilizando o microscópio invertido Zeiss Axio Observer D1 (Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e o *software* AxioVision para aquisição das imagens.

Foram obtidas imagens 24 horas e 2 semanas após o preparo das emulsões para duas temperaturas de armazenamento ( $4 \pm 1$  °C e  $25 \pm 1$  °C).

#### 4.2.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Foi determinada a distribuição de tamanho de gota (DTG) para as emulsões múltiplas, através da técnica de DLS após 24 horas. Estas amostras foram separadas e armazenadas à temperatura ambiente de  $25 \pm 1$  °C e sob refrigeração ( $4 \pm 1$  °C). Após o período de duas semanas foi realizada novamente a DLS para verificar a influência do tempo e temperatura de armazenagem.

A DTG foi dada pelo equipamento de espalhamento dinâmico de luz, DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, EUA). O preparo de cada amostra consistiu em sua diluição (250x) em água deionizada, a qual possui índice de refração de 1,333. O laser do equipamento é de hélio-neônio com comprimento de onda de 662,690 nm. As medidas foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) seguiu metodologia proposta por Schuch, Köler e Schuchmann (2013). O calorímetro utilizado foi o DSC 8500 (Perkin Elmer, EUA), nele as amostras entre 8 e 12 mg foram adicionadas em uma panela de alumínio, as quais foram hermeticamente fechadas e introduzidas no equipamento. As amostras permaneceram a 10 °C durante 5 minutos, após este período se deu início a rampa de resfriamento até -60 °C a uma taxa de  $-2,5$  °C.min<sup>-1</sup>. Ao alcançar -60 °C o sistema se manteve nesta temperatura por 1 minuto.

#### 4.2.4 Reologia

Foram realizadas análises de reologia em estado estacionário e oscilatório utilizando o reômetro Haake RS1, com controle de temperatura através de um banho termo circulante Haake (DC30) e sensor com geometria cone-plana de 60 mm e ângulo de 2°. Todo o sistema estava acoplado ao *software Haake Rheometer*. Após a amostra ser colocada no reômetro manteve-se em repouso por 5 minutos. Foram obtidas as curvas de fluxo e viscosidade, variando a taxa de cisalhamento de 0,5 a 500 s<sup>-1</sup> com aquisição de 100 pontos. Estas análises foram realizadas em duplicata nas temperaturas de 4 e 25 °C. Para determinação da região viscoelástica linear foi realizada a varredura de tensão, na frequência de 0,5 Hz, com variação de tensão entre 0,01 até 100 Pa. Os ensaios de varredura de frequência foram feitos em deformação oscilatória de 0,1 até 10 Hz. Estas análises foram realizadas em triplicata nas temperaturas de 4 e 25 °C.

##### 4.2.4.1 Separação das fases

A separação das fases fornece informações sobre a estabilidade macroscópica das emulsões múltiplas. A mesma foi verificada adicionando 10 mL de cada emulsão em tubo de vidro cônico graduado. Foram observados os volumes de fase separada, para o período de 20 dias após o preparo, para as temperaturas controladas de 4 ± 1 °C e 25 ± 1 °C. A análise foi realizada em duplicata.

A estabilidade quanto à separação das fases (ES) foi calculada a partir da Equação 19.

$$ES (\%) = \left( \frac{v_o - v_f}{v_o} \right) \cdot 100 \quad (19)$$

Sendo  $v_o$  o volume inicial da emulsão e  $v_f$  o volume de fases separado.

##### 4.2.4.2 Eficiência de encapsulação

O NaCl liberado da fase aquosa interna para a fase aquosa externa foi quantificado através de medidas de condutividade utilizando o condutímetro GC 1800 (Gehaka, Brasil). A condutividade das emulsões múltiplas foi medida em função do tempo, para isso alíquotas de 20

mL de cada emulsão, uma armazenada à temperatura de  $25 \pm 1$  °C e outra à  $4 \pm 1$  °C, foram analisadas pelo período de 20 dias. A análise foi realizada em duplicata.

A eficiência de encapsulação pode ser calculada através da relação apresentada pela Equação 20.

$$EE (\%) = 100 - \frac{S_i}{ST} \cdot 100 \quad (20)$$

Onde  $S_i$  é a concentração de NaCl liberado no tempo específico e  $ST$  é a concentração total de NaCl adicionado para formação da emulsão.

As medidas de salinidade, ou concentração de sal, foram obtidas através de uma curva de calibração, na qual relaciona quantidades conhecidas de NaCl, em solução aquosa, com sua condutividade correspondente.

#### 4.2.4.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* STATISTICA 10.0 (StatSoft, USA), adotando um intervalo de confiança ao nível de 95% de probabilidade. Foram avaliados se havia diferenças significativas entre o diâmetro médio das gotas, o volume de separação de fases e a eficiência de encapsulação para todas as amostras de emulsões múltiplas, relacionando os fatores: tipo emulsão primária, tipo de tensoativo hidrofílico e temperatura. Para aqueles que apresentaram diferenças significativas foi realizado teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A partir dos parâmetros de fluxo, retirados da análise de reologia, também foi obtido um modelo estatístico relacionando os fatores e a interação entre eles tendo como resposta a viscosidade das emulsões.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO ÓLEO DE ABACATE

Os resultados das análises de umidade, teor de fosfolipídeos, índice de iodo, acidez e pH para o OACR estão na TABELA 7.

TABELA 7: TEOR DE UMIDADE, DENSIDADE, ACIDEZ, TEOR DE FOSFOLIPÍDEOS E ÍNDICE DE IODO DO OACR

<b>Teor de umidade (%)</b>	0,10 ± 0,00
<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,91 ± 0,00
<b>Acidez (g ác. oléico/100 g amostra)</b>	0,34 ± 0,04
<b>Teor de fosfolipídeos (%)</b>	0,01
<b>Índice de iodo (g I<sub>2</sub>/100 g amostra)</b>	104,20

O valor de umidade encontrado está de acordo com o especificado pela Normativa 49, de 22 de dezembro de 2006, para óleos vegetais refinados, a qual deve ser igual ou inferior a 0,1% (m/m). O valor de acidez encontrado é baixo, o que garante que o óleo possui pequena quantidade de ácidos graxos livres e, portanto, está em bom estado de conservação. Além do valor encontrado estar muito próximo ao valor de 0,3% presente no rótulo.

O valor de densidade para o óleo de abacate comercial está dentro da faixa encontrada na literatura, que é de 0,9030 g/cm<sup>3</sup> a 0,9230 g/cm<sup>3</sup> (TANGO; TURATTI, 1992). A Resolução RDC n°482, de 23 de setembro de 1999, não define padrão específico para óleo de abacate, porém admite que para óleos vegetais, a 25 °C, a densidade deve estar entre 0,911 e 0,923 g/cm<sup>3</sup>, faixa na qual se enquadra a amostra em estudo.

Os fosfolipídeos, por serem moléculas anfifílicas, ou seja, possuir afinidade com compostos polares e apolares, apresentam características semelhantes aos tensoativos, como mostra o trabalho desenvolvido Züge (2015). Como a quantidade presente no óleo é muito pequena admite-se não haver interferência na preparação e estabilidade das emulsões. Este óleo de abacate comercial é obtido pelo método de extração aquosa-enzimática, seguido de centrifugação para separação das fases oleosa e aquosa. Neste processo de separação, o fosfolipídeo permanece preferencialmente na fase aquosa, o que explica a baixa quantidade do mesmo no óleo.

O índice de iodo, também segundo a Normativa 49, de 22 de dezembro de 2006, está na faixa de valores que vai desde 6 a 143 g I<sub>2</sub>/100g amostra (método Wijs) para os óleos e gorduras

vegetais contemplados nesta resolução. Esta faixa é muito abrangente pois o índice de iodo fornece a ideia da quantidade de ligações insaturadas presentes nas estruturas moleculares que constituem a amostra, que quanto mais insaturada, maior seu valor. Por exemplo, para o óleo ou gordura de coco, que apresentam maior quantidade de ácidos graxos saturados a faixa de valores do índice de iodo é entre 6 e 11 g I<sub>2</sub>/100 g amostra. O valor obtido para o óleo de abacate foi de 104,2 g I<sub>2</sub>/100 g amostra, este valor está dentro da faixa encontrada para os óleos de milho, arroz, amendoim, algodão e gergelim. No entanto, o limite inferior para os óleos de soja, girassol e canola são maiores que o resultado obtido, isso ocorre porque, nestes óleos há maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, enquanto que no óleo de abacate predomina a fração monoinsaturada, como é visto no item seguinte (5.1.1).

#### 5.1.1 Perfil de ácidos graxos

Os resultados para o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de abacate estão apresentados na TABELA 8.

Comparando os dados obtidos com os da literatura, daqueles ácidos graxos que possuem informação dos intervalos de concentração, os ácidos graxos oléico e linoléico, que juntos correspondem ao maior teor de matéria graxa da amostra (69,8%), estão próximos ou dentro da faixa encontrada pelos outros autores. A divergência dos demais ácidos graxos reforçam a informação de que fatores como espécie do abacate e os métodos de extração influenciam no perfil de ácidos graxos, fato que também pode ser observado na larga faixa de concentrações exibida por alguns autores ao comparar estes fatores.

De modo geral, pode ser afirmado que o óleo de abacate é rico em ácido oléico ( $\omega$ -9) e possui alto conteúdo de ácido linoléico ( $\omega$ -6). Estes ácidos graxos insaturados são associados a benefícios para a saúde humana, como a prevenção de doenças cardiovasculares (ULBRICHT; SOUTHGATE, 1991).

TABELA 8: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PARA O OACR EM ESTUDO COMPARADO AOS DADOS OBTIDOS POR OUTROS AUTORES

Ácido graxo	Concentração obtida (%)				
	OACR estudado <sup>1</sup>	Ortiz-Moreno et al. <sup>2</sup> (2003)	Tango et al. <sup>3</sup> (2004)	Massafera et al. <sup>4</sup> (2010)	Berasategi et al. <sup>5</sup> (2012)
Ácido palmítico (C16:0)	<b>8,269</b>	14,96 – 21,10	14,5 – 35,2	20,73 – 32,54	18,74 ± 0,06
Ácido palmitoleico (C16:1)	<b>0,761</b>	5,88 – 9,90	2,9 – 16,8	8,71 – 11,91	7,98 ± 0,01
Ácido esteárico (C18:0)	<b>1,833</b>	0,48 – 0,72	0 – 0,7	0 – 0,50	0,51 ± 0,00
Ácido oléico (C18:1n9c)	<b>52,904</b>	52,04 – 60,28	37,9 – 65,2	31,76 – 50,30	54,40 ± 0,10
Ácido linoléico (C18:2n6c)	<b>16,896</b>	13,66 – 15,31	9,4 – 21,2	13,49 – 22,88	10,98 ± 0,01
Ácido $\gamma$ -linolênico (C18:3n6)	<b>4,346</b>	-	-	-	0,01 ± 0,00
Ácido $\alpha$ -linolênico (C18:3n3)	<b>0,681</b>	1,44 – 2,07	-	1,76 – 4,05	0,61 ± 0,00
Ácido erúico (C20:1)	<b>0,532</b>	0,00 – 0,14	-	-	0,12 ± 0,00
Ácido docosadienoico (C22:2)	<b>1,767</b>	-	-	-	-
Ácido ligocérico (C24:0)	<b>2,003</b>	-	-	-	-
Ácido eicosapentaenoico (C20:5n3)	<b>2,962</b>	-	-	-	-
Ácido nervônico (C24:1)	<b>4,827</b>	-	-	-	-
Ácido docosahexaenoico (C22:6n3)	<b>2,218</b>	-	-	-	-

<sup>1</sup>Óleo comercial refinado obtido através de extração enzimática.

<sup>2</sup>Óleos extraídos da variedade *P. americana* Mill. Extração por: micro-ondas+prensagem, micro-ondas+hexano, hexano e acetona.

<sup>3</sup>Óleos extraídos de 21 variedades diferentes de abacate. Extração por hexano.

<sup>4</sup>Óleo extraído da variedade Fortuna, Ouro Verde e Princesa. Extração por éter de petróleo

<sup>5</sup>Óleo comercial oriundo da África do Sul. Extração por prensagem a frio.

## 5.2 FORMAÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA

### 5.2.1 Formação da emulsão primária

Nas FIGURAS 16 (a) e 16 (b) são apresentadas as microscopias da EP01 e da EP02. O uso do PGPR como tensoativo lipofílico e da gelatina como biopolímero se mostraram muito eficientes na formação de uma emulsão primária (A<sub>1</sub>/O) fina e homogênea com tamanhos de gota

muito pequenos, na ordem de 1  $\mu\text{m}$  ou menor, em ambos os casos. Su et al. (2006) evidenciaram em seu estudo a possibilidade de sinergia entre o PGPR e caseinato de sódio, pois a adição deste biopolímero na fase aquosa interna reduziu a quantidade do tensoativo sem afetar a estabilidade da emulsão múltipla, este é um dos casos que destacam a eficiência da utilização conjunta do PGPR e de biopolímeros (DICKINSON, 2011).

