

LUCAS DE SOUZA SOARES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO QUITOSANO COMO ESTABILIZANTE DE
EMULSÕES ALIMENTARES ÁCIDAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S676a
2015 Soares, Lucas de Souza, 1989-
 Avaliação do potencial do quitosano como
estabilizante de emulsões alimentares ácidas / Lucas de
Souza Soares. - Viçosa, MG, 2015.
 xii, 64f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador : Eduardo Basílio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.53-60.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Emulsões.
3. Quitosana. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa
de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664

LUCAS DE SOUZA SOARES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO QUITOSANO COMO ESTABILIZANTE DE
EMULSÕES ALIMENTARES ÁCIDAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2015.

Álvaro Vianna Novaes de Carvalho
Teixeira
(Coorientador)

João Marcos de Araújo
(Coorientador)

Alexandre Gurgel

Eduardo Basílio de Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais, Márcio e Tânia
Aos meus irmãos, Athos e Gabriel
Dedico!

“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo de que se gosta,
mas gostar daquilo que se faz.”
Leonardo Da Vinci

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade e pelos recursos investidos durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de recursos financeiros ao projeto.

Ao professor Eduardo Basílio de Oliveira, por todos os ensinamentos e pelas orientações feitas durante a elaboração, condução dos experimentos e análise dos resultados do projeto. Pela confiança, apoio, dedicação e cuidado e, sobretudo, por acreditar em mim como profissional.

Aos professores Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Jane Sélia Coimbra dos Reis e João Marcos de Araújo, pelo excelente convívio, pelos valiosos ensinamentos e pela preciosa colaboração como co-orientadores desse trabalho.

Aos professores Afonso Mota Ramos (DTA), Eber Antonio Alves Medeiros (DTA), Luciano de Moura Guimarães (DPF), Luís Antônio Minim (DTA), Marcio Arêdes Martins (DEA), Nélcio José de Andrade (DTA), Nilda de Fátima Ferreira Soares (DTA), Paulo César Stringheta (DTA), Paulo Henrique Alves da Silva (DTA) e Silvia das Graças Pompolo (DBG). A realização desse trabalho não teria sido possível sem a gentil colaboração desses professores, que nos disponibilizaram os equipamentos alocados nos laboratórios por eles coordenados.

Ao professor Alexandre Gurgel, pela participação na banca de defesa e pelas sugestões dadas para a conclusão do trabalho.

Ao professor Luís Henrique Mendes da Silva, pelos inúmeros ensinamentos e pelas contribuições feitas ao projeto.

A Janaína Teles de Faria, Danielle de Almeida Paula e Jussara Moreira Coelho pelas prazerosas horas de conversas e discussão, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Engenharia de Processos, por terem me recebido tão bem e pela amizade.

Aos colegas dos laboratórios de Operações e Embalagens de Alimentos, pela colaboração e ótima convivência.

À Lucia Maria Santos Xavier, Laura Fernandes de Melo Correia e Sabrina Késsia Gonçalves Pereira, pelo carinho, atenção e amizade.

Às amigas do “Vilarejo”, Andressa Cristina Gaione Mendes, Nayara Benedito Martins da Silva e Paula de Oliveira Lima, pela amizade, apoio e incentivo.

Às professoras Consuelo Domenici Roberto, Elisabete Fantuzzi e Patrícia Campos Bernardes, da UFES, pelo apoio e incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCAS DE SOUZA SOARES, filho de Márcio Augusto Soares e Tânia Fernandes de Souza, nasceu em Coronel Fabriciano, Minas Gerais, em 20 de setembro de 1989.

Em março de 2005 iniciou o curso técnico em Agropecuária, na Escola Agrotécnica de Alegre, concluído em dezembro de 2007.

Em março de 2008 iniciou a graduação em Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal do Espírito Santo, concluída em julho de 2013.

Em julho de 2013 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na UFV, submetendo-se à defesa de sua dissertação em fevereiro de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1. Emulsões	4
3.1.1. Aspectos termodinâmicos de formação	4
3.1.2. Mecanismos de desestabilização e estabilidade cinética de emulsões	7
3.1.3. Emulsificantes de baixa massa molar	8
3.1.4. Estabilizantes e espessantes poliméricos	10
3.2. Quitosano	12
3.2.1. Obtenção, estrutura molecular e propriedades físico-químicas	12
3.2.2. Aplicações na área médico-farmacêutica	16
3.2.3. Aplicações na área de alimentos	17
3.2.4. Aplicações em sistemas-modelo	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Material	27
4.1.1. Instalações e equipamentos	27
4.1.2. Reagentes químicos e materiais diversos	28
4.1.3. Soluções ácidas	28
4.2. Metodologia	30

4.2.1.	Planejamento experimental	30
4.2.2.	Preparo das emulsões	30
4.2.3.	Análise das emulsões	30
4.2.4.	Avaliação reológica das emulsões	31
4.2.5.	Análises visuais.....	33
4.2.6.	Análise do tamanho das gotículas de óleo	34
4.2.7.	Análise do potencial ζ das gotículas de óleo	35
4.2.8.	Determinação da tensão interfacial das soluções de quitosano....	36
4.2.9.	Tratamento estatístico dos resultados.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1.	Avaliação do comportamento reológico das emulsões	38
5.1.1.	Comportamento ao escoamento	38
5.1.2.	Ensaio dinâmico-oscilatório - varreduras de frequência	40
5.2.	Análises visuais e do índice de cremação das emulsões (IC)	41
5.3.	Tamanhos médios das gotículas de óleo.....	43
5.4.	Avaliação do tamanho e do potencial zeta das gotículas de óleo.....	46
5.5.	Efeito da adição de quitosano sobre a tensão interfacial de sistemas compostos por soluções aquosas de ácido láctico e óleo de girassol.....	49
6.	CONCLUSÃO.....	52
7.	REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE 1 - Reogramas das emulsões contendo 0,1% (m/V) de quitosano (A), não contendo nenhum polissacarídeo (B), na fase contínua com pH 3,5..		61
APÊNDICE 2 - Tamanho médio das populações de gotículas de óleo das emulsões, em t = 0 e t = 7 dias		62
APÊNDICE 3 - Distribuição de tamanho das populações de gotículas de óleo das emulsões, em t = 0 e t = 7 dias		63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de desestabilização das emulsões	7
Figura 2 - Estrutura química do emulsificante Tween 20	9
Figura 3 - Fluxograma de obtenção do quitosano pelo processo industrial	13
Figura 4 - Ilustrações de um produto nutracêutico composto por quitosano em cápsulas e da aparência do quitosano em pó.....	14
Figura 5 - Estruturas moleculares da celulose (A), quitina (B) e quitosano (C)	15
Figura 6 - Estruturas moleculares dos ácidos cítrico (A) e láctico (B), respectivamente, INS 330 e 270.....	19
Figura 7 - Representação esquemática das etapas de preparação das emulsões e das análises realizadas	31
Figura 8 - Varreduras de frequência em dinâmicos oscilatórios das emulsões Q35 (A) e A35 (B). ● G' , ○ G'' e ■ $\tan\delta$	40
Figura 9 - Tamanhos médios das gotículas de óleo das populações existentes em cada uma das emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias (na figura, barras com cores mais fortes indicam o tamanho médio das gotículas em $t = 0$, enquanto as barras com cores menos intensas indicam o tamanho médio em $t = 7$ dias)....	44
Figura 10 - Potencial ζ das gotículas de óleo, em $t = 0$ e $t = 7$ dias	47
Figura 11 - Tensão interfacial da solução ácida (pH 3,5) contendo 0,05% (m/V) de quitosano e 1% (V/V) de Tween 20 e de uma solução ácida (pH 3,5) contendo 1% (V/V) de Tween 20, em função do tempo.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplos de estudos em que se avaliou a viscosidade de soluções de quitosano, com concentrações variadas, solubilizado em diferentes meios ácidos	21
Quadro 2 - Exemplos de estudos em que se caracterizaram emulsões contendo quitosano solubilizado na fase contínua	23
Quadro 3 - Equipamentos utilizados na preparação e análise das soluções e emulsões	27
Quadro 4 - Descrição dos reagentes químicos e outros materiais utilizados para a preparação das soluções e das emulsões.....	28
Quadro 5 - Soluções ácidas e tratamentos (emulsões) obtidos a partir dessas soluções.....	28
Quadro 6 - Características físicas das soluções ácidas contendo 0,1% (m/V) de quitosano utilizadas como fase contínua durante o preparo das emulsões	29
Quadro 7 - Parâmetros reológicos e indicadores de adequação dos modelos matemáticos utilizados para caracterizar as emulsões.....	38
Quadro 8 - Fotografias das diferentes emulsões, em t = 0 e t = 7 dias.....	42
Quadro 9 - Índice de cremeação (IC) das emulsões, em t = 7 dias	42

RESUMO

SOARES, Lucas de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Avaliação do potencial do quitosano como estabilizante de emulsões alimentares ácidas**. Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira. Coorientadores: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Jane Sélia Coimbra dos Reis e João Marcos de Araújo.

No presente trabalho, objetivou-se formular e caracterizar emulsões O/A contendo quitosano disperso na fase contínua. Para isso, adicionou-se 0,1% (m/V) de quitosano e 1% (V/V) do emulsificante Tween 20 às soluções de ácido láctico (pH 3,0, 3,5 e 4,0) e utilizaram-se as misturas resultantes como fase contínua para a preparação de emulsões-modelo, com 10% (V/V) de óleo. O processo de emulsificação consistiu em uma dispersão em Ultra Turrax (24.000 rpm, 1 min), seguida de seis passagens por um homogeneizador de alta pressão (69 MPa). Avaliou-se o comportamento reológico, as características visuais, o tamanho médio e o potencial ζ das gotículas de óleo das emulsões, imediatamente após a fabricação das emulsões ($t = 0$) e após sete dias ($t = 7$). Adicionalmente, a fim de constatar uma eventual interação direta do quitosano com a interface O/A, avaliou-se a tensão interfacial entre o óleo de girassol e as soluções ácidas de quitosano. Observou-se que as emulsões contendo quitosano apresentaram-se três vezes mais viscosas, em relação ao controle (solução de ácido láctico e 1% V/V de Tween 20, sem adição de quitosano), entretanto não diferiram estatisticamente entre si. Pelas análises visuais não foram observadas diferenças evidentes entre as emulsões contendo quitosano e os controles, em $t = 7$. As emulsões contendo quitosano apresentaram duas populações de gotículas de óleo (≈ 30 nm e ≈ 500 nm) e valores de potencial $\zeta \approx 50$ mV, em $t = 0$ e $t = 7$, enquanto os controles apresentaram apenas uma população (≈ 700 nm), em $t = 0$ e $t = 7$. Observou-se que o quitosano contribuiu para a redução do valor da tensão interfacial de equilíbrio, entre o óleo e solução aquosa de ácido láctico. Dessa forma, concluiu-se que o quitosano apresentou ação estabilizante nas emulsões O/A.

ABSTRACT

SOARES, Lucas de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Chitosan potential evaluation as a stabilizer of acidic food emulsions**. Adviser: Eduardo Basílio de Oliveira. Co-advisers: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Jane Sélia Coimbra dos Reis and João Marcos de Araújo.

The aim of this study was to develop and characterize O/W emulsions containing chitosan dispersed in the continuous phase. For this purpose, 0,1% (w/V) of chitosan and 1% (V/V) of Tween 20 emulsifier were added in lactic acid solutions (pH 3.0, 3.5 or 4.0) and the resulting mixtures were used as the continuous phase for the preparation of model emulsions, with 10% (V/V) oil. The emulsification process consisted of a dispersion in Ultra Turrax (24,000 rpm, 1 min), followed by six passages through a high-pressure homogenizer (69 MPa). The rheological behavior, the visual characteristics, the average size and ζ -potential of the oil droplets of the emulsions were assessed immediately after the preparation of the emulsions ($t = 0$) and after seven days ($t = 7$). Additionally, in order to examine possible interactions of chitosan at the O/W interface, the interfacial tension between the sunflower oil and the acidic chitosan solutions was determined. It was observed that the emulsions containing chitosan proved to be three times more viscous when compared to control (lactic acid solution and 1% V/V Tween 20, without chitosan), though they were not statistically different. By visual analysis obvious differences could not be observed between the emulsions containing chitosan and controls at $t = 7$. The emulsions containing chitosan showed two populations of oil droplets (≈ 30 nm and ≈ 500 nm) and ζ -potential values ≈ 50 mV, at $t = 0$ and $t = 7$, whilst controls showed a single population (≈ 700 nm), at $t = 0$ and $t = 7$. It was concluded that the chitosan can contribute to reduce the value of the equilibrium interfacial tension between the oil and aqueous lactic acid. Thus, the results suggest that chitosan has potential applicability as stabilizer of O/W emulsions.