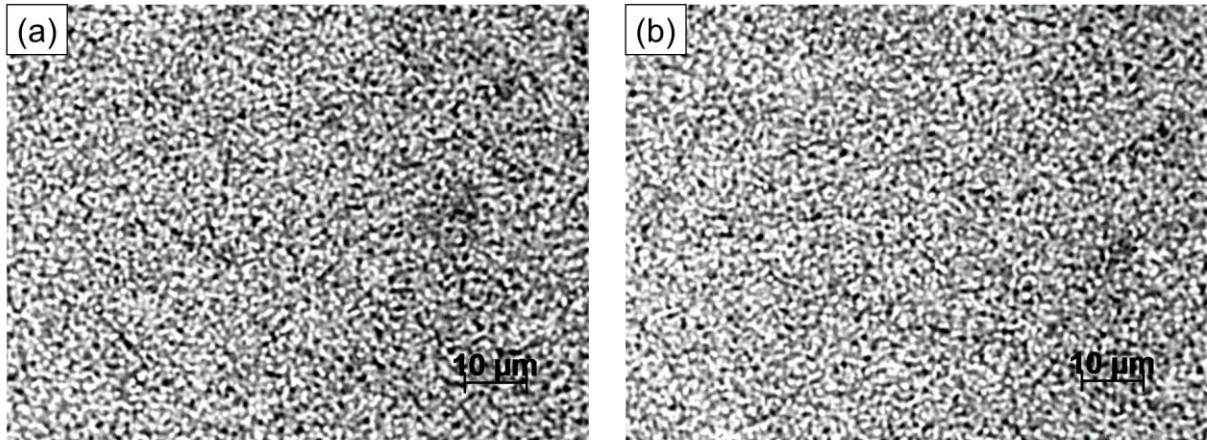


FIGURA 16: MICROSCOPIA EMULSÃO PRIMÁRIA EP01 – 6% DE PGPR E 3% DE GELATINA (a) E EP02 – COM 5% DE PGPR E 4% DE GELATINA (b) COM APROXIMAÇÃO DE 1000X

Em sua pesquisa Perez-Moral et al. (2015) comprova que a geleificação da fase aquosa interna aliada ao uso do PGPR produziu uma emulsão primária com gotas menores (0,4  $\mu\text{m}$ ) comparada a fase aquosa pura. Esta característica estrutural com tamanhos de gotas muito pequenos e também a homogeneidade de sua distribuição irá fornecer maior estabilidade à emulsão múltipla (MUSCHIOLIK, 2007).

### 5.2.2 Efeito da concentração de Tween 40 na formação da emulsão múltipla

A EP01 foi dispersa nas fases aquosas externas constituídas com concentrações diferentes de Tween 40: 1 e 2 % (m/m). As emulsões múltiplas formadas estão mostradas nas FIGURAS 17 (a) e 17 (b).

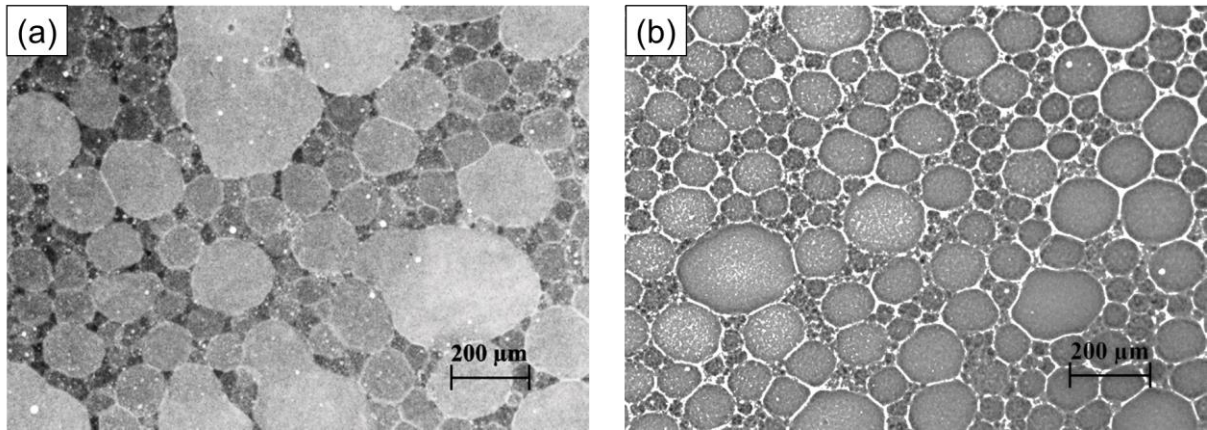


FIGURA 17: MICROSCOPIAS DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS COM APROXIMAÇÃO DE 50X CONTENDO 1% (a) e 2% (b) DE TWEEN 40

Com o aumento da concentração de Tween 40 as gotas de óleo se apresentaram menores e mais definidas. Estas características evidenciam maior estabilidade, pois dificulta a ocorrência de fenômenos como a coalescência e a maturação de Ostwald (MUSCHIOLIK, 2007). O aumento da quantidade de tensoativo também proporciona o aumento da barreira interfacial entre as gotículas. Na microscopia contendo 2% de Tween 40 há uma camada interfacial maior ao redor das gotículas, fazendo com que as mesmas fiquem menos susceptíveis a colisão e a coalescência.

Na emulsão contendo 1% de Tween 40 foi notada a separação das fases ainda no primeiro dia após sua preparação, o que também levou a escolha da utilização de 2% (m/m) de tensoativo.

Nas microscopias das EMs são visualizadas as gotas de  $A_1/O$  dispersas em  $A_2$ . Com a aproximação de 50X é difícil visualizar as gotículas de  $A_1$ , porém com uma maior aproximação, 1000X, como na FIGURA 18, elas são mais claramente identificadas.

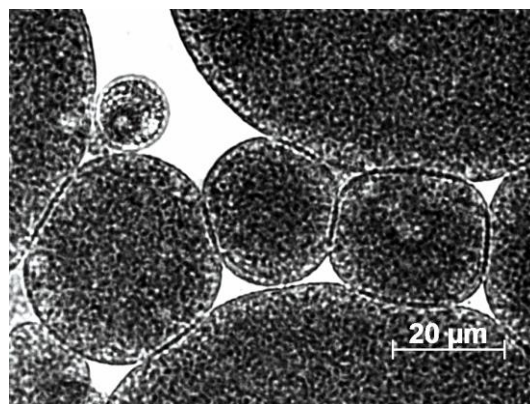


FIGURA 18: MICROSCOPIA EMULSÃO MÚLTIPLA COM APROXIMAÇÃO DE 1000X EVIDENCIANDO AS GOTAS DA FASE AQUOSA INTERNA

### 5.3 MICROSCOPIA E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTA

Nas FIGURAS 19 (a-d) são apresentadas as microscopias das EMs para o tempo de 24 horas após o preparo. Esta análise foi realizada anteriormente à separação e armazenamento das emulsões em diferentes temperaturas, sendo assim, não cabe na nomenclatura destas emulsões o último código característico da temperatura. As FIGURAS 20 (a-d) mostram as microscopias das emulsões armazenadas a  $4 \pm 1$  °C e as FIGURAS 21 (a-d) mostram as microscopias das emulsões armazenadas a  $25 \pm 1$  °C, ambas pelo período de 2 semanas.

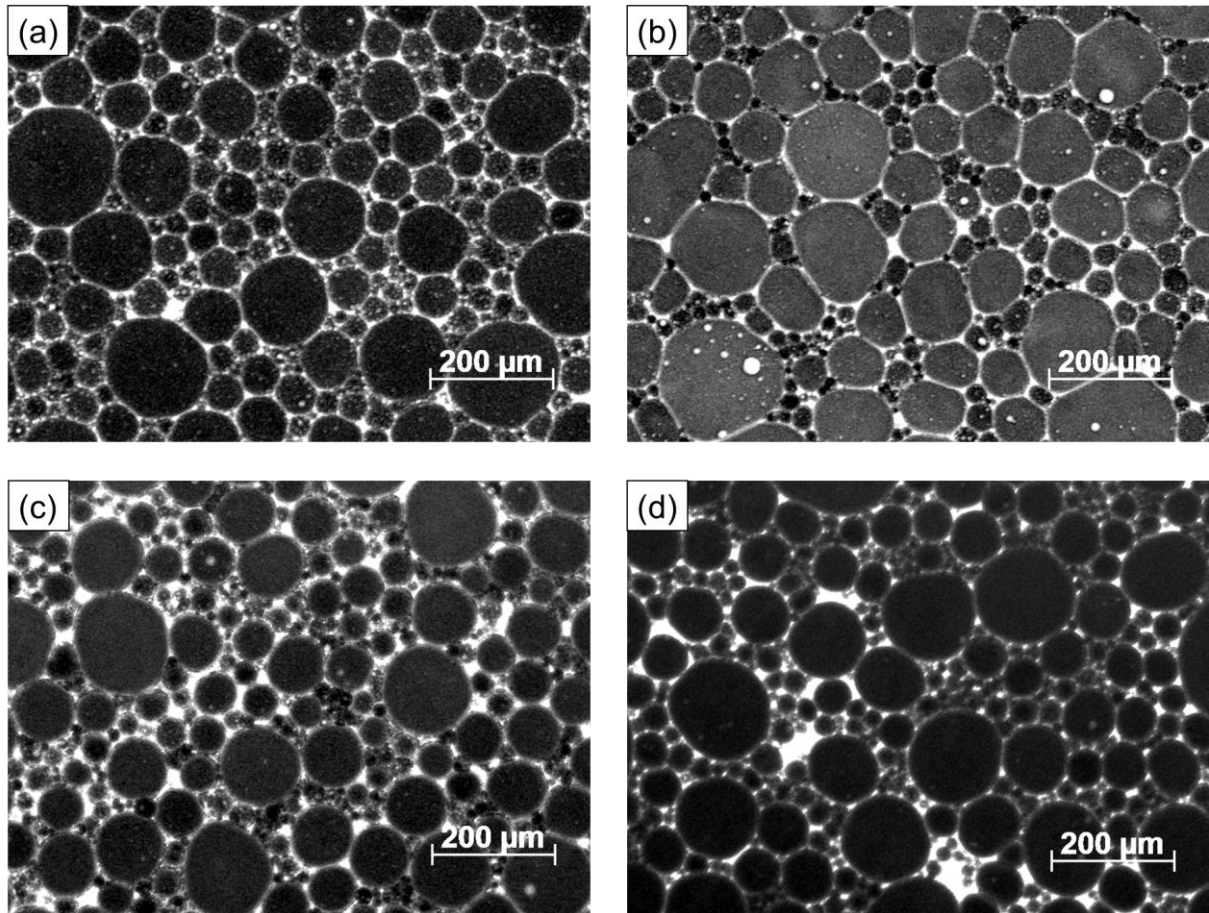


FIGURA 19: MICROSCOPIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM0140 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM0180 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM0240 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM0280 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) COM APROXIMAÇÃO DE 100X APÓS 24 HORAS

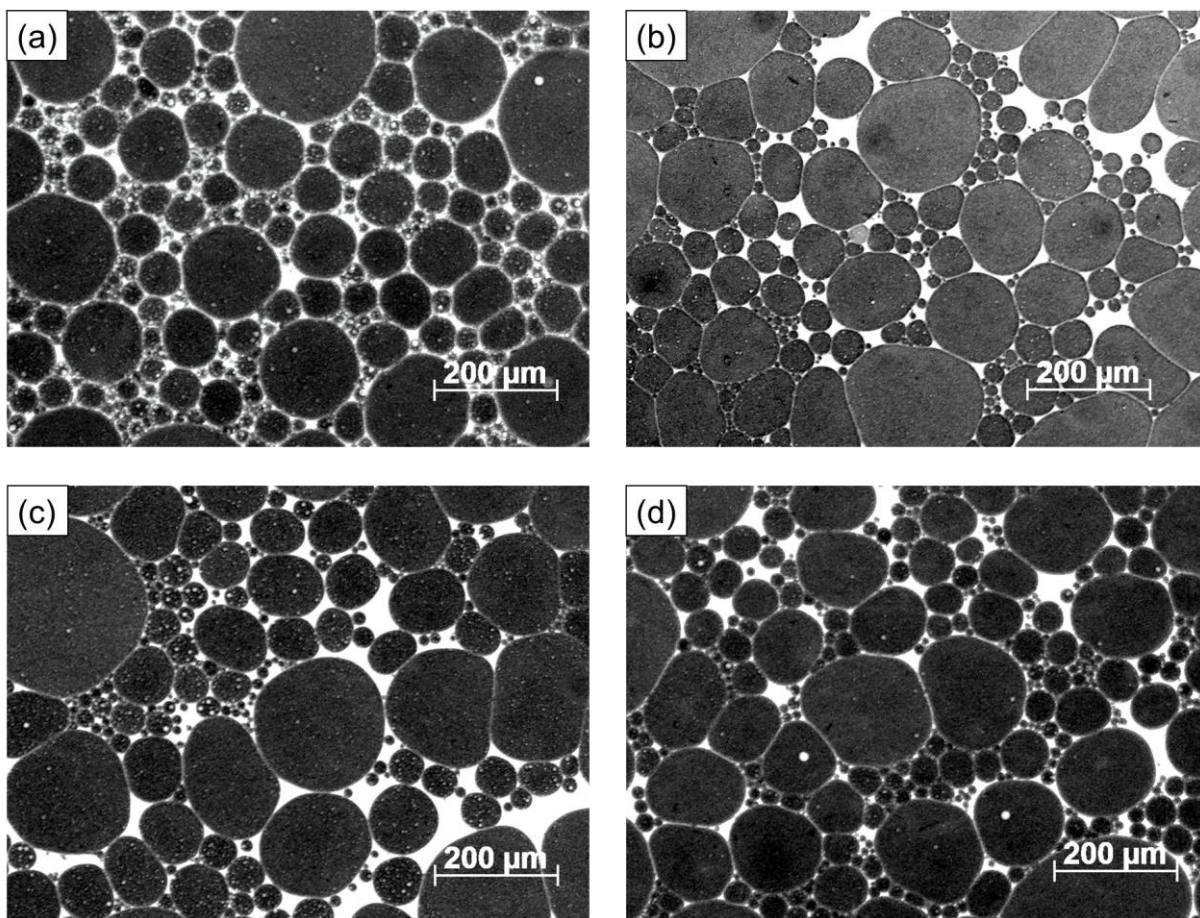


FIGURA 20: MICROSCOPIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) COM APROXIMAÇÃO DE 100X APÓS 2 SEMANAS

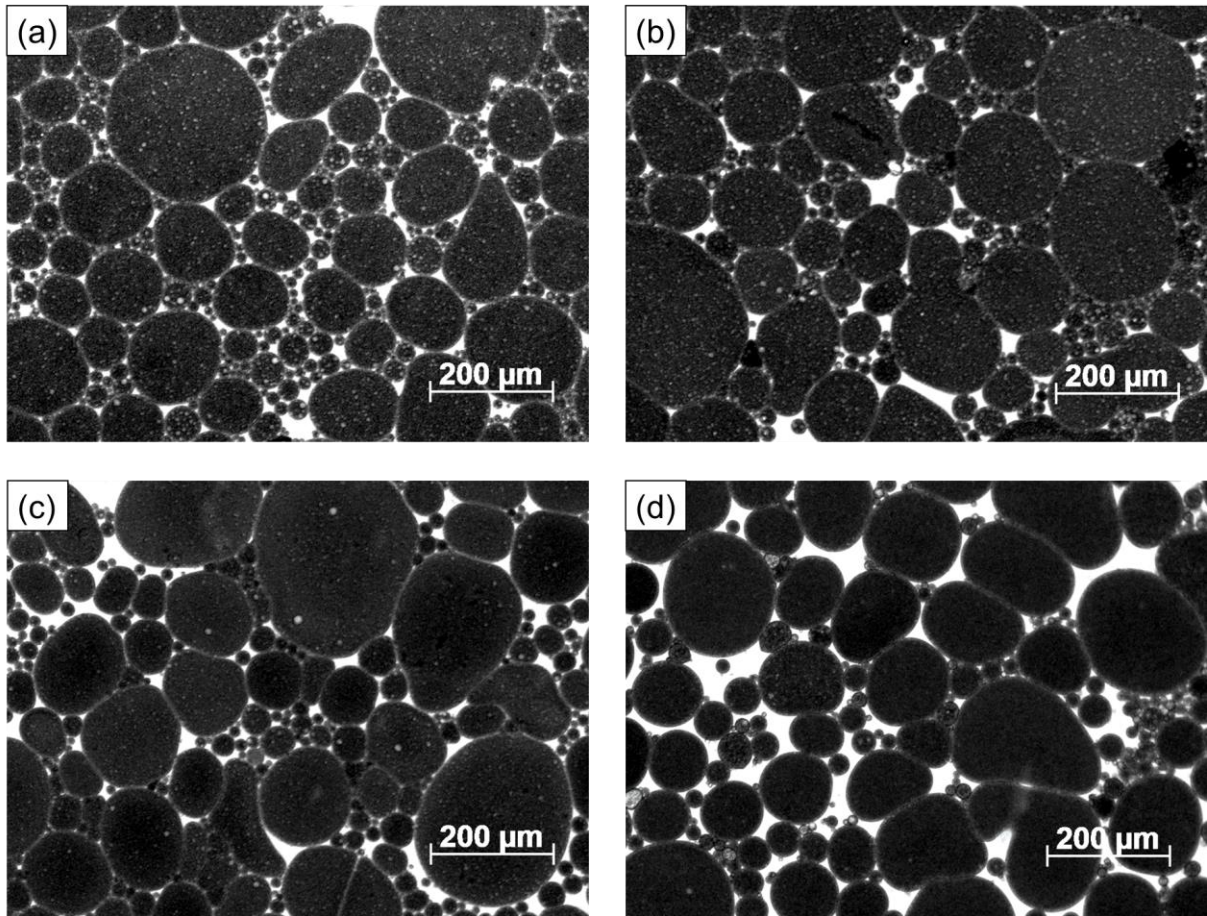


FIGURA 21: MICROSCOPIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) COM APROXIMAÇÃO DE 100X APÓS 2 SEMANAS

A partir da análise visual das microscopias observa-se que as EMs, após 24 horas, apresentam maior homogeneidade e não há sinais claros de coalescência, ao contrário do que mostram as demais microscopias para tempos de armazenamento superior.

Após duas semanas, tanto a emulsão mantida a 4°C quanto a 25°C, apresentaram aumento da quantidade de gotas com tamanhos maiores. Nas emulsões mantidas a 4°C observa-se menor deformação do formato das gotas, porém, com relação aos tamanhos, visualmente, não é possível aferir diferença.

A partir da técnica de DLS foi determinada as distribuições dos tamanhos de gotas para estas mesmas EMs, verificando sua dependência com o tempo e a temperatura de armazenagem. Os gráficos contendo as DTGs são vistos nas FIGURAS 22 (a-d).

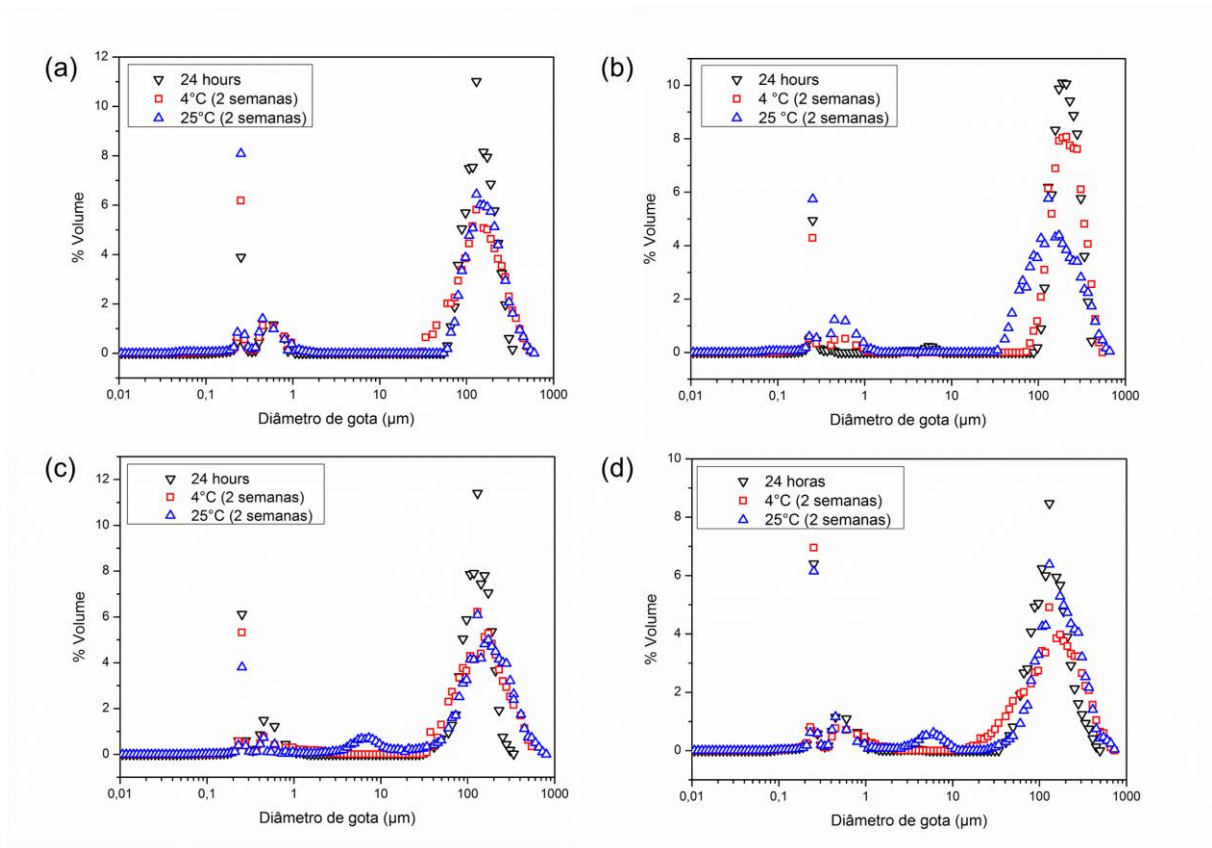


FIGURA 22: DISTRIBUIÇÃO TAMANHO DE GOTAS DAS EMULSÕES MÚLTIPLES: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d); APÓS 24 HORAS E 2 SEMANAS.

Para todos os gráficos de distribuição de tamanho, foi observado a presença de picos menores na região de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$  e, em todos os casos, um pico mais significativo correspondente ao diâmetro em torno de 0,25  $\mu\text{m}$ . Esta faixa de diâmetro corresponde ao tamanho das gotas da fase aquosa interna das emulsões primárias, como identificado nas microscopias (FIGURA 16), confirmando que as EPs são formadas por gotículas de tamanhos muito pequenos, além de apresentarem alta homogeneidade. Outros autores também encontraram diâmetros semelhantes para as gotículas constituintes da EP (FLOURY et al., 2000; PAWLIK et al., 2010; PEREZ-MORAL et al., 2014).

Da mesma forma, todas as amostras apresentaram outro pico, mais significativo em termos de volume, na região entre 30 e 800  $\mu\text{m}$ , tendo ponto de máximo em volume correspondente ao diâmetro de gota próximo a 130  $\mu\text{m}$ . Observando as microscopias, admite-se que estes diâmetros de partículas sejam das gotas de óleo dispersas na fase aquosa externa. A presença deste pico mais

significativo nesta região é indício de que as amostras são homogêneas, porém, devido sua largura, polidispersas.

A TABELA 9 mostra os valores de  $D_{4,3}$  e *span* para as gotas de óleo dispersas das amostras das EMs.

Reiterando que as análises realizadas após 24 horas ocorreram antes da separação e armazenamento em temperaturas distintas, o que justifica o valor único para as emulsões com o mesmo tipo de emulsão primária e tensoativo hidrofílico.

TABELA 9: VALORES MÉDIOS DE SPAN E  $D_{4,3}$  PARA AS EMULSÕES MÚLTIPLAS APÓS 24 HORAS E 2 SEMANAS

Amostra	Span		$D_{4,3}$ ( $\mu\text{m}$ )	
	24 horas	2 semanas	24 horas	2 semanas
<b>EM014004</b>	1,01±0,10	1,45±0,15	203±11	263±50
<b>EM014025</b>		1,20±0,03		282±57
<b>EM018004</b>	0,84±0,06	0,98±0,03	268±13	305±29
<b>EM018025</b>		1,96±0,02		353±28
<b>EM024004</b>	0,93±0,34	1,09±0,20	179±17	216±44
<b>EM024025</b>		1,46±0,31		367±61
<b>EM028004</b>	1,17±0,18	2,05±0,58	208±53	322±64
<b>EM028025</b>		1,65±0,58		355±73

A análise de variância (ANOVA) mostrou que não há diferenças significativas entre as médias, tanto entre as amostras, quanto para o tempo de armazenamento e temperatura. Embora o diâmetro médio das gotas aumente com o tempo de armazenamento e com a temperatura, como não houve, estatisticamente, diferença entre as médias, é possível admitir que todas as amostras permaneceram estáveis contra a coalescência para as condições estudadas.

Os valores de *span* ficaram entre 0,84 e 2,05, quanto menor este valor menor a polidispersão. Estes valores estão de acordo aos resultados obtidos por Matos et al. (2015) e Fechner et al. (2007), os quais obtiveram valores na faixa entre 0,87 e 1,70.

#### 5.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

Os termogramas das emulsões primárias estão apresentados na FIGURA 23. Observa-se que os picos, para ambas as amostras, encontram-se entre as temperaturas de -40 a -55 °C Os termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial para as emulsões múltiplas estão apresentados nas FIGURAS 24 (a-d). Como a análise de calorimetria exploratória diferencial tem por fundamento a realização de uma rampa de temperatura, na identificação das amostras das emulsões múltiplas também foi suprimido o código referente à distinção de temperatura.

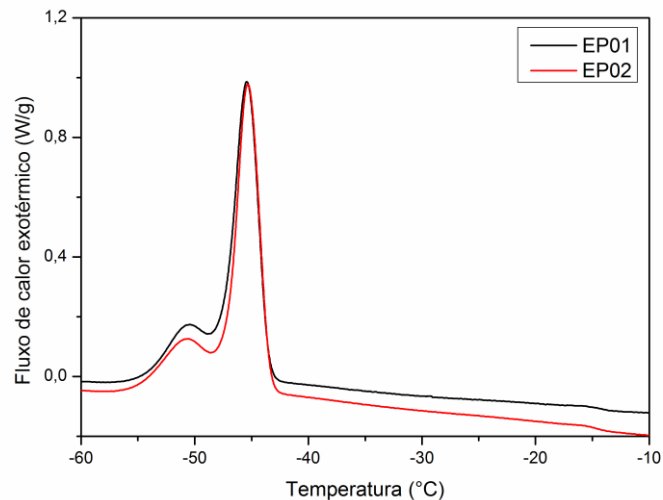


FIGURA 23: CURVAS DE DSC DAS EMULSÕES PRIMÁRIAS: EP01 (6% PGPR E 3% DE GELATINA) E EP02 (5% DE PGPR E 4% DE GELATINA).

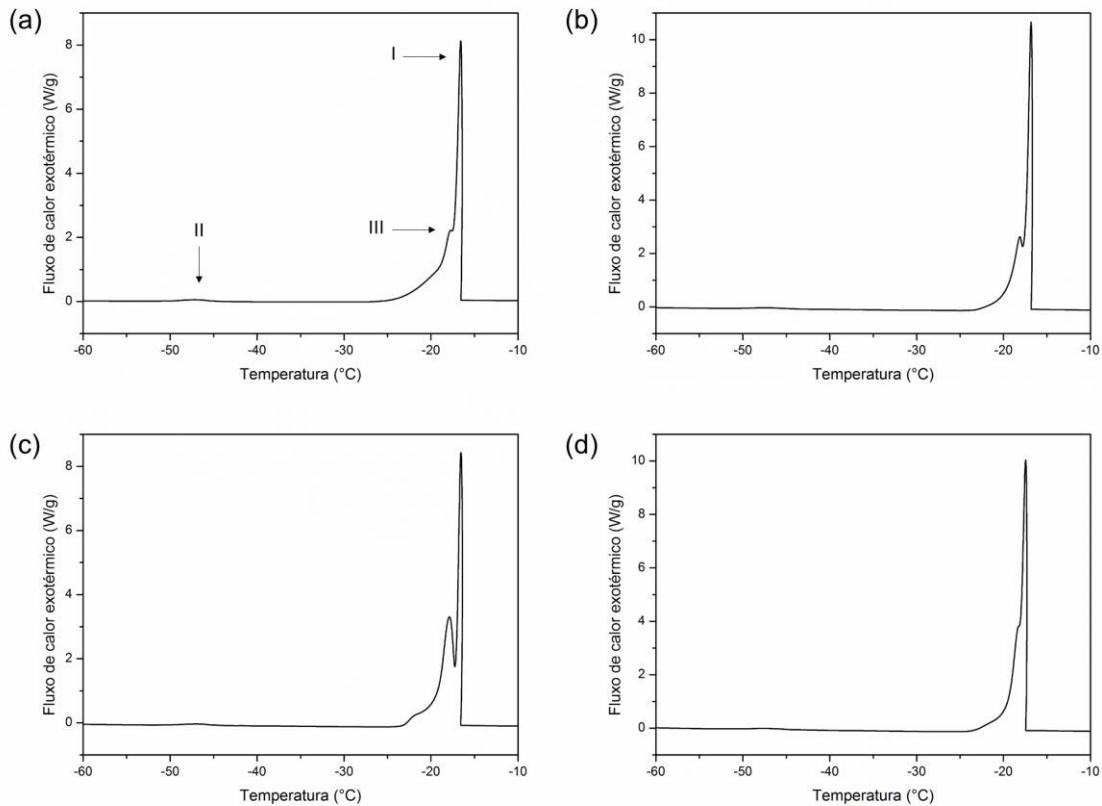


FIGURA 24: CURVAS DE DSC DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM0140 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM0180 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM0240 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM0280 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d).