1. INTRODUÇÃO

Emulsões são sistemas coloidais formados por um líquido imiscível disperso na forma de gotículas (com tamanhos da ordem de micrômetros) em outro líquido. Por exemplo, em uma emulsão óleo-em-água (O/A) as gotículas de óleo estão dispersas em uma fase aquosa. O contato entre dois líquidos imiscíveis causa o aumento do potencial químico do sistema que, em condições de pressão e temperatura constantes, é representado pelo aumento da energia livre de Gibbs. A razão da variação da energia livre de Gibbs pela variação da área desse sistema é definida como tensão interfacial (γ), e indica o quão desfavorável energeticamente é o contato entre os dois líquidos imiscíveis. Assim, as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis que tendem à separação das fases, a fim de minimizar o contato das mesmas.

Entretanto, a produção de emulsões cineticamente estáveis (durante um dado intervalo de tempo) pode ser possibilitada pela utilização de agentes emulsionantes que se posicionam na interface dos dois líquidos, reduzindo a tensão interfacial do sistema. Simultaneamente, os emulsificantes podem contribuir para a estabilização do sistema pelos mecanismos de repulsão eletrostática e/ou estérica entre as gotículas. Além disso, a estabilização cinética do sistema pode ser favorecida por agentes espessantes que aumentam a viscosidade da fase contínua, reduzindo a velocidade das gotículas em movimento browniano e, com isso, a frequência e a intensidade dos choques entre as mesmas. Em emulsões alimentícias é frequente a utilização de diversos polissacarídeos (celuloses modificadas, gomas guar e xantana, por exemplo) atuando como espessantes e estabilizantes e, assim, contribuindo para a manutenção da estabilidade cinética de emulsões. Além disso, a busca por novos ingredientes, bem como o estudo de sistemas-modelo para a caracterização dos mecanismos de ação, fomentam muitas atividades de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos.

Nesse contexto, surge como uma alternativa inovadora a incorporação de quitosano em produtos alimentícios. Quitosano é um biopolímero industrialmente obtido pela desacetilação da quitina, que é extraída das carapaças de crustáceos (subprodutos das indústrias de processamento de

pescado). Em condições ambientais, esse biopolímero apresenta-se sob a forma de pós ou flocos de granulometria variável, esbranquiçado, opaco, pouco denso e inodoro. Já foi comprovada sua inocuidade toxicológica, sua biocompatibilidade com tecidos humanos e sua biodegradabilidade, o que possibilita muitas aplicações tecnológicas já conhecidas. Por exemplo, na área médico-farmacêutica o quitosano é utilizado na fabricação de excipientes para fármacos e de próteses ósseas e dérmicas, ou ainda, como inibidor da absorção de lipídios no trato gastrointestinal (consumido diretamente em cápsulas).

Se por um lado as aplicações do quitosano na área médico-farmacêutica são abundantes, na indústria de alimentos essas ainda são limitadas. Há, de acordo com a nossa análise da literatura, alguns trabalhos que mencionam sua utilização em filmes plásticos para embalagens e em revestimentos comestíveis. Entretanto, não foram encontrados estudos específicos relatando a utilização do quitosano diretamente como ingrediente ou aditivo em formulações alimentícias emulsionadas.

Com efeito, se disperso ou solubilizado em alimentos fluidos o quitosano poderia ter ação espessante e estabilizante, consistindo em uma alternativa a outros polissacarídeos utilizados para esse fim. O interesse disso reside no fato de que, simultaneamente ao papel espessante/estabilizante, o quitosano poderia ter um papel biofuncional, devido à sua já mencionada capacidade de restringir a biodisponibilidade de lipídios no trato gastrointestinal. Todavia, para que tais aplicações sejam futuramente possibilitadas, necessita-se antes da compreensão das interações moleculares e dos efeitos físicos do quitosano adicionado a emulsões-modelo. Diante disso, no presente trabalho, buscou-se analisar os efeitos da adição de quitosano em emulsões-modelo, a fim de verificar se esse polímero apresenta um potencial de aplicação como estabilizante de emulsões.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Formular e caracterizar emulsões O/A, contendo quitosano disperso na fase contínua aquosa.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar soluções ácidas contendo 0,1% (m/V) de quitosano, a partir da adição do polissacarídeos à soluções de ácido láctico com valores de pH iguais a 3,0; 3,5 e 4,0.
- Preparar emulsões-modelo O/A, a partir das soluções ácidas contendo quitosano.
- Caracterizar o comportamento reológico das emulsões, em $t = 0$ dias.
- Analisar visualmente as emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias.
- Determinar o tamanho médio e o potencial ζ das gotículas de óleo das emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias.
- Analisar a tensão interfacial entre o óleo e soluções ácidas contendo o quitosano.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Emulsões

Essa seção objetiva definir o que são emulsões, além de apresentar uma breve descrição dos aspectos termodinâmicos relacionados à sua produção, aos mecanismos de desestabilização desses sistemas coloidais e o controle de sua desestabilização.

3.1.1. Aspectos termodinâmicos de formação

As emulsões são sistemas coloidais formados por um líquido finamente disperso sob a forma de gotículas em outro líquido. Exemplos de alimentos processados que são emulsões incluem creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada e recheios para bolos. O leite e a gema de ovo são emulsões naturalmente encontradas em alimentos.

Termodinamicamente, em um sistema heterogêneo formado por dois líquidos distintos e imiscíveis (A e B) a energia livre de Gibbs inicial é dada por:

$$G_i = G_{i,A} + G_{i,B} + G_{i,I} \quad (1)$$

Em que: $G_{i,A}$ e $G_{i,B}$ são os valores da energia livre de Gibbs associada aos líquidos A e B, respectivamente; $G_{i,I}$ é a energia livre de Gibbs associada à interface entre A e B.

Após a emulsificação do líquido B no líquido A, a energia livre de Gibbs do sistema emulsionado (G_e) é dada, analogamente, por:

$$G_e = G_{e,A} + G_{e,B} + G_{e,I} - T\Delta S_{config} \quad (2)$$

Em que: $T\Delta S_{config}$ representa a entropia configuracional do sistema, devido à formação de um grande número de gotículas dispersas.

Se a temperatura e a pressão permanecem constantes, a energia livre de Gibbs das fases, individualmente, permanece a mesma após a emulsificação. Dessa forma, a variação de energia livre de Gibbs no processo pode ser escrita como:

$$\Delta G = (G_{e,A} - G_{i,A}) + (G_{e,B} - G_{i,B}) + (G_{e,I} - G_{i,I}) - T\Delta S_{config} \quad (3)$$

$$\Delta G = (G_{e,I} - G_{i,I}) - T\Delta S_{config} \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta G_I - T\Delta S_{config} \quad (5)$$

Após a dispersão de um líquido em outro, devido ao aumento do número de posições possíveis no sistema para as gotículas criadas, o valor de ΔS_{config} torna-se positivo. Esse aumento de entropia pode ser estimado aplicando-se a Eq. 6:

$$\Delta S_{config} = \frac{n \cdot k}{\phi} \cdot [\phi \cdot \ln \phi + (1 - \phi) \cdot \ln(1 - \phi)] \quad (6)$$

Em que: k é a constante de Boltzmann ($1,3806488 \cdot 10^{-23} \text{ kg m}^2 \cdot \text{s}^{-2} \text{K}^{-1}$); n é o número de gotículas na emulsão; e ϕ é a fração volumétrica de fase dispersa.

Todavia, especificamente durante a produção de macro-emulsões, o valor numérico de ΔS_{config} é, na prática, muitas ordens de grandeza inferior ao valor de ΔG_I , podendo assim ser negligenciado (McCLEMENTS, 2005). Logo, a variação de energia livre na formação da emulsão é muito próxima do valor da variação de energia livre associada ao aumento da área interfacial no sistema:

$$\Delta G \approx \Delta G_I \quad (7)$$

Por outro lado, a termodinâmica clássica nos apresenta que a tensão interfacial (γ) entre dois líquidos se define como a razão entre o incremento da energia livre de Gibbs (G_I) necessário para aumentar a área interfacial em um sistema e o próprio valor do incremento dessa área (A). Matematicamente, isso pode ser assim expresso:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G_I}{\partial A} \right)_{P,T,n} \approx \left(\frac{\Delta G_I}{\Delta A} \right)_{P,T,n} \quad (8)$$

Ao se combinar as informações das Eq. 7 e 8, obtêm-se:

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A \quad (9)$$

Como os valores de γ e de ΔA são ambos positivos, o valor de ΔG também o é. Disso, depreende-se que a formação de emulsões é uma transformação não espontânea e que tais sistemas, uma vez formados, são termodinamicamente instáveis. Por isso, a fim de minimizar a área interfacial e, conseqüentemente, a energia livre de Gibbs do sistema, as emulsões tendem naturalmente à separação de fases.

Na indústria de alimentos e de cosméticos, as emulsões são comumente fabricadas utilizando-se equipamentos do tipo *rotor-stator* (moinhos coloidais) e homogeneizadores de alta pressão. Métodos em desenvolvimento para a produção de emulsões incluem a cavitação ultrassônica e a utilização de membranas. As diferentes técnicas de emulsificação podem produzir emulsões com gotículas de diâmetro médio entre 100 nm e 1 μ m (SANTANA, PERRECHIL e CUNHA, 2013). Entretanto, tais processos produzem emulsões polidispersas, ou seja, contendo gotículas com diâmetros dentro de uma faixa de valores, e não com valores uniformes. Quanto maior for essa variabilidade de tamanho, diz-se que as emulsões são mais polidispersas. Na verdade, emulsões monodispersas são extremamente difíceis de serem obtidas. Algumas pesquisas recentes na área de microfluidica buscam esse fim, mas para outras aplicações muito específicas.

Em termos práticos, durante a produção de emulsões as forças de cisalhamento devem fornecer uma taxa de energia significativamente maior do que o gradiente de pressão de Laplace:

$$\frac{dP}{dr} = \frac{2\gamma}{r^2} \quad (10)$$

Em que: r representa o raio das gotículas; γ , a tensão interfacial entre as fases; e $\frac{dP}{dr}$, o gradiente de pressão de Laplace.

A pressão de Laplace (ΔP_L), responsável por manter a forma esférica das gotículas, é determinada por:

$$\Delta P_L = \frac{2\gamma}{r} \quad (11)$$

Observa-se que ΔP_L tende a aumentar com a diminuição no tamanho das gotículas, ou seja, a energia necessária para deformar gotículas menores

deverá ser maior, durante a formação da emulsão. Por esse motivo, durante a emulsificação, uma grande quantidade de energia é requerida para deformar as gotículas e aumentar a área interfacial. Além disso, nota-se que o valor de ΔP_L tende a ser reduzido com a diminuição da tensão interfacial (γ).

3.1.2. Mecanismos de desestabilização e estabilidade cinética de emulsões

De acordo com McClements (2005), a separação de fases pode ocorrer por quatro mecanismos distintos: floculação, sedimentação ou cremação, amadurecimento de Ostwald e coalescência (Figura 1).