A identificação dos picos I, II e III está apresentado apenas na FIGURA 24 (a), porém os mesmos devem ser considerados nos demais termogramas.

Os termogramas obtidos se apresentam como curvas típicas de DSC para emulsões múltiplas, pela presença de dois picos (I e II), sendo um significativamente maior (I), correspondente à cristalização da fase contínua (meio aquoso externo) e o pico menor (II) referente à cristalização da fase aquosa interna (KOVÁCS et al., 2005). Validando mais uma vez a formação das emulsões múltiplas.

Os picos II são melhores visualizados na FIGURA 25, já que suas intensidades são muito pequenas comparadas aos picos I, não sendo facilmente identificados nas FIGURAS 24 (a-d).

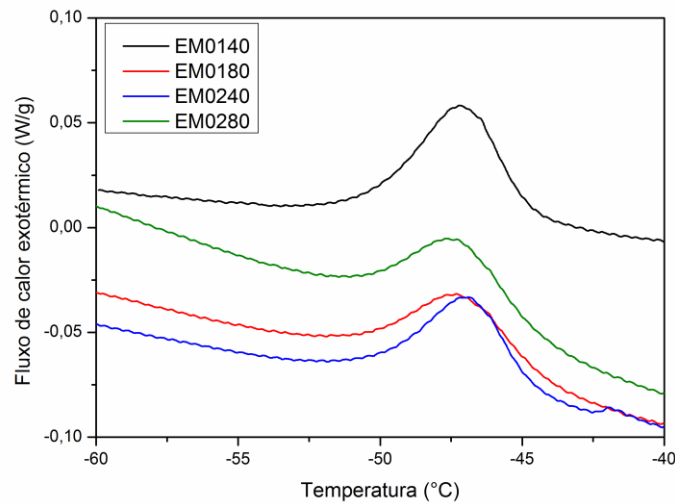


FIGURA 25: CURVAS DE DSC DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM0140, EM0180, EM0240 E EM0280 COM ÊNFASE NA REGIÃO REFERENTE AO PICO II.

A diferença de tamanho dos picos ocorre pela diferença de proporção entre as fases aquosas interna e externa, já que a fase aquosa interna compõe apenas 8% da emulsão múltipla, e também devido a difusão que ocorre durante a análise. O fenômeno de difusão foi observado e proposto por Potier et al. (1992), ao notar a presença de um outro pico (III) ser formado durante o retorno à linha de base do pico I. Nas FIGURAS 24 (a-d) é possível observar a existência deste pico, próximo a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  em todas as amostras.

Potier et al. (1992) afirmaram em seu trabalho que a ocorrência do pico III se dá pela transferência de água da fase aquosa interna para a externa ocasionada pela diferença de pressão de vapor da água congelada e da água subresfriada na mesma temperatura. Este mesmo tipo de curva foi obtido por Schuch et al. (2013) que adicionaram à discussão a hipótese da difusão estar relacionada a diferença de pressão osmótica entre as fases aquosas, pois em seu trabalho a redução da quantidade de sal na fase aquosa interna provocou o desaparecimento do pico III.

Na TABELA 10 são apresentados o calor latente de congelamento das amostras e a fração de fase aquosa retida na EP após realização da análise de DSC.

TABELA 10: CALOR LATENTE DE CONGELAMENTO E FASE AQUOSA RETIDA NA EMULSÃO PRIMÁRIA PARA AS EMULSÕES PRIMÁRIAS ATRAVÉS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

<b>Amostra</b>	<b>Calor latente de congelamento (J/g)</b>	<b>Fase aquosa retida na EP (%)</b>
<b>EM0140</b>	-225,74	30,77
<b>EM0180</b>	-236,26	24,79
<b>EM0240</b>	-234,35	21,36
<b>EM0280</b>	-235,41	25,53

Como pode ser visto, todos os resultados são muito próximos. Das frações da fase aquosa interna, previamente incorporadas, ficaram retidas na EP entre 21,36 e 30,77% após a análise. Esta é uma evidencia de que a emulsão múltipla formada por este trabalho possui grande desequilíbrio osmótico, o que pode ter ocasionado a migração de parte da fase aquosa interna para a externa, e estas moléculas de água ao encontrar a fase externa cristalizam, causando o pico III (SCHUCH et al., 2013). Além de possíveis perdas desta fase durante a preparação da emulsão múltipla.

Os calores latentes de congelamento das amostras também foram próximos do obtido por Schuch et al. (2013), que foi de 213,9 J/g, para uma emulsão múltipla contendo como principais materiais: óleo de canola, PGPR e gema de ovo em pó.

## 5.5 REOLOGIA

### 5.5.1 Reologia em estado estacionário

Os experimentos de reologia foram realizados com intuito de observar a influência da temperatura, do tipo de emulsão primária e do tensoativo hidrofílico com os parâmetros de fluxo e viscosidade das emulsões múltiplas formadas. Nas FIGURAS 26 (a-d) estão apresentadas as curvas de viscosidade das EMs para as temperaturas de 4°C e 25°C.

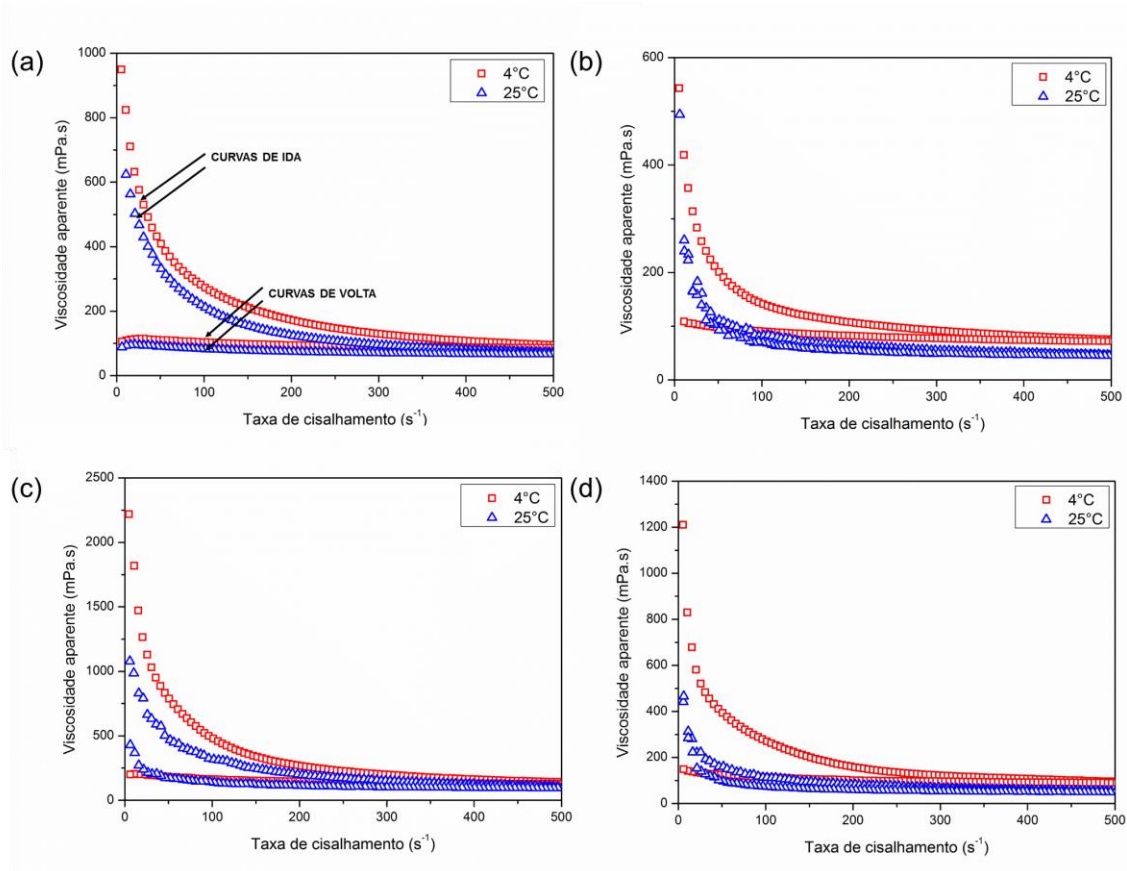


FIGURA 26: CURVAS DE VISCOSIDADE DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d).

A FIGURA 26 (a) indica as curvas de ida (viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento) e as curvas de volta (viscosidade em função da diminuição da taxa de cisalhamento), porém as mesmas disposições dessas curvas são encontradas nos demais gráficos.

Através da análise desses gráficos observa-se que a viscosidade, em todos os casos, diminui com o aumento da temperatura e da taxa de cisalhamento. Como a viscosidade é definida como a propriedade do fluido de resistência ao escoamento, o aumento da temperatura proporciona uma menor força de atração entre as moléculas e o aumento da distância entre elas, facilitando o fluxo e diminuindo a viscosidade (SCHRAMM, 2000)

A redução da viscosidade com a taxa de cisalhamento é típica de um fluido pseudoplástico, comportamento comum encontrado em emulsões. Isso ocorre porque as gotas das emulsões dispostas aleatoriamente quando paradas, ao ser aplicado uma tensão elas se deformam e se orientam no sentido da força aplicada. Outra característica em emulsões é a agregação (floculação),

que faz com a resistência ao fluxo seja maior, porém com o cisalhamento da amostra, há a desagregação destas gotas, diminuindo assim a viscosidade. (SCHRAMM, 2000; MCCLEMENTS, 2005). Porém, apesar da aplicação do cisalhamento das amostras, após as análises reológicas não foi observado, visualmente, separação de fases.

Para melhor comparar as diferentes respostas obtidas com a reologia das amostras foram plotadas as curvas de fluxo, apresentadas nas FIGURAS 27 (a-d), para as temperaturas de 4 e 25°C.

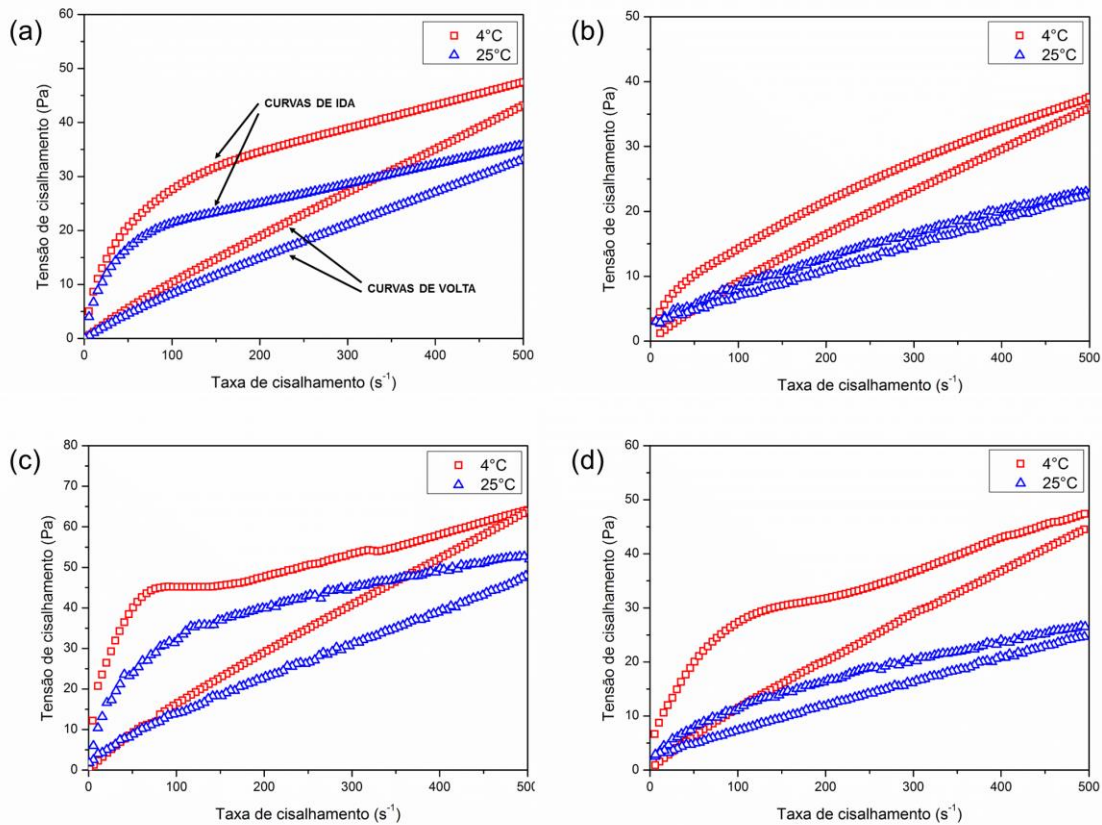


FIGURA 27: CURVAS DE FLUXO DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d).

Nestes gráficos foi possível determinar a dependência do tempo sobre a amostra, verificando que o fluido não é independente do tempo, mas sim, apresenta comportamento tixotrópico. A tixotropia é um fenômeno comum nos fluidos pseudoplásticos e define-se pela redução da viscosidade de um material através da aplicação de uma tensão sobre o mesmo, seguida de sua recuperação gradual ao ser retirada esta força. Um exemplo clássico de um fluido

tixotrópico na indústria de alimentos são os iogurtes (BARNES, 1997). Uma das maneiras de verificar o efeito da tixotropia é a identificação da histerese entre as curvas de ida e de volta dos gráficos de viscosidade e de fluxo. Esta histerese indica que durante o aumento da taxa de cisalhamento a microestrutura do material foi alterada, através de desagregação e deformação, sendo o tempo para a reestruturação da amostra insuficiente. (SCHRAMM, 2000).

A tixotropia foi notada em todas as emulsões múltiplas, para todas as temperaturas, porém é possível afirmar que este efeito, observado a partir da histerese, é mais intenso nas amostras a 4°C, mas principalmente nas que possuem Tween 40 como tensoativo hidrofílico.

A partir das curvas de fluxo (curvas de ida) foram adicionados modelos reológicos para verificar o ajuste aos dados. As curvas foram ajustadas pelos modelos de Herschel Bulkey (HB), Casson (CS) e Ostwald-De-Waele (OW). Na TABELA 11 são apresentados apenas os parâmetros referentes ao modelo de OW por ter fornecido parâmetros mais representativos frente aos demais. Este modelo obteve valores de  $R^2$  superiores ao modelo de Casson e para alguns parâmetros do modelo de HB foram atribuídos valores negativos, os quais não são representativos, sendo assim, o modelo de OW se mostrou o mais adequado.

TABELA 11: PARÂMETROS DE AJUSTE DO MODELO DE OSTWALD-DE-WAELLE

Amostra	$k_{ow}$	n	$\chi^2$	$R^2$
<b>EM014004</b>	5,139 ± 0,121	0,3567 ± 0,0041	0,757	0,9994
<b>EM014025</b>	4,185 ± 0,127	0,3411 ± 0,0053	0,728	0,9990
<b>EM018004</b>	0,939 ± 0,014	0,5928 ± 0,0025	0,085	0,9999
<b>EM018025</b>	0,479 ± 0,013	0,6232 ± 0,0046	0,103	0,9996
<b>EM024004</b>	14,675 ± 0,563	0,2297 ± 0,0069	5,529	0,9979
<b>EM024025</b>	6,740 ± 0,185	0,3332 ± 0,0048	1,449	0,9992
<b>EM028004</b>	4,439 ± 0,165	0,3767 ± 0,0065	1,663	0,9987
<b>EM028025</b>	1,009 ± 0,014	0,5270 ± 0,0024	0,046	0,9999

$k_{ow}$ : índice de consistência de Ostwald-de Waele;

n: índice de comportamento;

$\chi^2$ : qui-quadrado;

$R^2$ : coeficiente de determinação.

Analisando os valores de  $R^2$ , todas as amostras tiveram bons ajustes e baixos valores de  $\chi^2$ . Nesta modelagem todos os valores de n estão entre 0 e 1, o que confirma o comportamento pseudoplástico. O índice de consistência ( $k_{ow}$ ) é relacionado à viscosidade da amostra, quanto maior seu valor, maior a viscosidade do material. Porém, para fazer uma análise aprofundada de como a viscosidade varia em função dos fatores: tipo de emulsão primária, tipo de tensoativo e

temperatura foi realizada a modelagem dos dados para obtenção de um modelo experimental tendo como resposta o índice de consistência.

A significância estatística dos fatores foi examinada por ANOVA ( $p < 0,05$ ) para cada parâmetro. Os termos que significativos foram identificados para geração do modelo. A validação do modelo ocorreu quando a falta de ajuste não era significativa, a variância da regressão ( $F_{\text{calculado}}$ ) maior do que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$ , e quando a variância dos resíduos ( $F_{\text{calculado}}$ ) menor do que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$ , no nível de confiança de 95%. Para o modelo válido foram construídas as superfícies de resposta.

Para o modelo com interação entre os fatores: tipo emulsão primária (EP), tipo tensoativo (TS) e temperatura (T) foram obtidos os efeitos padronizados de cada fator no índice de consistência. O gráfico contendo estes efeitos, conhecido como Diagrama de Pareto, está apresentado na FIGURA 28.

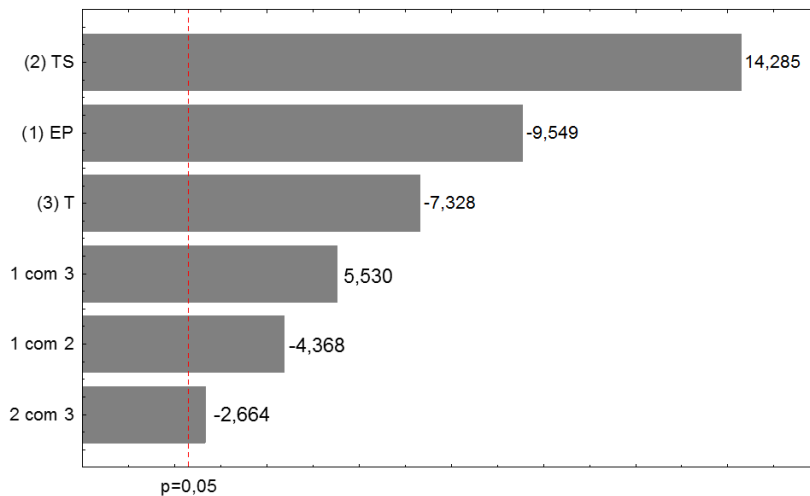


FIGURA 28: DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS DOS FATORES: TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA (EP), TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO (TS) E TEMPERATURA (T) E A INTERÇÃO ENTRE ELES PARA O ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA  $k_{ow}$

Verifica-se que todos os fatores e a interação entre eles são significativos, mas o tipo de tensoativo tem maior efeito frente ao tipo de emulsão primária e a temperatura, dentro da faixa estudada. Estes efeitos traduzem que o uso do Tween 40 produz respostas com maiores valores de  $k_{ow}$ , bem como a utilização da EP02, onde a maior concentração de gelatina seja reflexo da maior viscosidade, e a menor temperatura, 4°C. A relação dos fatores com o índice de consistência é dado pelo modelo representado pela Equação 21.

$$k_{ow} = 4,594 - 1,903(EP) + 2,847(TS) - 1,461(T) - 0,871(EP \times TS) + 1,102(EP \times T) - 0,531(TS \times T) \quad (21)$$

A TABELA 12 apresenta a ANOVA para validar a significância estatística do modelo.

TABELA 12: ANOVA PARA O MODELO DE ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	257.903	6	42.984	49.986	3.374
Resíduos	7.739	9	0.860		
Falta de ajuste	2.654	1	2.654	4.175	5.318
Erro puro	5.086	8	0.636		
Total	265.642	24			

$R^2 = 0,97087$ ;  
% Var: 98,085.

Confirmada a validação do modelo a partir da ANOVA são feitas as superfícies de resposta apresentadas nas FIGURA 29 a 31.

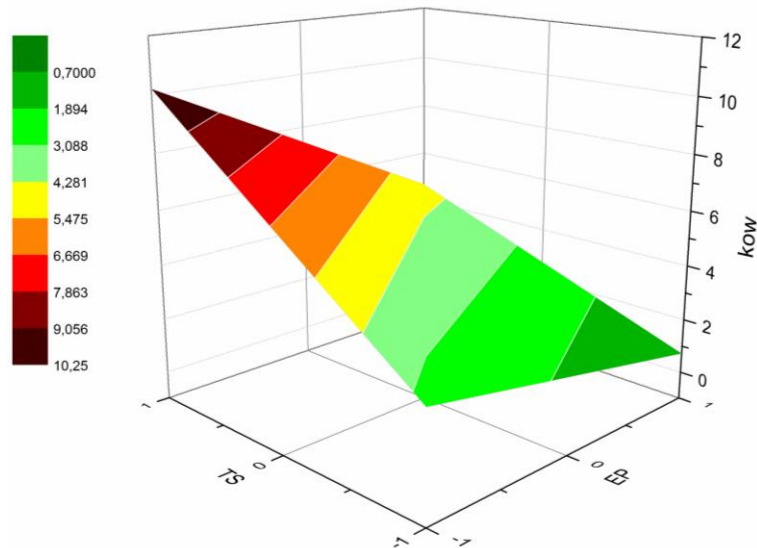


FIGURA 29: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA  $k_{ow}$  EM FUNÇÃO DOS FATORES EP (TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA) E TS (TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO).

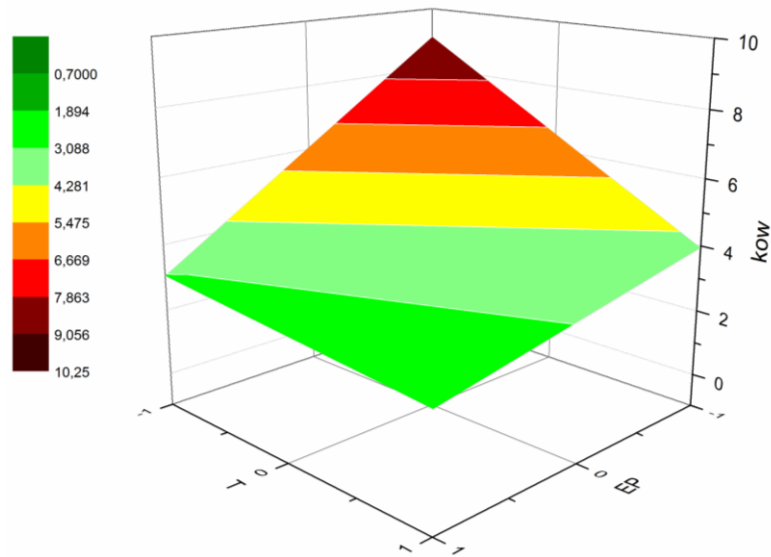


FIGURA 30: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA  $k_{ow}$  EM FUNÇÃO DOS FATORES T (TEMPERATURA) E EP (TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA).

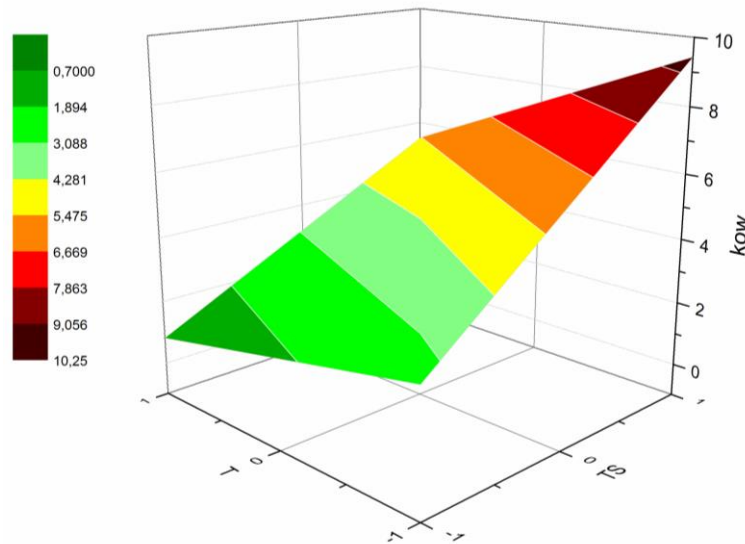


FIGURA 31: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA  $k_{ow}$  EM FUNÇÃO DOS FATORES T (TEMPERATURA) E TS (TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO).

Estas superfícies mostram a aplicação do modelo gerado pela Equação 21. Nela é reiterada qual conjunto de dados fornece uma resposta maior ou menor em relação aos fatores. Sendo assim, o maior índice de consistência, ou seja, maior viscosidade é definida quando  $EP=-1$  (EP02),  $TS=1$  (Tween 40) e  $T=-1$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e menor viscosidade quando  $EP=1$  (EP01),  $TS=-1$  (Tween 80) e  $T=1$  ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Ou seja, a viscosidade é menor na EM018025 e maior na EM024004.

### 5.5.2 Reologia oscilatória

A partir das varreduras de tensão a 0,5 Hz foram determinadas as tensões para a realização das varreduras de frequência. As tensões foram de 0,2 Pa, para as emulsões múltiplas, e para as emulsões primárias 4 Pa. A FIGURA 32 mostra as varreduras de frequência, a 25°C, das emulsões primárias EP01 e EP02.

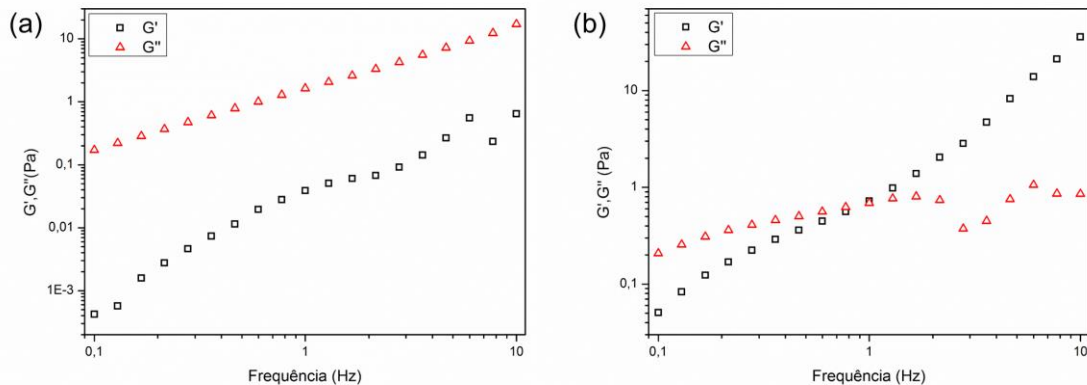


FIGURA 32: VARREDURA DE FREQUÊNCIA DA EP01 – 6% DE PGPR E 3% DE GELATINA (a) E EP02 – 5% DE PGPR E 4 % DE GELATINA (b) A 25°C

Para a EP01 o  $G''$  (módulo viscoso) foi superior ao  $G'$  (módulo elástico) por toda a varredura de frequência, caracterizando uma solução diluída, indicando que o caráter líquido da emulsão múltipla é mais significativo frente ao caráter sólido. Porém na EP02 há o cruzamento dos módulos na frequência de 1 Hz, esse comportamento é característico de soluções concentradas e reflete a maior concentração de gelatina da amostra (STEFFE, 1996).