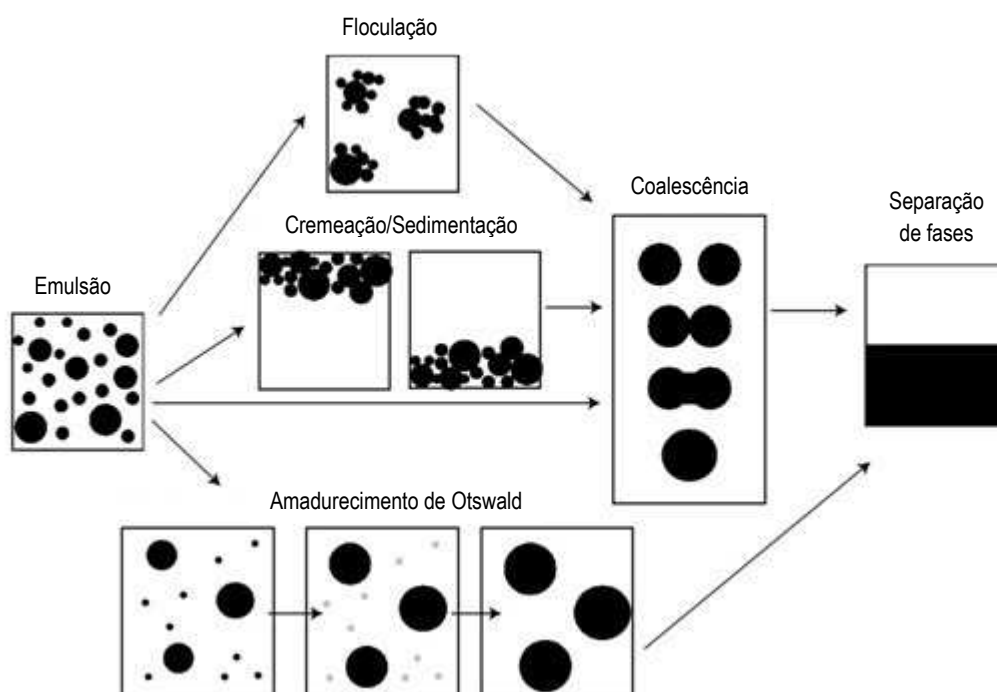


Figura 1 - Mecanismos de desestabilização das emulsões

Durante a floculação, a cremação ou a sedimentação, as gotículas se agregam sem que ocorra uma “fusão” entre as elas, ou seja, não há a perda da integridade do filme interfacial. Em muitos desses casos, uma agitação branda no sistema pode permitir a redispersão das gotículas e a recuperação da emulsão. Na floculação as gotículas se agregam formando *clusters* (estruturas similares a cachos), que permanecem dispersos na emulsão. Na cremação, as gotículas agregadas se elevam ao topo, enquanto na sedimentação os agregados tendem a emergir ao fundo, da emulsão. Na maturação de Ostwald,

por difusão mássica de moléculas presentes nas gotículas menores da emulsão, ocorre o aumento de tamanho das gotículas maiores, a fim de reduzir o potencial químico do sistema. Isso decorre do fato de a pressão interna (pressão de Pascal) das gotículas ser inversamente proporcional ao seu raio. A coalescência é um fenômeno mais drástico, em que as gotículas dispersas se fusionam sucessivamente até a separação definitiva das fases, isto é, a fase dispersa migra inteiramente para superfície ou para o fundo da emulsão, em função da diferença de densidade em relação à fase contínua.

Apesar da instabilidade intrínseca, existem estratégias para se controlar a velocidade com que as fases de uma emulsão irão se separar, o que pode viabilizar econômica e tecnologicamente a existência de produtos emulsionados.

A adição de tensoativos altera as propriedades interfaciais das emulsões propiciando estabilidade cinética ao meio (DALTIM, 2011). Quando um tensoativo é adsorvido na superfície das gotículas da fase dispersa, ele tende a diminuir a tensão interfacial e aumentar a viscosidade interfacial e, assim, propiciar a formação e a estabilização cinética das emulsões. Isso porque os tensoativos possuem, na mesma molécula, pelo menos uma região hidrofóbica e uma hidrofílica. Em uma emulsão O/A, por exemplo, as partes hidrofílicas tendem a interagir com a fase contínua, ou seja, a fase aquosa, e as partes hidrofóbicas com a fase dispersa, o óleo. Os tensoativos podem ser divididos em dois grandes grupos: emulsificantes de baixa massa molar e estabilizantes e/ou espessantes poliméricos.

3.1.3. Emulsificantes de baixa massa molar

De acordo com a presença de cargas elétricas explícitas em sua molécula, os emulsificantes de baixa massa molar podem ser classificados como aniônicos, não iônicos, catiônicos ou zwitteriônicos (apresentam um grupo catiônico e um aniônico). Exemplos de tensoativos não iônicos tradicionalmente utilizados em emulsões alimentares são: monolaurato de polioxietileno sorbitana (Tween 20), monopalmitato de polioxietileno sorbitana (Tween 40), monooleato de polioxietileno sorbitana (Tween 80), monoestearato de sorbitana (Span 60), trioleato de sorbitana (Span 85), monoestereato de propileno glicol

(Atlas 2158), monoestearato de glicerol (Atmul 84) e monoestearato de polioxietileno (Myrj 52). A principal diferença entre esses emulsificantes se relaciona à afinidade dos mesmos pela fase aquosa ou oleosa da emulsão. Nesse caso, o balanço lipofílico-hidrofílico (HLB, acrônimo em inglês de *hydrophile-lipophile balance*) pode ser utilizado durante a seleção de um emulsificante para uma determinada aplicação. O HLB é definido como a razão entre a massa molar dos grupos hidrofílicos sobre a massa molar total da molécula. Emulsificantes com baixo valor de HLB são indicados para a produção de emulsões A/O, enquanto aqueles com altos valores de HLB são para emulsões O/A. Na Figura 2 é apresentada a estrutura molecular do emulsificante Tween 20, utilizado na preparação das emulsões caracterizadas nesse trabalho.

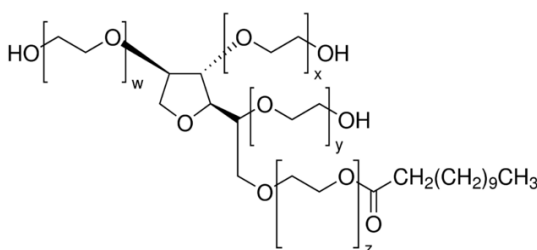


Figura 2 - Estrutura química do emulsificante Tween 20

Emulsificantes iônicos, catiônicos ou zwitteriônicos poderão originar cargas elétricas nas superfícies das gotículas dispersas em uma emulsão, sendo esse efeito devido a grupos carregados positiva ou negativamente presentes nos tensoativos adsorvidos na interface que, durante processo de adsorção e em função das características do meio dispersante, podem ser ionizados. A existência de carga elétrica na superfície das gotículas pode favorecer a repulsão eletrostática entre elas. Dessa forma, a agregação da fase dispersa e a desestabilização termodinâmica desse sistema podem ser desaceleradas.

Outro fator que inibe a desestabilização da emulsão é a repulsão estérica, que está relacionada à adoção de arranjos conformacionais das moléculas de surfactante que minimizem o número de contatos entropicamente

desfavoráveis de suas moléculas na superfície das gotículas de óleo e, portanto, mantêm as gotículas de óleo afastadas umas das outras.

De acordo Santana, Perrechil e Cunha (2013), variáveis como formulação, composição e processo de emulsificação são decisivas quando objetiva-se a formação de gotículas estáveis. As variáveis de formulação estão relacionadas às características físico-químicas das fases e do tensoativo, além da temperatura e outras condições ambientais, enquanto as de composição referem-se à proporção entre as fases e quantidade de emulsionante. Já o processo de emulsificação deve levar em consideração o tempo, a intensidade e o equipamento utilizado na homogeneização.

O tamanho das gotículas e a viscosidade são utilizados para descrever o efeito de cada variável na eficiência de homogeneização da emulsão, uma vez que estas variáveis são utilizadas para compreender os mecanismos de interação de diferentes emulsionantes em sistemas óleo-em-água durante o processo de emulsificação (SANTANA, PERRECHIL e CUNHA, 2013).

3.1.4. Estabilizantes e espessantes poliméricos

Outra forma que se tem de conferir certa estabilidade cinética de emulsões é pela adição de substâncias que elevem a viscosidade da fase contínua e, dessa forma, reduzam a velocidade das gotículas de óleo da fase dispersa em movimento browniano. Logo, a frequência e a intensidade dos choques entre as gotículas são reduzidas e, a desestabilização do sistema, desacelerada. Comumente, hidrocolóides são utilizados com essa finalidade (DICKINSON, 2009).

O termo hidrocoloide remete a um grupo bastante heterogêneo de biopolímeros de cadeia longa, elevada massa molar e caráter hidrofílico. Entretanto, devido à grande variedade e complexidade das estruturas químicas, essa definição torna-se vaga. Tanto proteínas quanto polissacarídeos poderiam se enquadrar nessa definição.

As proteínas são utilizadas, principalmente, como agentes emulsionantes. Durante a formação de uma emulsão O/A contendo proteínas, essas moléculas (muitas vezes desnaturadas, com sítios hidrofóbicos expostos) são adsorvidas sobre as superfícies das gotículas de óleo recém-

formadas, reduzem a tensão interfacial atuando, pois, como emulsificantes (McCLEMENTS, 2005). Além disso, uma vez adsorvidas na superfície das gotículas, proteínas podem favorecer a repulsão estérica e, dependendo do pH e da presença/concentração de sais, também a repulsão eletrostática, dificultando o contato e a consequente aglomeração dessas gotículas. Por fim, proteínas remanescentes na fase contínua das emulsões também podem aumentar a viscosidade da mesma, o que, como mencionado, pode contribuir para a estabilidade cinética da emulsão.

Na indústria de alimentos a aplicação de hidrocoloides com a finalidade de espessamento está quase totalmente restrita à utilização de polissacarídeos. Os polissacarídeos estão largamente distribuídos na natureza, desempenhando diversas funções biológicas. Com efeito, diversos hidrocoloides podem ser extraídos a partir de sementes, algas e animais, assim como de exsudados de plantas e fontes microbianas. Na literatura correlata, é comum referir-se a esses polissacarídeos como “gomas”, apesar de vários pesquisadores terem restrições ao uso desse termo por acharem-no vago e pouco específico.

Na estrutura molecular dos polissacarídeos existem abundantes grupamentos que conferem caráter hidrofílico às moléculas. De maneira simplificada, o espessamento do meio ocorre devido às interações físicas das cadeias poliméricas com moléculas de água, gerando aumento do atrito interno no fluido, o que se traduz macroscopicamente como um aumento na consistência/viscosidade. As gomam irão interagir mais ou menos favoravelmente entre si e com moléculas de água em função de duas características principais: estrutura química da molécula (massa molar, grau de polimerização, pureza, entre outras) e propriedades físico-químicas do meio (pH, força iônica, composição e temperatura).

Goma guar, goma xantana, celulosas modificadas e alguns tipos de pectinas são alguns exemplos de hidrocoloides tradicionalmente utilizados em alimentos emulsionados. Entretanto, diversos estudos têm objetivado apresentar, caracterizar e descrever a utilização de novos hidrocoloides em emulsões, bem como discutir contribuições que esses conferem para a estabilização das mesmas. Goma da amendoeira (MAHFOUDHI *et al.*, 2014),

do cajueiro (PORTO e CRISTIANINI, 2014), da coroa de espinhos (PERDUCA *et al.*, 2013), angum (JAFARI, BEHESHTI e ASSADPOOR, 2012) e do pessegueiro (QIAN *et al.*, 2011) são exemplos de hidrocoloides alvos de estudos recentes.

Além desses, nas últimas décadas, diversos estudos na área médico-farmacêutica vêm descrevendo as propriedades biológicas e físico-químicas do polissacarídeo quitosano. De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, a incorporação direta de quitosano em formulações de alimentos emulsionados ainda permanece a ser investigada. Contudo, a utilização desse polímero na estabilização de emulsões-modelo tem começado a ser alvo de estudos. Acredita-se que, caso constatada a atividade estabilizante e a partir da elucidação dos mecanismos, o quitosano possa ser mais uma opção de agente estabilizante para emulsões alimentares.