Nas FIGURAS 33 (a-d) são apresentadas as varreduras de frequência para as emulsões múltiplas para as temperaturas de 4 e 25°C.

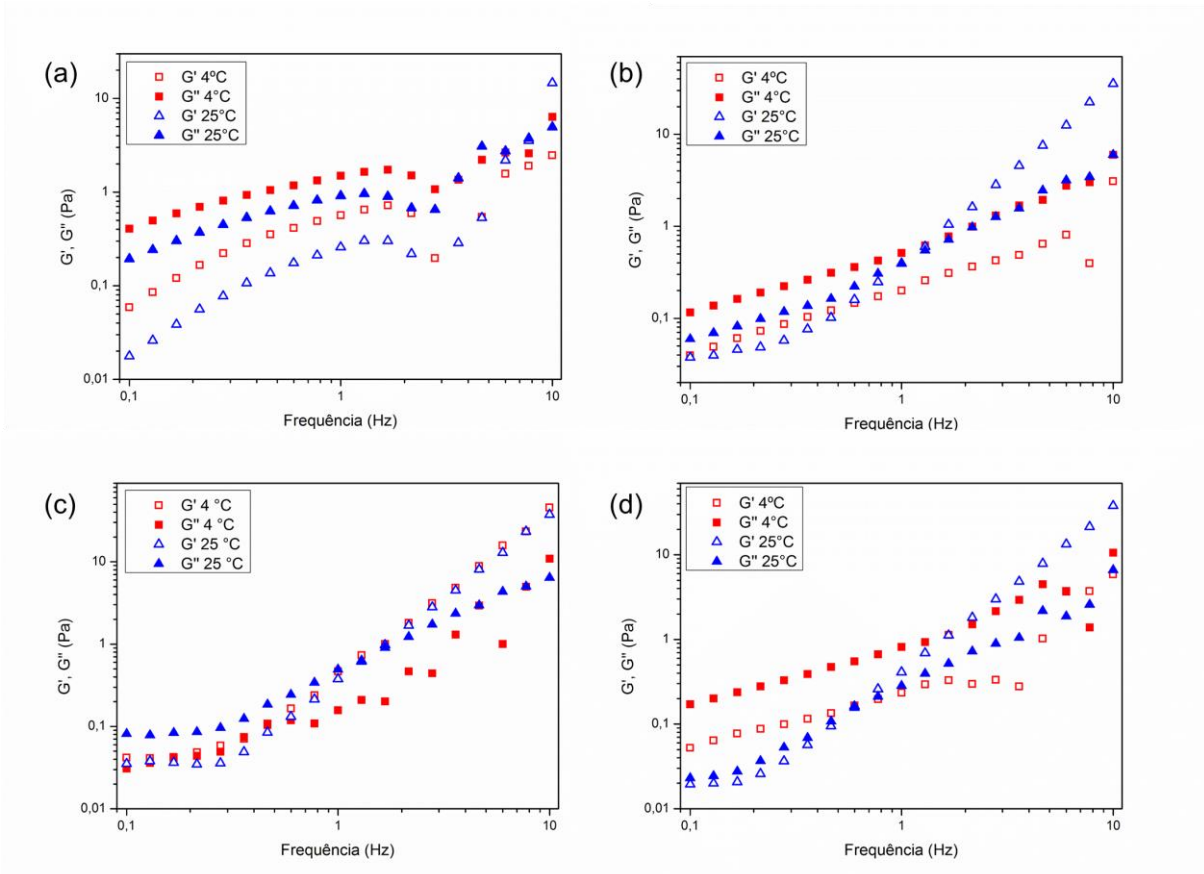


FIGURA 33: VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d).

Para EM014004, EM018004 e EM028004,  $G''$  foi maior que  $G'$  em toda a extensão da varredura de frequência, definindo as mesmas como soluções diluídas. Este tipo de comportamento corresponde às forças intermoleculares mais fracas, sendo o mesmo comportamento apresentado pela EP01, a emulsão primária com menor teor de gelatina.

A 25°C, em todas as emulsões múltiplas foi observado o cruzamento dos módulos, fenômeno conhecido como *cross-over*, sendo este comportamento típico de fluidos viscoelásticos, também encontrado em outras emulsões múltiplas (SCHUCH et al., 2013; MATOS et al., 2015). Nestes casos, em frequências mais baixas o módulo viscoso  $G''$  é superior ao módulo elástico  $G'$  e a amostra tem caráter mais líquido, mas com o aumento da frequência o  $G'$  se torna superior, predominando o caráter sólido. Reiterando que esse comportamento define estas soluções como sendo concentradas, as quais apresentam força intermolecular moderada (STEFFE, 1996).

Na varredura de frequência da EM024004, o módulo elástico foi superior, porém, ela ainda deve ser considerada uma solução concentrada, já que para definir uma amostra como gel o módulo elástico deve ser significativamente maior que o módulo viscoso e se apresentarem constantes em toda faixa da varredura, diferentemente do que é visto na amostra em questão. Porém os valores próximos, mas ainda superiores do  $G'$  comparado ao  $G''$ , para a EM024004, mostra que a mesma possui comportamento predominante elástico, devendo ser reflexo da maior viscosidade encontrada para esta emulsão múltipla.

### 5.6 SEPARAÇÃO DAS FASES (*CREAMING*)

Os fenômenos de *creaming* e sedimentação possuem o mesmo mecanismo de ação, o que os diferencia é a região onde as gotas permanecem aglomeradas. No caso em estudo há a separação das fases e as gotas de óleo ainda dispersas ficam no topo da emulsão e a fase aquosa no fundo, o que caracteriza o processo de *creaming*.

Nas FIGURAS 34 (a-d) é mostrado o aumento do volume de fases separado com o decorrer do tempo para as amostras de emulsões múltiplas armazenadas a  $4\pm 1$  °C por 20 dias. E nas FIGURAS 35 (a-d) é mostrado o aumento do volume de fases para as amostras de emulsões múltiplas armazenadas a  $25\pm 1$  °C pelo mesmo período.

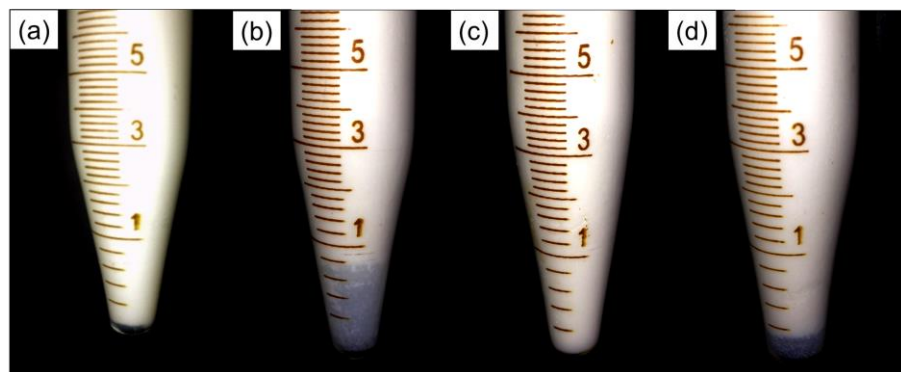


FIGURA 34: VOLUME DE FASE SEPARADA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028004 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) APÓS 20 DIAS.

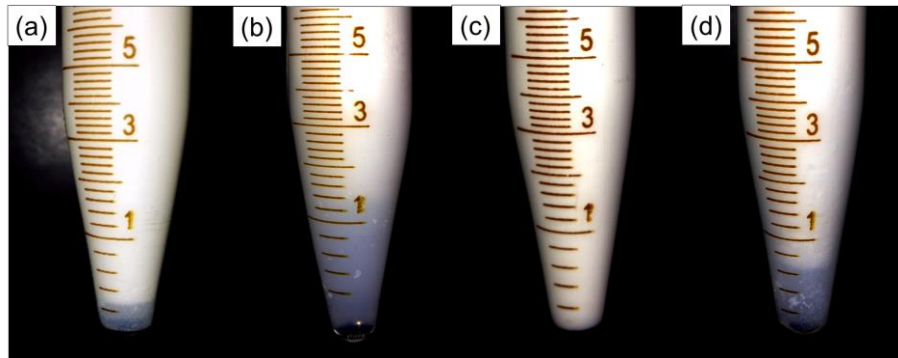


FIGURA 35: VOLUME DE FASE SEPARADA DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d). APÓS 20 DIAS.

Na TABELA 13 é apresentada a porcentagem representativa da estabilidade da emulsão ao processo de *creaming*, aplicando a Equação 19, para o período de 20 dias a  $4\pm 1$  e a  $25\pm 1$  °C.

TABELA 13: ESTABILIDADE AO CREAMING MONITORADA NO PERÍODO DE 20 DIAS.

<b>Amostra</b>	<b><math>v_f</math> (ml)</b>	<b>ES (%)</b>
<b>EM014004</b>	0,0±0,0	100,0±0,0
<b>EM014025</b>	0,8±0,5	92,0±5,0
<b>EM018004</b>	1,0±0,2	90,0±2,0
<b>EM018025</b>	3,1±1,5	69,0±15,0
<b>EM024004</b>	0,0±0,0	100,0±0,0
<b>EM024025</b>	0,0±0,0	100,0±0,0
<b>EM028004</b>	0,1±0,1	99,0±0,5
<b>EM028025</b>	2,5±1,5	75,5±17,0

Estes resultados estão de acordo com os obtidos através da reologia destas emulsões, demonstrando como a separação de fases está relacionada à viscosidade das amostras. As amostras com Tween 40, as quais apresentaram maior viscosidade, tiveram menor separação de fases, em ambas as temperaturas comparadas às amostras com Tween 80. De modo especial, as amostras EM024004 e a EM024025 apresentaram eficiência de 100% para este período de tempo. Porém, a análise estatística realizada, adotando um intervalo de confiança de 95%, mostrou que não há diferenças significativas entre as médias.

A velocidade em que ocorre o *creaming* é afetada sobretudo pela viscosidade do meio, a qual é influenciada pela temperatura, que em geral, quanto menor, maior a viscosidade; desta forma as amostras deixadas sob refrigeração apresentam menor separação, pois a movimentação das partículas é prejudicada comparada as amostras mantidas a 25°C. Nestas foi visualmente perceptível a redução da viscosidade do meio, ocasionando a separação das fases.

## 5.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para correlacionar as medidas de condutividade das amostras com a concentração de sal liberada, primeiramente foi feita uma curva de calibração com quantidades conhecidas de NaCl em solução aquosa. A faixa de concentração utilizada para realização da curva foi adotada devido a quantidade conhecida de NaCl adicionado na fase aquosa interna, correspondente a quantidade máxima possível encontrada nesta emulsão.

A curva de calibração foi realizada em triplicata, em temperatura ambiente de 25°C e está apresentada na FIGURA 36.

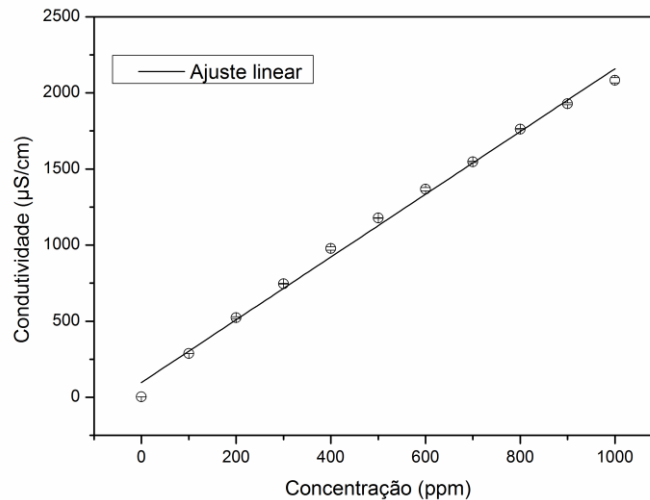


FIGURA 36: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl *VERSUS* CONDUTIVIDADE ELÉTRICA PARA A FAIXA DE 100 A 1000 PPM A 25°C

Com os pontos obtidos experimentalmente foi realizado o ajuste linear, obtendo os seguintes parâmetros: Coeficiente linear:  $97,099 \pm 28,843$ , coeficiente angular:  $2,061 \pm 0,049$  e coeficiente de determinação ( $R^2$ ): 0,995. O coeficiente linear apresentou alto desvio padrão, porém o coeficiente de determinação obtido para a calibração foi próximo a 1, o que indica que esta regressão apresenta bom ajuste aos dados. A relação obtida com esses parâmetros é explicitada na Equação 22.

$$C_i = 97,099 + 2,061 \cdot S_i \quad (22)$$

Sendo  $C_i$  a condutividade da amostra dada em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  e  $S_i$  a concentração de NaCl correspondente em ppm. Na TABELA 14 estão contidas as medidas de condutividade para a água deionizada, as fases aquosas e a emulsão primária.

TABELA 14: CONDUTIVIDADE DAS DIFERENTES FASES QUE FORMAM A EMULSÃO MÚLTIPLA

<b>Fase</b>	<b>Condutividade (<math>\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</b>
Água deionizada	$2,06 \pm 0,01$
Aquosa interna	$10,990 \pm 507$
Aquosa externa	$49,37 \pm 0,36$
Emulsão primária	$0,09 \pm 0,06$

Os resultados de condutividade das amostras e os valores de concentração de sal, obtidos a partir da aplicação da Equação 22, estão apresentados no APÊNDICE.