3.2. Quitosano

Inicialmente será apresentado um tópico relacionado à obtenção, estrutura molecular, propriedades físico-químicas do quitosano. Posteriormente, aplicações na área médico-farmacêutica, na área de alimentos e em emulsões-modelo serão resumidamente apresentadas e discutidas.

3.2.1. Obtenção, estrutura molecular e propriedades físico-químicas

Quitosano [poli- β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deóxi-D-glicopirranose] é o nome usual de um grupo de polissacarídeos obtidos por meio da reação de desacetilação total ou parcial da quitina, e utilizado em uma variedade de aplicações biotecnológicas (DHIWAR, TIWARI e BAJPAI, 2013; KHAN *et al.*, 2013; ANRAKUA *et al.*, 2014; ZAIN, STAPLEY e SHAMA, 2014). Os diversos quitosanos diferem principalmente quanto à proporção relativa de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina, ou seja, dos monômeros que formam a cadeia polimérica, e à massa molar (VÅRUM e SMIDSRØD, 2006).

Industrialmente, o processo de obtenção do quitosano consiste na desacetilação parcial da quitina [poli- β (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-deóxi-D-

glicopirranose], que é obtida a partir do exoesqueleto de lagostas, caranguejos, siris, camarões e crustáceos processados pela indústria pesqueira. Durante essa reação, uma grande parte dos grupos acetamido da quitina ($-\text{NHCOCH}_3$) são convertidos em grupos amino ($-\text{NH}_2$) dando origem ao quitosano (HONARKAR e BARIKANI, 2009).

Na Figura 3 são apresentadas as etapas de produção de quitosano pelo processo industrial convencional.

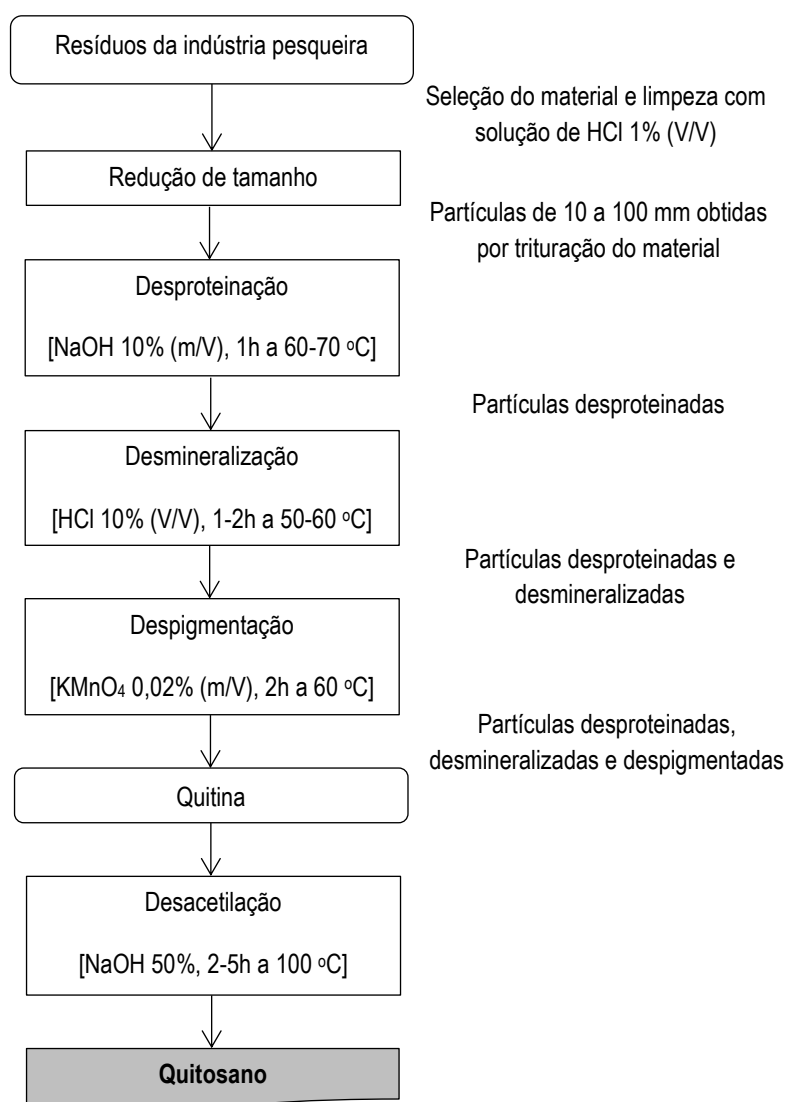


Figura 3 - Fluxograma de obtenção do quitosano pelo processo industrial

A primeira etapa do processo consiste na redução de tamanho das matérias-primas que pode ser realizada, por exemplo, submetendo o material a um moinho de facas. Então, realiza-se um tratamento para remoção de

proteínas com hidróxido de sódio. Em seguida, é realizada a desmineralização do material com ácido clorídrico, extraindo-se os carbonatos e fosfatos de cálcio presentes. O material também deverá passar por uma extração com permanganato de potássio (0,02%) a 60 °C, visando remover pigmentos como melaninas e carotenoides. Ao final desse processo obtém-se a quitina. A quitina obtida é então tratada com hidróxido de sódio concentrado (50%) a altas temperaturas (100 °C) por um período que varia de 2 a 5 horas, para que ocorra desacetilação, dando origem ao quitosano (KNORR, 1991).

Dentre os fatores que podem afetar a eficiência da reação de desacetilação e, por conseguinte, as características do quitosano obtido, podem-se citar a temperatura, o tempo de reação, a concentração da solução alcalina utilizada, a razão existente entre quitina e solução álcali, o tamanho das partículas de quitina, a atmosfera utilizada durante a reação e a presença de agentes que evitem a despolimerização (AZEVEDO *et al.*, 2007). Geralmente, considera-se que a quitina foi efetivamente convertida em quitosano quando se obtêm pelo menos 50% dos grupos acetamido desacetilados. O percentual médio de grupos desacetilados nas cadeias do quitosano é denominado “grau de desacetilação” (DD, acrônimo em inglês de *degree of deacetylation*). O prolongamento excessivo da reação de desacetilação pode provocar a hidrólise das cadeias poliméricas (KONG *et al.*, 2010), o que não é desejável do ponto de vista tecnológico. Quitosanos disponíveis para comercialização têm em geral DD entre 75 e 85% (SIGMA ALDRICH, 2015). Em condições de temperatura e pressão ambientais, o quitosano apresenta-se sob a forma de pós ou flocos de granulometria variável, esbranquiçado, opaco, pouco denso e inodoro (Figura 4).



Figura 4 - Ilustrações de um produto nutracêutico composto por quitosano em cápsulas e da aparência do quitosano em pó

Embora a quitina possa ser encontrada naturalmente na parede celular dos fungos *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* e *Streptomyces*, utilizados industrialmente para a produção de ácido cítrico, a desacetilação da quitina de crustáceos continua sendo a maior fonte industrial para a obtenção de quitosano, devido à reatividade de outros compostos resultantes das vias metabólicas fúngicas, dificuldades de reprodutibilidade do processamento (KUMAR, 2000) e rendimento baixo.

O quitosano possui uma estrutura molecular bastante análoga à da celulose. Pela Figura 5 observa-se que, estruturalmente, a cadeia de quitina pode ser comparada à de celulose, estando os grupos hidroxil (-OH) ligados ao carbono C2 de cada monômero substituídos por grupos acetamido (-NHCOCH₃). No quitosano os grupos acetamido são, em sua maioria, desacetilados e convertidos em grupos amina. Devido à presença de grupos amina, o quitosano apresenta propriedades diferenciadas sendo, por esse motivo, mais versátil quimicamente do que a celulose (KNORR, 1991).

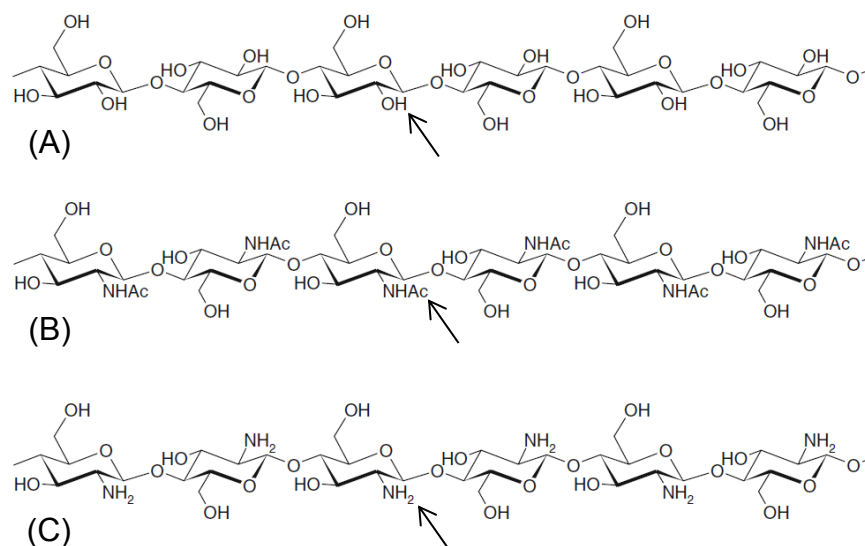


Figura 5 - Estruturas moleculares da celulose (A), quitina (B) e quitosano (C)
Fonte: Adaptado de Honarkar e Barikani (2009).

A presença de grupos amina confere ao quitosano a solubilidade em meios aquosos ácidos ($\text{pH} \leq 6,5$), o que não se observa com a quitina. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em meio ácido, os grupos amina podem

ser protonados (Eq. 12) carregando-se positivamente, o que não ocorre com os grupos acetamido (VÅRUM e SMIDSRØD, 2006). O aparecimento de cargas elétricas positivas nas cadeias poliméricas propicia a repulsão eletrostática entre elas, sendo este um dos fatores que favorecem a dispersão do quitosano no meio solvente.



Dentre as características físico-químicas tecnologicamente relevantes no nosso contexto, do quitosano destacam-se sua dispersibilidade em meios aquosos (que é dependente da natureza, concentração e pK_a do ácido utilizado como cossolvente) e sua capacidade de desenvolver viscosidade quando em solução ou em dispersão coloidal (SHAH, MEWADA e MEHTA, 2013). A magnitude dessas propriedades dependerão da massa molar e do DD do quitosano analisado, que em conjunto com o pH meio, determinarão a carga elétrica líquida das cadeias do biopolímero (SCHULZ, 1998).

A partir dessas propriedades, diversas aplicações na área médico-farmacêutica (seção 3.2.2) e algumas aplicações alimentares (seção 3.2.3) têm sido propostas para o quitosano *in natura*. Além disso, estudos têm demonstrando a melhoria de propriedades tecnologicamente relevantes de quitosanos quimicamente modificados. Entretanto, esses últimos não serão aqui detalhados, por não estarem no contexto específico do presente trabalho de pesquisa.

3.2.2. Aplicações na área médico-farmacêutica

Estudos da área médica apresentaram propostas de utilização do quitosano em próteses cirúrgicas como agente anti-bacteriano (ZHAO *et al.*, 2014; RENOUD *et al.*, 2012), cicatrizante ou componente estrutural de próteses de pele para o tratamento de queimaduras (CAO *et al.*, 2014; GOPAL *et al.*, 2014; TAO *et al.*, 2013). O sucesso do uso do quitosano nessas áreas relaciona-se com a capacidade do composto em estimular o sistema imune. Além disso, em artigos relacionados a essa área, notou-se uma busca em valorizar propriedades do quitosano, como a biocompatibilidade com tecidos animais, biodegradabilidade, não toxicidade, ação antimicrobiana, ou ainda

ação antioxidante (MATTIOLI-BELMONTE *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014; RENOUD *et al.*, 2012). Dentro da aplicabilidade visada por cada um dos estudos, resultados relevantes foram relatados, confirmando o interesse da continuidade das pesquisas fundamentais e aplicadas sobre esse material.

Além disso, também, o efeito hipolipidêmico desse composto vem sendo estudado (HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010; LIU, ZHANG e XIA, 2008; BENNEKUM *et al.*, 2005). No estômago, o quitosano interage com o ácido clorídrico tornando-se solúvel. Por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, o quitosano pode interagir com os ácidos graxos, triglicerídeos e moléculas de colesterol presentes nos alimentos. No intestino, em pH próximo a 6,3 e devido a interações que ocorrem com os sais e ácidos biliares, o quitosano torna-se insolúvel e precipita-se formando agregados com ácidos graxos, triglicérides e colesterol. Esse agregado se desprende e poderá ligar-se a lipídios adicionais no intestino, provavelmente por meio de interações hidrofóbicas (MUDGIL e BARAK, 2013). Uma parte destes lipídios adsorvidos poderá ser excretada sem ser metabolizada. O quitosano pode ainda interagir e formar complexos com uma variedade de ânions, como ácidos biliares e ácidos graxos livres em soluções com pH reduzido, principalmente por meio das ligações iônicas feitas pelos grupos amina protonados (LIU, ZHANG e XIA, 2008). Baseado nessas propriedades fisiológicas, atualmente existe no mercado uma variedade de produtos nutracêuticos com alegações de “reductor dos níveis de colesterol no sangue” e “emagrecedor”.

3.2.3. Aplicações na área de alimentos

O *Codex Alimentarius* foi o primeiro órgão a reconhecer o quitosano como agente de clarificação de bebidas, em 1991. Mais de 10 anos se passaram até que aprovação da utilização do quitosano como coadjuvante de processos de filtração e agente de floculação para a clarificação de sucos e néctares de frutas fosse permitida. Desde 2003, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) aprovou a utilização do quitosano como agente de floculação e clarificação de sucos de frutas e vinhos, agente de endurecimento

e impermeabilizante para frutos e sementes, agente espessante e estabilizante de alimentos, e como fonte de fibras (FAO, 2003).

No Brasil, toda a cadeia produtiva relacionada a produtos e serviços que possam afetar a saúde da população deve seguir as normatizações, estando inclusive sob fiscalização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). De acordo com a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, da ANVISA, o quitosano é classificado como uma *“fibra dietética que pode ser utilizada na alimentação humana com alegações de redução da absorção de gordura e colesterol, desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de quitosano se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for fluido, devendo ser atendidos na recomendação de consumo diária do produto”* (BRASIL, 1999).

Ressalta-se que a legislação brasileira de alimentos encontra-se majoritariamente harmonizada com as legislações de outros órgãos internacionalmente reconhecidos no que se refere à segurança dos alimentos, bem como da população que os consome. Nesse sentido, as alegações relacionadas aos alimentos com propriedades funcionais e de saúde fazem parte de um processo contínuo de avaliação e reavaliação das propriedades e características desses alimentos, com base em evidências científicas.

A partir da comprovação da inocuidade e não-toxicidade do quitosano, bem como da regulamentação de sua ingestão pelos órgãos competentes que tratam da saúde no Brasil e no mundo, pesquisas têm sido realizadas propondo a utilização desse polissacarídeo na elaboração de filmes de embalagens e coberturas comestíveis, nas quais existe o contato do produto final com alimentos (KUREK, GALUSC e DEBEAUFORT, 2014; LIN e PASCAL, 2014; PENG e LI, 2014; SUN *et al.*, 2014; CHIEN, SHEU e LIN, 2007).

Além disso, em iogurtes, molhos, sobremesas e diversos alimentos fluidos ácidos, o quitosano poderia ser utilizado, simultaneamente, como espessante e como regulador da absorção de lipídeos, exercendo assim uma função tecnológica e outra nutracêutica. Ácidos orgânicos (acético, ascórbico, cítrico, láctico, por exemplo) presentes em variados alimentos fluidos poderiam favorecer a solubilização do quitosano. Nesse caso, os ácidos cítrico (INS 330) ou láctico (INS 270), frequentemente, utilizados como aditivos (aromatizante,

antioxidante, antimicrobiano ou regulador de acidez) na indústria de alimentos poderiam produzir a acidez requerida para a solubilização do quitosano (Figura 6).

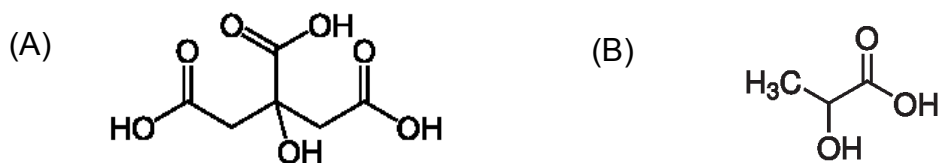


Figura 6 - Estruturas moleculares dos ácidos cítrico (A) e láctico (B), respectivamente, INS 330 e 270

A solubilidade é uma propriedade relacionada à interação do solvente com o soluto. Dentro de uma solução de polímeros, o soluto tende a hidratar as cadeias poliméricas (essa hidratação é chamada de solvatação, quando o soluto é a água), ao passo que as cadeias dos polímeros tendem a um equilíbrio de interações entre si e com as moléculas do solvente. As interações solvente-solvente, solvente-polímero e polímero-polímero são estabelecidas até que se atinja um equilíbrio dinâmico, em que a energia livre do sistema é minimizada.

A temperatura, a força iônica e o pH são variáveis que podem aumentar ou reduzir a solubilidade de polímeros em solução. Por exemplo, como o pH é uma medida da atividade dos cátions H^+ dos ácidos desprotonados em solução, os polímeros podem ser protonados ou desprotonados dependendo do pH do meio. Dessa forma, a solubilização poderá ser aumentada em meios ácidos, como é o caso do quitosano, por mecanismos eletrostáticos. Adicionalmente, a estrutura química do ânion do ácido presente no meio pode afetar positiva ou negativamente a solubilidade do quitosano, devido a fatores entrópicos bastante específicos (CUI; BEACH e ANASTAS, 2011; TIAN *et al.* 2009).

Objetivando viabilizar e difundir aplicações para o quitosano na indústria de alimentos, a utilização desse hidrocoloide na formulação de emulsões alimentares pode ser uma alternativa a mais para aproveitar suas propriedades fisiológicas benéficas.

3.2.4. Aplicações em sistemas-modelo

Nesse ponto, torna-se importante apresentar estudos em que se propôs avaliar a utilização do quitosano no espessamento de soluções aquosas (Quadro 1) e em emulsões-modelo (Quadro 2).

Quadro 1 - Exemplos de estudos em que se avaliou a viscosidade de soluções de quitosano, com concentrações variadas, solubilizado em diferentes meios ácidos

Concentrações estudadas	Ácido utilizado na solubilização	Análises	Viscosidade	Referência
1,9% (m/m) de quitosano na forma nativa (CH)	Soluções de ácido acético 2% (m/m)	Ensaaios reológicos (0-100 s ⁻¹)	η (Pa·s): ~2	Mikešová <i>et al.</i> (2014)
1% (m/V) de quitosano na forma nativa (CH)	Soluções de ácido acético 1% ou láctico 1% (V/V)	Ensaaios reológicos (0-100 s ⁻¹)	η (Pa·s): ~0,036 (ácido acético) e ~0,057 (ácido láctico)	Zavaleta-Avejar <i>et al.</i> (2014)
0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25% (m/V) de quitosano na forma nativa (CH)	Solução de ácido acético 1% (V/V)	Ensaaios reológicos	η (mPa·s): ~5, ~10, ~14, ~40 e ~70 respectivamente para 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25% (m/V) de CH	Li e Xia (2011)
0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,50% (m/m) de quitosano na forma nativa (CH)	Solução de ácido acético com pH 3,90	Ensaaios reológicos (0-100 s ⁻¹)	η (Pa·s) - 10,8; 0,86; 0,15; 0,09 e 0,007 respectivamente para 2,50; 1,50; 1,00; 0,50 e 0,25% (m/m) de CH	Calero <i>et al.</i> (2010)
0,50; 1,00; 1,50 e 2,00% (m/m) de quitosano na forma nativa (CH)	Solução de ácido acético 1% (m/m)	Ensaaios reológicos (0-100 s ⁻¹)	η (Pa·s): ~40, ~10, ~2 e ~0,25 respectivamente para 2,00; 1,50; 1,00 e 0,50% (m/m) de CH	Martínez <i>et al.</i> (2004)
0,2; 1,0 e 2,0% (m/V) de quitosano na forma nativa (CH), com diferentes DD (75 a 95%)	Solução de HCl 0,1 M	Viscosímetro	η (mPa·s) 0,2% (m/V): 1 a 3; 1,0% (m/V): 3 a 174 e 2,0% (m/V): 7 a 999	Rodríguez, Albertengo e Agulló (2002)

De acordo com as informações constantes no Quadro 1, a análise de trabalhos em que se variou a concentração de quitosano indica que o aumento da concentração do polímero em solução promoveu o aumento das viscosidades nos sistemas. Adicionalmente, Rodríguez, Albertengo e Agulló (2002) observaram que o grau de desacetilação também exerce grande influência sobre a viscosidade, pois a utilização de quitosano com maiores percentuais de DD, mantendo-se constante a concentração de 2% de quitosano, levou a um aumento na viscosidade das soluções.

Nos trabalhos realizados por Mikešová *et al.* (2014), Martínez *et al.* (2004) e Rodríguez, Albertengo e Agulló (2002), quando se analisaram soluções contendo a mesma concentração de 2% (m/V) de quitosano, observaram-se valores diferentes de viscosidade (2 Pa·s, 40 Pa·s e 1 Pa·s, respectivamente). Nos estudos realizados por Li e Xia (2011), Calero *et al.* (2010) e Martínez *et al.* (2004), com soluções contendo 0,5% m/V de quitosano, também foram observadas variações expressivas nas viscosidades (0,01 Pa·s, 0,25 Pa·s e 0,09 Pa·s, respectivamente).

A variação nesses resultados reportados pode ser atribuída à natureza do quitosano (fornecedor, massa molar e DD), às soluções ácidas (tipo e concentração dos ácidos) e à metodologia analítica utilizada para determinação da viscosidade. Soluções preparadas com quitosanos de diferentes origens, massas molares médias e DD apresentarão de fato diferentes propriedades físicas, visto que a magnitude do espessamento está condicionada a essas características, como pôde ser observado nos artigos apresentados.

O papel do ácido utilizado como cossoluto na dispersão do quitosano não se restringe apenas à redução do pH. Adicionalmente, interações específicas entre o ânion do ácido e polímero podem influenciar (aumentando ou reduzindo) tanto a concentração máxima de polímero dissolvida quanto sua cinética de solubilização. Nos trabalhos analisados, todavia, esses efeitos específicos do tipo de ácido utilizado não são experimentalmente investigados e nem discutidos em profundidade. É importante enfatizar que, caso a concentração adicionada do ácido seja excessiva, poderá ocorrer a hidrólise das cadeias e, conseqüentemente, a redução as interações polímero-polímero que levam ao aumento da viscosidade.