Na preparação das EMs, conhecendo a quantidade de NaCl adicionado na fase aquosa interna, determina-se a concentração salina máxima da amostra, correspondente a 1600 ppm. As FIGURAS 37 (a-d) mostram os gráficos de eficiência de encapsulação, para o período de 20 dias, aplicando a Equação 20 utilizando os valores de concentração de sal.

Analisando os gráficos, nota-se que em todos os casos a eficiência de encapsulação é maior para a emulsão mantida sob refrigeração. Este resultado confirma como a temperatura apresenta influência para manutenção da emulsão, preservando seu conteúdo e estabilidade. O efeito da temperatura na liberação de compostos também foi visto por Bonnet et al. (2009), com a verificação de que a  $25^\circ\text{C}$ , para emulsões múltiplas formulada com óleo de oliva, a eficiência no final de 30 dias foi próximo a 70% enquanto que a  $4^\circ\text{C}$  foi de 90%, porém o mesmo encapsulou cloreto de magnésio. Lutz et al. (2009) também encapsularam NaCl na formação de emulsões múltiplas e acompanharam sua liberação com o tempo. Foram obtidos resultados semelhantes ao obterem liberação em torno de 25 a 30% no final de 20 dias a temperatura ambiente para formulações utilizando óleo MCT (triglicerídeos de cadeia média) e agentes estabilizantes: PGPR e isolado proteico do soro do leite e pectina.

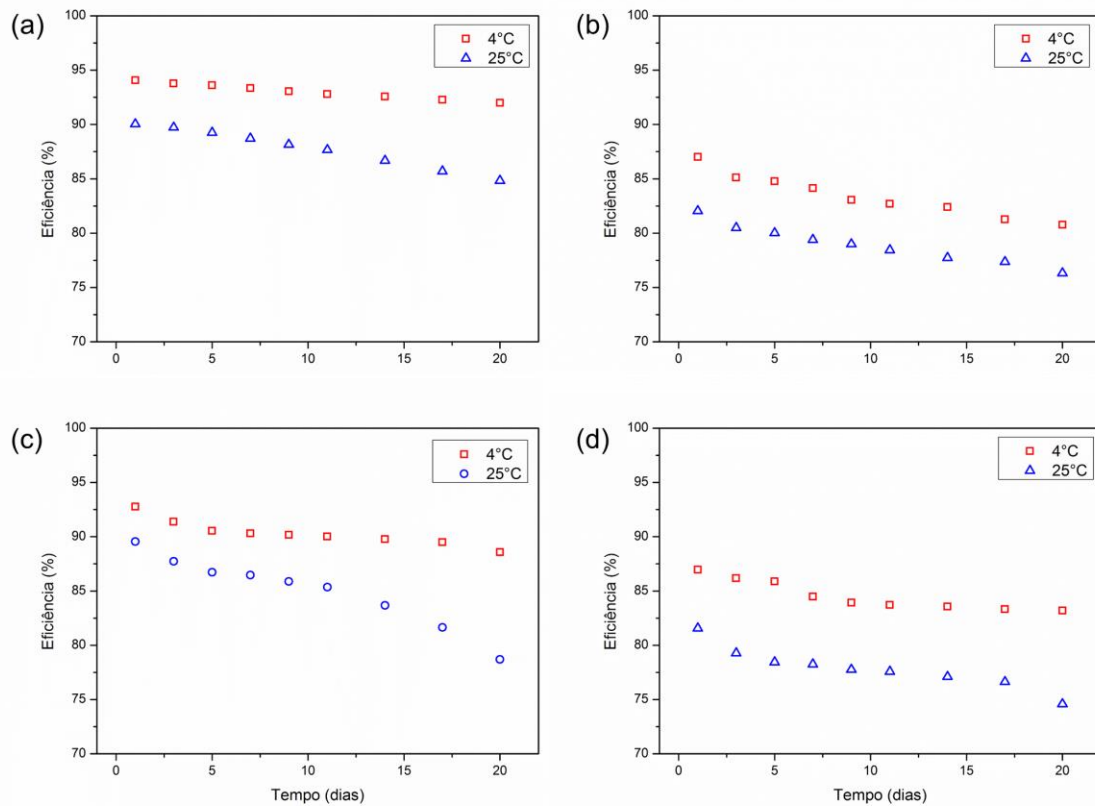


FIGURA 37: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NaCl DAS EMULSÕES MÚLTIPLAS: EM014004 E EM014025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (a); EM018004 E EM018025 – 6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (b); EM024004 E EM024025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40 (c); EM028004 E EM028025 – 5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80 (d) PARA O PERÍODO DE 20 DIAS

Na TABELA 19 estão as médias das eficiências obtidas no decorrer do tempo todas as emulsões múltiplas.

A análise de variância mostrou que há diferenças significativas entre as médias, sendo assim foi realizado o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

TABELA 15: VALORES DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NaCl PARA O PERÍODO DE 20 DIAS.

Dia	Eficiência (%)							
	Amostras							
	EM014004	EM014025	EM018004	EM018025	EM024004	EM024025	EM028004	EM028025
1	94,07±0,35 <sup>a</sup>	90,04±0,08 <sup>bc</sup>	87,01±0,53 <sup>c</sup>	82,04±1,11 <sup>d</sup>	92,77±0,32 <sup>ab</sup>	89,56±0,08 <sup>c</sup>	86,96±0,21 <sup>c</sup>	81,57±0,88 <sup>d</sup>
3	93,77±0,20 <sup>a</sup>	89,72±0,18 <sup>c</sup>	85,13±0,05 <sup>e</sup>	80,49±0,14 <sup>f</sup>	91,39±0,67 <sup>b</sup>	87,74±0,17 <sup>d</sup>	86,19±0,14 <sup>de</sup>	79,28±0,17 <sup>f</sup>
5	93,60±0,24 <sup>a</sup>	89,25±0,56 <sup>b</sup>	84,78±0,09 <sup>d</sup>	80,02±0,06 <sup>e</sup>	90,54±0,12 <sup>b</sup>	86,72±0,03 <sup>c</sup>	85,89±0,11 <sup>cd</sup>	78,44±0,12 <sup>f</sup>
7	93,33±0,36 <sup>a</sup>	88,71±0,47 <sup>c</sup>	84,13±0,41 <sup>e</sup>	79,40±0,23 <sup>f</sup>	90,30±0,06 <sup>b</sup>	86,46±0,05 <sup>d</sup>	84,48±0,24 <sup>e</sup>	78,24±0,05 <sup>f</sup>
9	93,04±0,29 <sup>a</sup>	88,15±0,49 <sup>c</sup>	83,07±0,20 <sup>e</sup>	78,99±0,12 <sup>f</sup>	90,18±0,03 <sup>b</sup>	85,89±0,20 <sup>d</sup>	83,93±0,12 <sup>e</sup>	77,76±0,05 <sup>f</sup>
11	92,79±0,39 <sup>a</sup>	87,66±0,27 <sup>c</sup>	82,69±0,03 <sup>f</sup>	78,44±0,09 <sup>g</sup>	90,01±0,11 <sup>b</sup>	85,36±0,09 <sup>d</sup>	83,72±0,06 <sup>e</sup>	77,58±0,08 <sup>g</sup>
14	92,57±0,39 <sup>a</sup>	86,68±0,17 <sup>c</sup>	82,40±0,14 <sup>e</sup>	77,73±0,17 <sup>f</sup>	89,77±0,08 <sup>b</sup>	83,67±0,17 <sup>d</sup>	83,57±0,03 <sup>d</sup>	77,09±0,11 <sup>f</sup>
17	92,27±0,45 <sup>a</sup>	85,69±0,12 <sup>c</sup>	81,28±0,17 <sup>e</sup>	77,35±0,12 <sup>f</sup>	89,50±0,11 <sup>b</sup>	81,64±0,32 <sup>e</sup>	83,32±0,15 <sup>d</sup>	76,64±0,05 <sup>f</sup>
20	92,00±0,27 <sup>a</sup>	84,83±0,14 <sup>c</sup>	80,76±0,23 <sup>d</sup>	76,32±0,42 <sup>e</sup>	88,57±0,70 <sup>b</sup>	78,70±0,59 <sup>d</sup>	83,19±0,11 <sup>c</sup>	74,58±0,14 <sup>e</sup>

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A eficiência de encapsulação foi significativamente maior nas emulsões onde foi utilizado o Tween 40 como tensoativo hidrofílico e mantidas a 4°C. Entre a EM014004 e a EM024004, a primeira obteve eficiência significativamente maior nas duas temperaturas, o que indica que a maior quantidade de PGPR presente na EP01 foi mais eficaz na formação de uma barreira contra a difusão. Embora as emulsões contendo Tween 80 não diferirem significativamente na maioria dos dias, também se observa maior eficiência da emulsão formada pela EP01.

A partir desta análise é possível observar que comparando a mesma emulsão múltipla, mas armazenada em temperaturas distintas, a eficiência de encapsulação é significativamente superior nas emulsões armazenadas sob refrigeração.

Para determinar a influência de cada fator (tipo de emulsão primária, tipo de tensoativo e temperatura) na eficiência de encapsulação foram obtidos os efeitos padronizados, demonstrados no Diagrama de Pareto, apresentado na FIGURA 38, para um modelo com interação entre os fatores. Não foi gerada uma equação para descrever o modelo pois o mesmo não foi validado por apresentar falta de ajuste significativa.

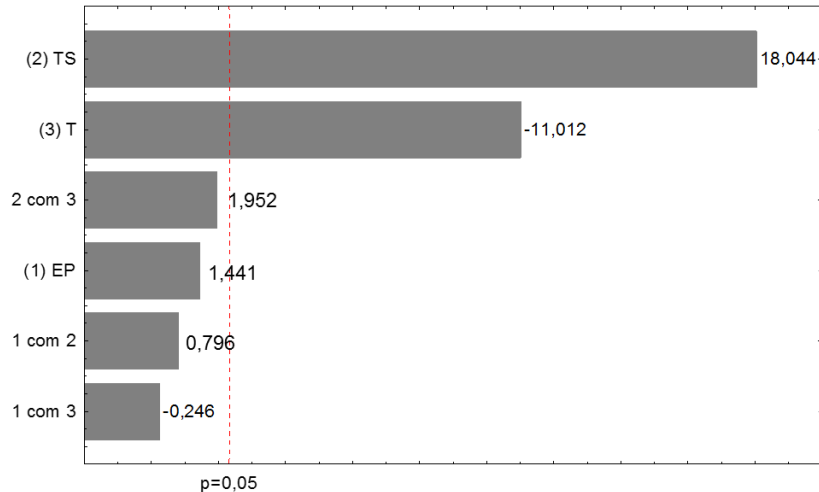


FIGURA 38: DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS DOS FATORES TIPO DE EMULSÃO PRIMÁRIA (EP), TIPO DE TENSOATIVO HIDROFÍLICO (TS) E TEMPERATURA (T) PARA A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Apenas os fatores tipo de tensoativo (TS) e temperatura (T) são significativos tendo como resposta a eficiência de encapsulação. Porém, o tipo de tensoativo apresenta ainda maior efeito frente à temperatura. Estes efeitos traduzem que o uso do Tween 40 (nível +1) produz respostas

com maiores valores comparados ao Tween 80 e a menor temperatura, 4°C (nível -1) retornará também valores mais altos de eficiência de encapsulação.

A partir destas análises realizadas para caracterização das emulsões múltiplas, este trabalho forneceu informações que podem ser utilizadas para otimização deste sistema e sua posterior aplicação na formulação de alimentos. Sendo assim, o campo de estudo ainda é muito vasto, pois para aplicação industrial ainda deve ser avaliada a estabilidade sob condições de produção, como agitação e tratamento térmico.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização do óleo de abacate pode agregar valor nutricional às emulsões múltiplas por apresentar grandes quantidades dos ácidos graxos oléico e linoleico (69,8%), compostos benéficos a saúde humana, pois são associados à prevenção de doenças cardiovasculares.
- Neste contexto é possível também utilizar as emulsões múltiplas para formulação de alimentos funcionais com potencial de encapsulação de componentes, como o NaCl.
- Através da microscopia e DLS não foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tamanho médio das gotas, indicando estabilidade contra a coalescência para as condições estudadas
- O tipo de tensoativo hidrofílico se mostrou significativo e altamente influente na viscosidade das amostras, sendo o Tween 40 o principal responsável por produzir emulsões mais viscosas, seguido da utilização da emulsão primária com maior conteúdo de gelatina e da temperatura. Sendo assim, a emulsão múltipla que apresentou maior viscosidade foi a EM024004 (5% de PGPR, 4% de gelatina, 2% de Tween 40 a 4°C).
- Os resultados obtidos com a reologia corroboraram com a visualização da separação de fases das amostras: quanto maior a viscosidade, menor a separação. Como, por exemplo, a EM024004 e a EM024025 apresentaram 100% de estabilidade.
- As emulsões múltiplas contendo Tween 40, também apresentaram significativamente melhor eficiência de encapsulação. Da mesma forma, a manutenção das emulsões a 4°C forneceu respostas de eficiência de encapsulação significativamente maiores às amostras armazenadas a 25°C. A utilização do Tween 40 em conjunto com a EP01, que possui maior quantidade de PGPR (6%), proporcionou a formação de uma emulsão múltipla, a EM014004, com maior eficiência de encapsulação.
- A maior quantidade de gelatina (5%) em substituição a parte do conteúdo de PGPR foi eficiente ao formar uma emulsão primária com as mesmas características, além de proporcionar a formulação de uma EM com alta viscosidade e estabilidade para separação de fases, se utilizado o Tween 40 como tensoativo hidrofílico.

## REFERÊNCIAS

AOCS - OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Método Ce 2-66**. Champaign: AOCS Press, 1997.

AOCS - OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Método Ce 1F-96**. Champaign: AOCS Press, 1998.

AOCS - OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Método Ca 12-55**. Champaign: AOCS Press, 2009.

BARNES, H. A. Thixotropy - a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanis**, v. 257, n. 97, p. 4–9, 1997.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. 1 ed. Oxford: Elsevier, 1989.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 294, n. 1-3, p. 20–32, 2007.