Quadro 2 - Exemplos de estudos em que se caracterizaram emulsões contendo quitosano solubilizado na fase contínua

Formulação	Homogeneização:	Análises	Resultados	Referência
2 mL de triglicerídeo de cadeia média (TCM) e 98 mL de solução de 0,5% (m/V) de quitosano em tampão acetato pH 3,0 contendo β -caroteno (2,5% em massa de TCM)	Ultra-Turrax (10 min) e HAP (60 MPa)	Distribuição de tamanho das gotículas: DLS Potencial ζ (Pot. ζ): mobilidade eletroforética	Tamanho: ~750 nm Potencial ζ : $50,0 \pm 7,00$ mV	Lei <i>et al.</i> (2014-a)
2 mL de TCM e 98 mL de solução de 0,5% (m/V) de quitosano em tampão acetato pH 3,0	Ultra-Turrax (10 min) e HAP (60 MPa)	Distribuição de tamanho das gotículas: DLS Pot. ζ : mobilidade eletroforética	Tamanho: $653,0 \pm 15,63$ nm; Potencial ζ : $56,4 \pm 2,40$ mV	Lei <i>et al.</i> (2014-b)
40% de óleo de girassol, 40% pré-emulsão [50% (m/m) de óleo de girassol e 50% (m/m) solução de proteína de batata 2,0% (m/m de óleo)] e 20% soluções de quitosano [0,0; 0,25 e 1,0% (m/m)] em tampão acetato pH 3,9	Misturador (10.600 rpm, 4,5 min)	Avaliação da microestrutura das emulsões: microscopia confocal	0% (m/m) de quitosano: gotículas > 10 μ m em t = 1; 0,25% (m/m) de quitosano: gotículas ~5-10 μ m em t = 1; 1,0% (m/m) de quitosano: gotículas ~5-10 μ m em t = 1 e t = 15	Calero <i>et al.</i> (2013)
1% (m/m) de óleo de colza e 0,1% (m/m) de quitosano em solução tampão glicina-HCl	Ultra-Turrax (13.000 rpm, 2 min) e HAP (8-10 Kpsi, 8 passagens)	Tamanho das gotículas: microscopia confocal (tamanho e distribuição de cumulantes, por <i>software</i> integrado)	Tamanhos de 0,3 a 30 μ m (t = 1) e 0,3 a 70 μ m (t = 16)	Sreedhara <i>et al.</i> (2013)
10% de TCM, 0,5% proteína isolada do soro em tampão acetato (pH 6,5) e 0 a 0,025% (m/m) de quitosano em tampão acetato (pH 6,5)	Misturador (2 min) e HAP (10.000 psi)	Distribuição de tamanho das gotículas: DLS Pot. ζ : mobilidade eletroforética	d_{32} : 0,035 μ m [0% (m/m)] e 11,5 μ m [0,025% (m/m)]; Potencial ζ : - 15 $\pm$ 2 mV [0% (m/m)] e 0 $\pm$ 2 mV [0,025% (m/m)]	Yuan <i>et al.</i> (2013-a)

Quadro 2 - Exemplos de estudos em que se caracterizaram emulsões contendo quitosano solubilizado na fase contínua

Formulação	Homogeneização:	Análises	Resultados	Referência
Soluções de glicinina ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em tampão acetato (pH 3), solução de quitosano em tampão acetato (pH 3) 0,05:0,8 (glicinina: quitosano) e óleo de milho 20:1 (óleo:glicinina)	Ultra-Turrax (10.000 rpm, 2 min) HAP (400 bar, 2 passagens)	Distribuição de tamanho das gotículas: DLS Pot. ζ : mobilidade eletroforética	d_{43} : $2,5 \mu\text{m}$ Potencial ζ : $41 \pm 1 \text{ mV}$	Yuan <i>et al.</i> (2013-b)
10% (m/m) óleo e um complexo formado por caseinato de sódio [0,5% (m/m)]- quitosano [0 a 0.6% (m/m)] em tampão fosfato (pH 5,7) e n-tetradecano 10% (m/m)	Homogeneizador ultrassônico (intervalos de 20 s, por 2 min)	Distribuição de tamanho das gotículas: DLS Pot. ζ : mobilidade eletroforética	d_{32} : $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m}$ [0% (m/m)]; $4,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$ [0,2% (m/m)]; $2,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ [0,3% (m/m)]; $1,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ [0,4% (m/m)]; $1,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$ [0,5% (m/m)]; $1,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$ [0,6% (m/m)] Potencial ζ : $-30 \pm 1 \text{ mV}$ [0% (m/m)] e $+30 \pm 1 \text{ mV}$ [0,6% (m/m)]	Zinoviadou <i>et al.</i> (2012)
15 mL de óleo de girassol e 185 mL de soluções de quitosano no estado nativo [0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25% (m/V) em ácido acético 1% (V/V)]	Ultra-Turrax (3 min) e HAP (10-25 MPa)	Distribuição de tamanho das gotículas: dispersão de luz integrada	d_{43} : 2,83; 1,92; 1,22; 1,48 e $1,64 \mu\text{m}$ para 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25% (m/V) de CH	Li e Xia <i>et al.</i> (2011)
5% (m/m) de carvona, 1% (m/m) de citren LR10 e 1% (m/m) de quitosano (CH) em tampão acetato (pH 4,0)	Ultra-Turrax (20000 rpm, 2 min) e HAP (69 MPa, 5 passagens)	Distribuição de tamanho das gotículas: DLS Pot. ζ : mobilidade eletroforética	Tamanho: 100 (ausência CH) e 300 nm (1% CH) Potencial ζ : -50 (ausência CH) e 50 mV (1% CH)	Kaasgaard <i>et al.</i> (2010)

Diversas constatações interessantes são obtidas da análise dos estudos agrupados no Quadro 2. Nos trabalhos de Lei *et al.* (2014-a), Lei *et al.* (2014-b) e Sreedhara *et al.* (2013), utilizaram-se métodos de emulsificação semelhantes (dispersão em Ultra-Turrax, seguida de homogeneização com pressões próximas a 60 MPa) durante o preparo de emulsões, que continham quantidades de fase dispersa similares (2%, 2% e 1%, respectivamente) e concentrações quitosano diferentes (0,5%; 0,5% e 0,1%, respectivamente). Observou-se que os tamanhos médios das gotículas obtidos por Lei *et al.* (2014-a) e Lei *et al.* (2014-b) pouco diferiram entre si, enquanto os observados por Sreedhara *et al.* (2013) apresentaram-se muito maiores. Tais resultados parecem indicar que a concentração de quitosano pode ter sido decisiva na manutenção das gotículas com diâmetros médios menores. Com efeito, Li e Xia (2011) já haviam observado que o aumento da concentração de quitosano na emulsão promoveu uma diminuição no tamanho das gotículas.

Essa redução de tamanho das gotículas pode estar relacionada tanto ao aumento da viscosidade da fase contínua quanto a efeitos eletrostáticos originados de algumas cadeias de quitosano eletricamente carregadas que porventura interajam com os tensoativos adsorvidos na superfície das gotículas (já que o quitosano não possui, ele próprio, atividade interfacial, por não ser anfifílico). De fato, Lei *et al.* (2014-a) e Lei *et al.* (2014-b) analisaram o potencial ζ de gotículas de emulsões formuladas com quitosano, tendo reportado valores próximos a +55 mV. Isso fortalece a hipótese acima descrita, de que o quitosano pode ter contribuído para a manutenção das gotículas com diâmetros médios menores devido a fatores eletrostáticos.

Ainda, em relação ao tamanho das gotículas, Yuan *et al.* (2013-a) e Zinoviadou *et al.* (2012) observaram que, à medida que aumentou-se a concentração de quitosano, aumentou-se o tamanho das gotículas. Possivelmente, a interface das gotículas de óleo recoberta por uma camada de proteínas pode ter se tornado mais espessa devido ao aumento de quitosano e, assim, observou-se o incremento no tamanho. Entretanto, no estudo realizado Calero *et al.* (2013) observou-se uma redução do tamanho das gotículas de óleo, em função do aumento da concentração de quitosano. Nesses mesmos trabalhos, foi observado que a adição do quitosano promoveu o aumento em

módulo no potencial ζ . Possivelmente, as cadeias policatiónicas do quitosano puderam interagir com as superfícies das gotículas revestidas com proteínas propiciando um aumento na densidade de cargas elétricas positivas. Esse efeito pode ser devido à complexação entre proteína e polissacarídeo.

Observa-se que a estabilização cinética de emulsões deve ser encarada como um conjunto de estratégias que devem estar inter-relacionadas para que se atinja esse objetivo. A utilização conjunta das técnicas analíticas pode trazer relevantes informações em relação às eventuais propriedades técnico-funcionais do quitosano quando presente em diferentes concentrações em sistemas emulsionados. A problemática persistente é a seguinte: quando o quitosano apresenta propriedades estabilizantes, isso se deve a mecanismos puramente reológicos (aumento da viscosidade da fase contínua) ou há também alguma contribuição eletrostática, se o biopolímero interagir com os tensoativos presentes na superfície das gotículas? A resposta a isso deve ser buscada, haja vista que a substituição de hidrocoloides convencionais por hidrocoloides emergentes em formulações alimentares está condicionada às evidências de que esses são eficazes na substituição, além de tecnologicamente diversificadores e viáveis econômica e operacionalmente.

Estudos em sistemas-modelo que proponham a utilização do quitosano em emulsões poderão possibilitar futuras aplicações estratégicas para esse biopolímero. Por exemplo, em emulsões alimentícias, se comprovada a funcionalidade estabilizante do quitosano, esta se somaria à sua já conhecida funcionalidade nutracêutica, que é consequência da sua capacidade de restringir a biodisponibilidade de lipídios no trato gastrointestinal. As duas funcionalidades juntas em um só produto representariam uma alternativa inovadora para desenvolvimento de produtos alimentícios, especialmente para indivíduos em dietas de restrição do consumo de triacilgliceróis e de colesterol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Instalações e equipamentos

A preparação das soluções e a formulação das emulsões foram realizadas no Laboratório de Operações e Processos (DTA - UFV). A etapa de homogeneização das emulsões sob altas pressões e as análises reológicas foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos (DTA - UFV). As análises de tamanho e de potencial ζ das gotículas de óleo foram realizadas no Laboratório de Embalagens de Alimentos (DTA - UFV). As análises de tensão interfacial foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Higiene de Alimentos (DTA - UFV).

Os equipamentos utilizados durante a preparação e análise das emulsões são listadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Equipamentos utilizados na preparação e análise das soluções e emulsões

Equipamento	Marca	Modelo	País
Agitador magnético	Tecnal	MA085	Brasil
Analizador de tamanho e potencial ζ	Malvern	Zetasizer Nano ZS	Inglaterra
Balança analítica	Shimadzu	AUY220	Japão
Banho ultratermostatizado	Thermo Electron Corp.	Phoenix 2C3OP	Alemanha
Densímetro	Anton Paar	DMA 35	Áustria
Filtro de água	Millipore	Direct QUV3	Itália
Geladeira	Consul	PRATICE 410 Biplex	Brasil
Homogeneizador de alta pressão	Avestin	Emulsiflex-C5	Canadá
Homogeneizador Ultra-Turrax	Yellow Line	DI 25 Basic	Índia
Potenciômetro	Hanna	HI 2221	EUA
Refratômetro	KiTLer	972A	Brasil
Reômetro	Thermo Electron Corp.	HAAKE MARS	Alemanha
Tensiômetro	Kruss-GmbH	DSA-100	Alemanha

4.1.2. Reagentes químicos e materiais diversos

No Quadro 4 é apresentada uma descrição resumida dos reagentes químicos e outros materiais utilizados neste trabalho de pesquisa.

Quadro 4 - Descrição dos reagentes químicos e outros materiais utilizados para a preparação das soluções e das emulsões

Material	Descrição	Marca
Azida sódica	Forma cristalina, com grau de pureza $\geq 99\%$	Synth
Ácido láctico	Líquido denso, com grau de pureza $\geq 85\%$	Impex
Óleo de girassol	Líquido, com grau alimentício	Salada
Preto de Sudan B	Forma em pó	Dinâmica
Quitosano	Forma em pó, com massa molar média (60.000-120.000 Da), com grau de pureza $\geq 94,5\%$	Sigma Aldrich
Tween 20	Líquido denso, com grau de pureza $\geq 99,9\%$	Sigma Aldrich

4.1.3. Soluções ácidas

Primeiro, foram preparadas soluções de estoque de ácido láctico ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Em outro recipiente, foram preparadas soluções de azida sódica a $0,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ [$0,03\% \text{ (m/V)}$]. Então, utilizando-se um micro-pipetador automático, a solução de estoque de ácido láctico foi gotejada nessa última, com monitoramento contínuo do pH, até se obter as soluções de trabalho com os valores iniciais de pH objetivados (Quadro 5). Para cada uma das repetições do experimento, prepararam-se novas soluções-estoque de ácido láctico.

Quadro 5 - Soluções ácidas e tratamentos (emulsões) obtidos a partir dessas soluções

Solução ácida	Quitosano [% (m/V)]	pH	Tratamento/ Emulsão	Codificação
1	0,1 (Q)	3,0 (30)	1	Q30
2		3,5 (35)	2	Q35
3		4,0 (40)	3	Q40
4	- (A)	3,0 (30)	4	A30
5		3,5 (35)	5	A35
6		4,0 (40)	6	A40

Para a preparação das soluções de quitosano, adicionou-se $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ [0,1% (m/V)] do polímero e as misturas resultantes foram então mantidas sob agitação à temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), por 24 horas. Ao fim das 24 horas, foi feito um novo ajuste do pH das soluções contendo quitosano aos valores iniciais, pelo gotejamento de solução de estoque de ácido láctico. Em seguida, filtraram-se as soluções em uma membrana de filtração ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$), utilizando um funil de Büchner e um kitasato acoplados a uma bomba a vácuo.

O filtrado foi coletado e submetido a uma caracterização preliminar de densidade (densímetro oscilatório), índice de refração (refratômetro de Abbe) e viscosidade (viscosímetro de Ostwald, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (Quadro 6).

Quadro 6 - Características físicas das soluções ácidas contendo 0,1% (m/V) de quitosano utilizadas como fase contínua durante o preparo das emulsões

Solução ácida	Densidade ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	Índice de refração	Viscosidade ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)
Q40	$1,0004 \pm 0,0010^a$	$1,3331 \pm 0,0002^a$	$4,05 \pm 0,20^a$
Q35	$1,0013 \pm 0,0001^a$	$1,3332 \pm 0,0001^a$	$4,05 \pm 0,30^a$
Q30	$1,0017 \pm 0,0004^a$	$1,3333 \pm 0,0001^a$	$3,72 \pm 0,20^a$

*Letras iguais dentro de cada uma das colunas indicam médias estatisticamente iguais, ao nível de 5% de probabilidade, pela ANOVA

Observa-se que a densidade, o índice de refração e a viscosidade das soluções ácidas Q30, Q35 e Q40 apresentaram valores estatisticamente iguais, indicando que a concentração de ácido utilizada não promoveu alterações detectáveis dessas propriedades físicas nas soluções contendo 0,1% (m/V) de quitosano.

Essas soluções ácidas foram utilizadas como fase contínua para a preparação das emulsões, e também como diluente das emulsões, nas análises para determinação dos tamanhos e do potencial zeta das gotículas. Assim, os valores obtidos nessa caracterização preliminar das soluções foram utilizados na correção dos índices de refração e das viscosidades dos diluentes. Para as soluções em que não houve adição de quitosano, assumiram-se valores de índice de refração e viscosidade iguais aos da água pura ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.2. Metodologia

4.2.1. Planejamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). De acordo com o Quadro 5, cada uma das seis soluções ácidas foram utilizadas como fase contínua durante a preparação das emulsões, juntamente com 1% (V/V) de Tween 20. Nos tratamentos 1, 2 e 3 adicionou-se também quitosano ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), a fim de estudar o efeito desse polissacarídeo nas emulsões produzidas. Nos tratamentos 4, 5 e 6 não se adicionou nenhum polissacarídeo (tratamentos controle), a fim de investigar se os eventuais efeitos estabilizantes se devem à adição do quitosano, ou se não diferirão daqueles em que se adicionou somente o emulsificante Tween 20 à formulação. Repetiu-se cada um dos tratamentos três vezes obtendo-se 18 unidades experimentais.

4.2.2. Preparo das emulsões

Prepararam-se as emulsões-modelo utilizando-se as soluções ácidas adicionadas de 1% (V/V) de Tween 20 como a fase contínua [90% (V/V)] e óleo de girassol como a fase dispersa [10% (V/V)]. Primeiramente, realizou-se uma dispersão do óleo nas soluções aquosas utilizando Ultra-Turrax, a 24.000 rpm, durante 1 minuto. A partir da dispersão obtida, preparou-se a emulsão com o homogeneizador de alta pressão a 10.000 psi (69 MPa), com 6 passagens.

4.2.3. Análise das emulsões

As emulsões obtidas foram analisadas imediatamente após a preparação ($t = 0$) e no sétimo dia após a preparação ($t = 7$ dias), conforme descrito nos itens subsequentes. Nesse intervalo, as emulsões foram armazenadas a $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em provetas graduadas transparentes com capacidade de 10 mL devidamente identificadas, hermeticamente fechadas com *Parafilm*[®] e com as laterais recobertas com papel alumínio. Na Figura 7 é apresentado um esquema que resume as etapas de preparação das emulsões e das análises a que elas foram submetidas.

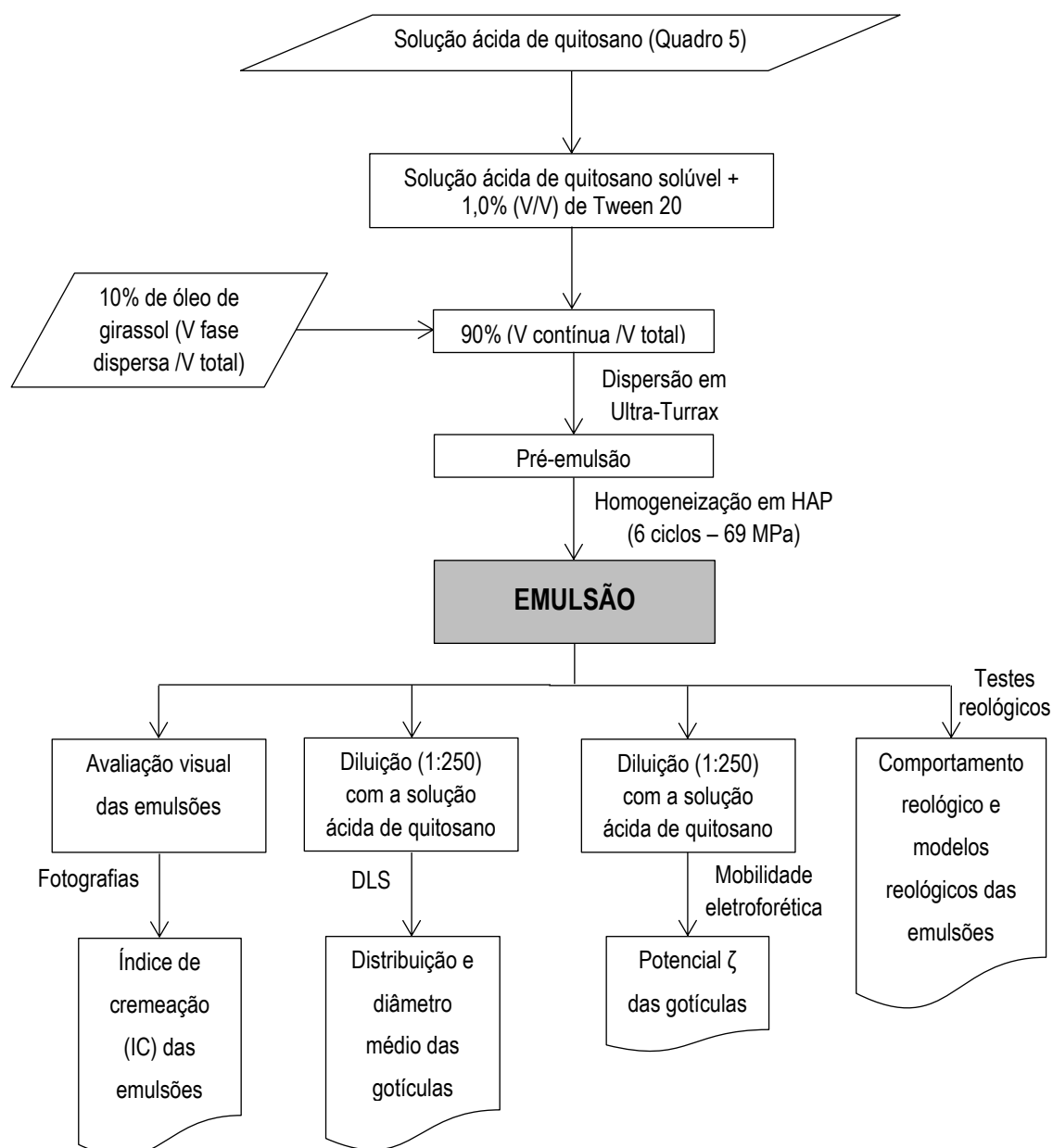


Figura 7 - Representação esquemática das etapas de preparação das emulsões e das análises realizadas

4.2.4. Avaliação reológica das emulsões

As emulsões foram avaliadas quanto ao comportamento ao escoamento e também em ensaios dinâmico-oscilatórios com varredura de frequência.

Comportamento ao escoamento

Foi avaliado medindo-se a tensão de cisalhamento aplicadas às emulsões submetidas a taxas de cisalhamento variando de 0,01 a 300 s⁻¹ (25 ±

1 °C). Para tal, utilizou-se um sensor com geometria cone-placa. Realizaram-se análises em duplicata para cada uma das emulsões, em três repetições. A partir dos reogramas, os modelos reológicos mais adequados foram selecionados (Eq. 13 e 14) para modelagem dos dados experimentais.

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (13)$$

$$\tau = K \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (14)$$

Avaliou-se a adequação dos modelos reológicos por meio da análise do coeficiente de determinação (R^2) e do *absolute mean percentage error* (*AMPE*).

$$AMPE = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{(Y_i - \hat{Y}_i)}{Y_i} \right| \quad (15)$$

Varreduras de frequência em ensaios dinâmico-oscilatórios

Foram realizadas utilizando-se um sensor com geometria cone-placa placa de aço inoxidável (1°/60 mm e *gap* de 52 µm), a 25 ± 1 °C. Pelo movimento oscilatório da placa superior, as amostras dispostas no *gap* foram cisalhadas a frequências compreendidas entre 0,1 e 3,0 Hz, aplicando-se uma tensão cisalhante máxima de 10 Pa.

Nessas análises, como a placa superior do sensor oscila, a magnitude da deformação de cisalhamento da amostra depende do tempo:

$$\gamma = \gamma_o \text{ sen}(\omega \times t) \quad (16)$$

Em que: γ_o é a amplitude da deformação igual a *Llh* e ω é a frequência da oscilação da placa (rad s^{-1}).

A tensão (τ) correspondente a cada valor de deformação é obtida por:

$$\tau = \tau_o \text{ sen}(\omega t + \delta) \quad (17)$$

Em que: δ é o ângulo de defasagem. Em um material sólido perfeitamente elástico, a deformação e a tensão estão completamente em fase, de forma que $\delta = 0$. Em um material fluido perfeitamente viscoso, a defasagem entre a

deformação e a tensão é máxima. Isso ocorre para $\delta = 90^\circ$ ou $\pi/2$ rad. Materiais viscoelásticos apresentarão $0 < \delta < 90^\circ$.

Uma vez δ determinado, pode-se definir o módulo de armazenamento (G') e o módulo de dissipação (G'') do material:

$$G' = \left(\frac{\tau}{\gamma}\right) \cos(\delta) \quad (18)$$

$$G'' = \left(\frac{\tau}{\gamma}\right) \sin(\delta) \quad (19)$$

A relação entre tensão e deformação em um material viscoelástico pode ser então expressa como:

$$\tau = G' \gamma + \left(\frac{G''}{\omega}\right) \dot{\gamma} \quad (20)$$

Também é possível observar que:

$$\frac{G''}{G'} = \frac{\left(\frac{\tau}{\gamma}\right) \sin(\delta)}{\left(\frac{\tau}{\gamma}\right) \cos(\delta)} = \tan(\delta) \quad (21)$$

Dessa maneira, valores de $\tan(\delta) > 1$ resultam de casos em que $G'' > G'$, indicando que o material tem a componente viscosa (caráter fluido) mais pronunciada que a componente elástica (caráter sólido). Em um fluido perfeitamente viscoso $\tan(\delta) \rightarrow \infty$. Analogamente, casos em que $G' > G''$ resultarão em valores de $\tan(\delta) < 1$, indicando predomínio da componente elástica (caráter sólido) sobre a componente viscosa (caráter fluido) do material. Em um sólido perfeitamente elástico $\tan(\delta) \rightarrow 0$.