BENNA-ZAYANI, M.; KBIR-ARIGUIB, N.; TRABELSI-AYADI, M.; GROSSIORD, J. L. Stabilisation of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 316, n. 1-3, p. 46–54, 2008.

BERASATEGI, I.; BARRIUSO, B.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 439–446, 2012.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Transport Phenomena**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2002.

BONNET, M.; CANSELL, M.; BERKAOUI, A. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 92–101, 2009.

BOOM, R. M. Emulsions: Principles and preparation. **Food Materials Science: Principles and Practice**. New York: Springer, 1998. p.305–339.

BRENTAG FOOD & NUTRITION EUROPE. **Emulsifiers**. Disponível em: <[http://www.brenntag.ru/en/downloads/Food/TB\\_Emulsifiers\\_FNFN201109.pdf](http://www.brenntag.ru/en/downloads/Food/TB_Emulsifiers_FNFN201109.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2014 .

CHEMMUNIQUE. **The HLB System: a time-saving guide to emulsifier selection**. Wilmington: ICI Americas Inc., 2004.

COTTREL, T.; PEIJ, J. VAN. Sorbitan esters and polysorbates. In: **Emulsifiers in Food Technology**. 1 ed. Oxford: Blackwell, 2004. p.162–183.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1.ed. São Paulo: Blucher, 2012.

DANIELI, F. **O óleo de abacate (Persea americana Mill) como matéria-prima para a indústria alimentícia**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

DICKINSON, E. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. **Food Biophysics**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2011.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Notification for Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR) in Vegetable Fat Coatings**. Disponível em: <[http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras\\_notices/grn000266.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000266.pdf)>. Acesso em: 30 DEZ. 2015 .

FECHNER, A.; KNOTH, A.; SCHERZE, I.; MUSCHIOLIK, G. Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 5-6, p. 943–952, 2007.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LARDIÈRES, J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 2, p. 127–134, 2000.

GARTI, N. Double emulsions - scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces**, v. 113, p. 155–163, 1996.

GARTI, N. Progress in Stabilization and Transport Phenomena of Double Emulsions in Food Applications. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 222–235, 1997.

GUARACIARA, C.; TEIXEIRA, F.; AVELINO, A. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista de Ciências Exatas - UFRRJ**, v. 25, p. 59–71, 2006.

HAMINIUK, C. W. I. **Estudo do comportamento reológico e colorimétrico de misturas ternárias e sistemas pécticos de polpas de morango, amora-preta e framboesa**. 124 f. Tese. (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

HASENHUETTL, G. L.; HARTEL, R. **Food Emulsifiers and Their Applications**. 2 ed. New York: Springer, 2008.

HERNÁNDEZ-MARÍN, N. Y.; LOBATO-CALLEROS, C.; VERNON-CARTER, E. J. Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 181–187, 2013.

HUNTER, R. J.; WHITE, L. R.; CHAN, D. Y. C. **Foundations of colloid science**. New York: Oxford University Press, 1989.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 2008.

IQBAL, S.; BALOCH, M. K.; HAMEED, G.; MCCLEMENTS, D. J. Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1613–1620, 2013.

JIAO, J.; BURGESS, D. J. Multiple Emulsion Stability: Pressure Balance and Interfacial Film Strength. In. **Multiple emulsions: Technology and Applications**. 1 ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2008. p. 1-27.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 64–74, 2013.

KAWAGUCHI, M. Silicone oil emulsions stabilized by polymers and solid particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 233, p. 186–199, 2015.

KOVÁCS, A.; CSÓKA, I.; KÓNYA, M.; et al. Structural analysis of w/o/w multiple emulsions by means of DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 82, n. 2, p. 491–497, 2005.

LUTZ, R.; ASERIN, A.; WICKER, L.; GARTI, N. Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 178–185, 2009.

MATOS, M.; GUTIÉRREZ, G.; IGLESIAS, O.; COCA, J.; PAZOS, C. Enhancing encapsulation efficiency of food-grade double emulsions containing resveratrol or vitamin B12 by membrane emulsification. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 212–220, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. 109–124, 2007.

MORAIS, J. M. DE. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. 231 f. Tese. (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

MURPHY, R. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 25–30, 1997.

MUSCHIOLIK, G. Multiple emulsions for food use. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, n. 4-5, p. 213–220, 2007.

MYERS, D. **Surfactant science and technology**. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

O'REGAN, J.; MULVIHILL, D. M. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 224–231, 2010.

OPPERMANN, A. K. L.; RENSSSEN, M.; SCHUCH, A.; STIEGER, M.; SCHOLTEN, E. Effect of gelation of inner dispersed phase on stability of (w1/o/w2) multiple emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 17–26, 2015.

PAWLIK, A.; COX, P. W.; NORTON, I. T. Food grade duplex emulsions designed and stabilised with different osmotic pressures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 352, n. 1, p. 59–67, 2010. Elsevier.

PAYS, K.; GIEMANSKA-KAHN, J.; POULIGNY, B.; BIBETTE, J.; LEAL-CALDERON, F. Double emulsions: How does release occur? **Journal of Controlled Release**, v. 79, n. 1-3, p. 193–205, 2002.

PEREZ-MORAL, N.; WATT, S.; WILDE, P. Comparative study of the stability of multiple emulsions containing a gelled or aqueous internal phase. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 215–222, 2014.

PIANOVSKI, A. R.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões múltiplas O/A/O com óleo de pequi. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 155–159, 2008.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 5–41, 2013.

POTIER, L.; RAYNAL, S.; SEILLER, M.; GROSSIORD, J. L.; CLAUSSE, D. Study of state transitions within multiple W/O/W using calorimetry (DSC). **Thermochim Acta**, v. 204, p. 145–155, 1992.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; PEDROZA-ISLAS, R.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; BERISTAIN, C. I.; VERNON-CARTER, E. J. Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 7, p. 351–359, 2004.

ROSANO, H. L.; GANDOLFO, F. G.; HIDROT, J. D. P. Stability of W1/O/W2 multiple emulsions influence of ripening and interfacial interactions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 138, n. 1, p. 109–121, 1998.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012.

SAPEI, L.; NAQVI, M. A.; ROUSSEAU, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 316–323, 2012.

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

SCHUCH, A.; DEITERS, P.; HENNE, J.; KÖHLER, K.; SCHUCHMANN, H. P. Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: Droplet breakup and release of water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 402, p. 157–164, 2013.

SCHUCH, A.; KÖHLER, K.; SCHUCHMANN, H. P. Differential scanning calorimetry (DSC) in multiple W/O/W emulsions: A method to characterize the stability of inner droplets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1881–1890, 2013.

SILVA, S. R.; CANTUARIAS-AVILÉS, T. Situação Atual e Perspectivas da Cadeia Produtiva do Abacate no Brasil. Disponível em: < <http://www.esalq.usp.br/cprural/artigos/mostra/32>> Acesso em 20 nov. 2014.

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

SU, J.; FLANAGAN, J.; HEMAR, Y.; SINGH, H. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2-3 SPEC. ISS., p. 261–268, 2006.

SU, J.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. Improving encapsulation efficiency and stability of water-in-oil-in-water emulsions using a modified gum arabic (Acacia (sen) SUPER GUM™). **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 1, p. 112–120, 2008.

SURH, J.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; MUN, S.; MCCLEMENTS, D. J. Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 175–184, 2007.

TADROS, T. F. Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, p.39-55, 1994.

TADROS, T. F. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In.: **Emulsion Formation and Stability**. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. p. 1–10.

TANGO, J. S.; TURATTI, J. M. Óleo de abacate. In.: **Abacate: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2 ed. Campinas: ITAL, 1992. p.156-192.

ULBRICHT, T. L. V.; SOUTHGATE, D. A. T. Coronary heart disease: seven dietary factors. **The Lancet**, v. 338, n. 8773, p. 985–992, 1991.

USHIKUBO, F. Y.; CUNHA, R. L. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 145–153, 2014.

WEISS, J.; SCHERZE, I.; MUSCHIOLIK, G. Polysaccharide gel with multiple emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 3, p. 605–615, 2005.

## APÊNDICE

### TABELAS DE CONCENTRAÇÃO SALINA

TABELA A-1: CONCENTRAÇÃO SALINA LIBERADA PARA A FASE AQUOSA EXTERNA PELO PERÍODO DE 20 DIAS PARA A EM014004 E EM014025 (6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40)

Dia	EM014004		EM014025	
	Condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)	Condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)
1	293 $\pm$ 12	94,8 $\pm$ 5,6	426 $\pm$ 3	159,3 $\pm$ 1,2
3	303 $\pm$ 7	99,7 $\pm$ 3,2	436 $\pm$ 6	164,4 $\pm$ 2,9
5	308 $\pm$ 9	102,3 $\pm$ 3,9	452 $\pm$ 19	172,0 $\pm$ 9,0
7	317 $\pm$ 12	106,7 $\pm$ 5,8	470 $\pm$ 16	180,7 $\pm$ 7,5
9	327 $\pm$ 10	111,3 $\pm$ 4,6	488 $\pm$ 16	189,7 $\pm$ 7,8
11	335 $\pm$ 13	115,4 $\pm$ 6,3	504 $\pm$ 9	197,4 $\pm$ 4,4
14	342 $\pm$ 13	118,8 $\pm$ 6,3	537 $\pm$ 6	213,2 $\pm$ 2,7
17	352 $\pm$ 15	123,7 $\pm$ 7,3	569 $\pm$ 4	229,0 $\pm$ 1,9
20	361 $\pm$ 9	128,0 $\pm$ 4,4	598 $\pm$ 5	242,8 $\pm$ 2,2

TABELA A-2: CONCENTRAÇÃO SALINA LIBERADA PARA A FASE AQUOSA EXTERNA PELO PERÍODO DE 20 DIAS PARA A EM018004 E EM0180025 (6% DE PGPR, 3% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80)

Dia	EM018004		EM0180025	
	Condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)	Condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)
1	526 $\pm$ 18	207,86 $\pm$ 8,49	690 $\pm$ 37	287,43 $\pm$ 17,71
3	588 $\pm$ 2	237,94 $\pm$ 0,73	741 $\pm$ 5	312,18 $\pm$ 2,18
5	599 $\pm$ 3	243,52 $\pm$ 1,46	756 $\pm$ 2	319,70 $\pm$ 0,97
7	621 $\pm$ 14	253,95 $\pm$ 6,55	777 $\pm$ 8	329,65 $\pm$ 3,64
9	656 $\pm$ 7	270,94 $\pm$ 3,15	790 $\pm$ 4	336,20 $\pm$ 1,94
11	668 $\pm$ 1	277,00 $\pm$ 0,49	808 $\pm$ 3	344,93 $\pm$ 1,46
14	678 $\pm$ 5	281,61 $\pm$ 2,18	832 $\pm$ 6	356,33 $\pm$ 2,67
17	715 $\pm$ 6	299,56 $\pm$ 2,67	844 $\pm$ 4	362,40 $\pm$ 1,94
20	732 $\pm$ 8	307,81 $\pm$ 3,64	878 $\pm$ 14	378,89 $\pm$ 6,79

TABELA A-3: CONCENTRAÇÃO SALINA LIBERADA PARA A FASE AQUOSA EXTERNA PELO PERÍODO DE 20 DIAS PARA A EM024004 E EM024025 (5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 40)

Dia	EM024004		EM024025	
	Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)	Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)
1	336 $\pm$ 11	115,67 $\pm$ 5,09	442 $\pm$ 3	167,10 $\pm$ 1,21
3	381 $\pm$ 22	137,75 $\pm$ 10,67	502 $\pm$ 6	196,22 $\pm$ 2,67
5	409 $\pm$ 4	151,33 $\pm$ 1,94	535 $\pm$ 1	212,47 $\pm$ 0,49
7	417 $\pm$ 2	155,22 $\pm$ 0,97	544 $\pm$ 2	216,59 $\pm$ 0,73
9	421 $\pm$ 1	157,16 $\pm$ 0,49	563 $\pm$ 7	225,81 $\pm$ 3,15
11	427 $\pm$ 4	159,83 $\pm$ 1,70	580 $\pm$ 3	234,30 $\pm$ 1,46
14	435 $\pm$ 3	163,71 $\pm$ 1,21	636 $\pm$ 6	261,23 $\pm$ 2,67
17	444 $\pm$ 4	168,07 $\pm$ 1,70	703 $\pm$ 11	293,74 $\pm$ 5,09
20	474 $\pm$ 23	182,87 $\pm$ 11,16	800 $\pm$ 20	340,81 $\pm$ 9,46

TABELA A-4: CONCENTRAÇÃO SALINA LIBERADA PARA A FASE AQUOSA EXTERNA PELO PERÍODO DE 20 DIAS PARA A EM28004 E EM028025 (5% DE PGPR, 4% DE GELATINA E 2% DE TWEEN 80)

Dia	EM28004		EM028025	
	Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)	Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Concentração (ppm)
1	527 $\pm$ 7	208,59 $\pm$ 3,40	705 $\pm$ 29	294,95 $\pm$ 14,07
3	553 $\pm$ 5	220,96 $\pm$ 2,18	781 $\pm$ 6	331,59 $\pm$ 2,67
5	563 $\pm$ 4	225,81 $\pm$ 1,70	808 $\pm$ 4	344,93 $\pm$ 1,94
7	609 $\pm$ 8	248,38 $\pm$ 3,88	815 $\pm$ 2	348,08 $\pm$ 0,73
9	627 $\pm$ 4	257,11 $\pm$ 1,94	831 $\pm$ 2	355,85 $\pm$ 0,73
11	634 $\pm$ 2	260,51 $\pm$ 0,97	837 $\pm$ 3	358,76 $\pm$ 1,21
14	639 $\pm$ 1	262,93 $\pm$ 0,49	853 $\pm$ 4	366,52 $\pm$ 1,70
17	647 $\pm$ 5	266,81 $\pm$ 2,43	868 $\pm$ 2	373,80 $\pm$ 0,73
20	652 $\pm$ 4	269,00 $\pm$ 1,70	936 $\pm$ 5	406,79 $\pm$ 2,18