4.2.5. Análises visuais

Para facilitar a realização das análises visuais das emulsões, o óleo de girassol utilizado foi previamente adicionado de corante lipofílico Preto de Sudan B [0,05% (m/V de óleo)]. A partir da análise de fotografias obtidas em $t = 0$ e $t = 7$ dias, calculou-se o índice de cremação das emulsões (IC), definido como:

$$IC (\%) = \frac{V_c}{V_T} \times 100 \quad (22)$$

Em que: V_c é o volume de óleo cremeado em $t = 7$ dias e V_T é o volume total de emulsão inicialmente disposto na proveta.

4.2.6. Análise do tamanho das gotículas de óleo

A distribuição do tamanho e o tamanho médio das gotículas de óleo nas emulsões foram avaliados utilizando a técnica do espalhamento dinâmico de luz (DLS). Por meio dessa técnica, a variação de intensidade de luz espalhada pelas partículas em movimento browniano pode ser medida. A partir da flutuação da intensidade calcula-se função de correlação temporal da intensidade espalhada $g^{(1)}(t)$ e pode-se medir o tempo de relaxação das flutuações (T_c). A distribuição por volume pode ser obtida por:

$$g^{(1)}(t) = \int_0^{+\infty} P(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \quad (23)$$

$$V(\Gamma) = P(\Gamma) \cdot \Gamma^3 \quad (24)$$

$$\Gamma = \left(\frac{4\pi T}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \right)^2 \times D \quad (25)$$

O coeficiente de difusividade (D) pode ser calculado utilizando a equação Stokes-Einstein (Eq. 26), o tamanho médio pode ser calculado.

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad (26)$$

Em que: k é a constante de Boltzmann ($1,3806488 \cdot 10^{-23}$ kg m²·s⁻²K⁻¹), T é a temperatura absoluta (K), η a viscosidade do meio (Pa·s).

Para um sistema polidisperso, a representação gráfica de $\ln[g^{(1)}(t)]$ em função do tempo não é linear e os dados são, neste caso, analisados utilizando o método CONTIN pelo software do equipamento (Zetasizer Software 7.03, 2013, Malvern Instruments Ltd.). Analogamente, o método calcula a distribuição

das amplitudes de intensidade espalhada para cada tamanho médio de partícula.

Em cada caso, uma alíquota de 6 µL da emulsão foi retirada do tubo, em um ponto localizado a uma distância compreendida entre 0,5 cm e 1 cm abaixo da interface emulsão-ar, e diluída (1:250) com a mesma solução ácida utilizada como fase contínua na elaboração da respectiva emulsão. A diluição objetiva que a distância gotícula-gotículas seja muito maior que o tamanho típico das gotículas (regime diluído).

Cada uma das amostras foi analisada em triplicata obtendo-se o tamanho médio das gotículas e o percentual de representatividade, a partir das distribuições de volume dos picos que representam cada uma das populações presentes. Para o cálculo do tamanho médio das gotículas feito pelo *software* do equipamento (Zetasizer Software 7.03, 2013, Malvern Instruments Ltd.), corrigiu-se a viscosidade e o índice de refração das soluções utilizadas como diluente das emulsões. Realizou-se a análise em três repetições e, posteriormente, calculou-se a média do tamanho e da representatividade percentual das amostras.

4.2.7. Análise do potencial ζ das gotículas de óleo

Para as análises de potencial ζ das gotículas de óleo, utilizou-se a técnica de espalhamento de luz eletroforético. Cada uma das amostras foi analisada em triplicata, obtendo-se o potencial ζ das gotículas a partir das distribuições de intensidade das populações de gotículas presentes. Realizou-se a análise em três repetições e, posteriormente, calculou-se a média do potencial ζ das amostras.

Em cada caso, uma alíquota de 6 µL da emulsão foi retirada do tubo, em um ponto localizado a uma distância compreendida entre 0,5 cm e 1 cm abaixo da interface emulsão-ar, e diluída (1:250) com a mesma solução ácida utilizada como fase contínua na elaboração da respectiva emulsão.

No equipamento utilizado (Zetasizer Software 7.03, 2013, Malvern Instruments Ltd.) as análises são feitas como segue: as amostras diluídas são acondicionadas em uma cubeta apropriada e então submetidas a um campo elétrico $\vec{E}$, de intensidade pré-determinada, aplicado por um par de eletrodos.

Dessa forma, as gotículas carregadas eletricamente moveram-se em direção ao eletrodo de carga oposta a uma velocidade v , dependente da magnitude de sua carga elétrica. A mobilidade eletroforética, μ_e , é então calculada:

$$\mu_e = \frac{v}{|E|} \quad (27)$$

Utilizando o modelo de Smoluchowski (Eq. 28), o potencial ζ das gotículas é então calculado pelo *software* do equipamento:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (28)$$

Em que: μ_e é a mobilidade eletroforética; ε_r é a constante dielétrica do meio; ε_0 é permissividade no vácuo; ζ é o potencial zeta; e η viscosidade dinâmica.

Para o cálculo preciso do potencial ζ , corrigiu-se a viscosidade e o índice de refração das soluções utilizadas como diluente das emulsões.

4.2.8. Determinação da tensão interfacial das soluções de quitosano

A tensão interfacial entre o óleo de girassol e as soluções ácidas de quitosano foi medida utilizando-se o método da gota pendente, pelo tensiômetro.

O método da gota pendente pode ser usado para determinar a tensão interfacial existente entre dois líquidos. O formato da gota é resultado do equilíbrio entre a tensão interfacial e a gravidade, ou seja, as forças que atuam sobre ela. A gota tende a ser esférica devido à tensão interfacial e tende a se alongar verticalmente em consequência da força peso (DALTON, 2011), assim o contato entre os líquidos é minimizado. A partir do volume da gota, diâmetro e comprimento vertical, a deformação decorrente da força peso, contrária à tensão interfacial, pode ser calculada (THIESSEN e MAN, 1999).

Analysaram-se soluções ácidas com o valor de pH de 3,5 contendo 0,05 mg·mL⁻¹ de quitosano e 1% (V/V) de Tween 20. Avaliou-se, também, um controle contendo apenas 1% (V/V) de Tween 20, em solução de ácido láctico com pH 3,5.

Assim, formou-se uma gota da solução ácida de quitosano com $20,0 \pm 2,0 \mu\text{L}$ na ponta de uma agulha imersa em uma cubeta contendo óleo de girassol e mediu-se a tensão interfacial durante 900 s consecutivos, a 23 ± 2 °C. As medições foram realizadas em função do tempo, a fim de determinar o tempo necessário para o equilíbrio da tensão interfacial até um valor constante. Realizou-se três repetições, em triplicata, para cada uma das soluções.

Posteriormente, utilizou-se o seguinte modelo (Eq. 29) para relacionar a redução da tensão interfacial (γ) em função do tempo.

$$\gamma = \gamma_{eq} + A \cdot e^{-Bt} \quad (29)$$

Em que: γ_{eq} é a tensão de equilíbrio do sistema e t é o tempo considerado (s).

4.2.9. Tratamento estatístico dos resultados

Utilizou-se o software SAS versão 9.3 (*Statistical Analysis System* 9.3, 2012, *SAS Institute Inc.*), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do comportamento reológico das emulsões

5.1.1. Comportamento ao escoamento

No Quadro 7 são apresentados os parâmetros reológicos obtidos para ambos os modelos, bem como indicadores da sua adequação (R^2 e **AMPE**) aos dados reológicos obtidos para as emulsões.

Quadro 7 - Parâmetros reológicos e indicadores de adequação dos modelos matemáticos utilizados para caracterizar as emulsões

Emulsão	Modelos reológicos	Parâmetros dos modelos		Adequação	
		K (mPa·sⁿ)	n	R^2	AMPE (%)
Q30	Lei da Potência	2,8643 ± 0,0600	0,9990 ± 0,0041	0,999	1,46
	Newtoniano	2,8492 ± 0,0040 ^{A,a}	-	0,999	1,46
A30	Lei da Potência	1,1966 ± 0,0100	1,0033 ± 0,0020	0,999	0,96
	Newtoniano	1,2183 ± 0,0008 ^{B,b}	-	0,999	0,90
Q35	Lei da Potência	2,9709 ± 0,2000	1,0004 ± 0,0100	0,989	4,73
	Newtoniano	2,9775 ± 0,0100 ^{A,a}	-	0,989	4,74
A35	Lei da Potência	1,2180 ± 0,0500	1,0008 ± 0,0080	0,996	3,07
	Newtoniano	1,2232 ± 0,0030 ^{B,b}	-	0,996	3,06
Q40	Lei da Potência	2,8494 ± 0,2000	0,9983 ± 0,0100	0,994	3,25
	Newtoniano	2,8240 ± 0,0100 ^{A,a}	-	0,994	3,25
A40	Lei da Potência	1,2604 ± 0,1000	0,9922 ± 0,2000	0,987	6,13
	Newtoniano	1,2085 ± 0,0060 ^{B,b}	-	0,987	6,22

*Para o modelo newtoniano $K \equiv \eta$ (mPa·s).

**Letras maiúsculas iguais dentro das colunas não indicam diferença significativa da viscosidade (η) entre as emulsões, ao nível de 5% de probabilidade, pela ANOVA.

***Letras minúsculas diferentes dentro das colunas indicam diferença significativa da viscosidade (η) entre as emulsões, ao nível de 5% de probabilidade, pela ANOVA.

A análise visual dos reogramas das emulsões indicou que, nas condições de cisalhamento das análises, nenhuma das seis emulsões apresentou tensão crítica de escoamento não nula. Todos os reogramas apresentaram-se bastante semelhantes entre si. No Apêndice 1, a título de exemplo, são apresentados os reogramas das emulsões Q35 e A 35. Como $\tau = 0$ em todos os casos, dois modelos reológicos clássicos podem ser adequados para descrever o escoamento desses fluidos: o de Newton ou o de Ostwad-de-Waale (Lei de Potência). A fim de avaliar qual deles melhor se ajustou aos dados experimentais de escoamento, análises de regressão foram realizadas.

Esses resultados mostram que ambos os modelos se ajustaram muito bem aos dados de $\tau = f(\dot{\gamma})$, com valores de $R^2 > 0,98$ em todos os casos. Além disso, valores de AMPE, que indicam os desvios relativos entre os valores experimentais de τ e os valores previstos pelo modelo ajustado foram inferiores a 10% (máximo de 6,2%), indicando que os modelos têm uma boa confiabilidade em prever valores experimentais, se aplicados para taxas de cisalhamento compreendidas dentro da faixa estudada ($< 300 \text{ s}^{-1}$). Nota-se, no Quadro 7, uma leve tendência de aumento de valores de AMPE à medida que aumenta o pH dos sistemas, sem que haja no entanto uma explicação físico-química clara para essa observação.

Todas as emulsões apresentam-se como fluidos newtonianos ou levemente pseudoplásticos, ou seja, tanto o modelo newtoniano poderia ser utilizado para caracterizar essas emulsões, como o modelo da lei da potência com índices de comportamento de fluxo (n) ≈ 1 .

Ao se comparar Q30, Q35 e Q40 entre si, observa-se que, variações entre os três valores do pH não levam a alterações substanciais nos valores de K (o mesmo ocorrendo quando se compara A30, A35 e A40). Por outro lado, nota-se que os valores de K das emulsões contendo 0,1% (m/V) de quitosano na fase contínua foram aproximadamente 3 vezes maiores, em relação aos tratamentos com mesmo pH mas sem adição de polissacarídeo.

Portanto, esses ensaios indicam que a adição de uma concentração relativamente pequena de quitosano [0,1% (m/V)] teve um efeito expressivo no espessamento das emulsões. Como sabido, o aumento da viscosidade é um dos fatores que pode contribuir para a estabilidade cinética das emulsões, por

reduzir a velocidade de translação, a frequência e a intensidade das colisões entre as gotículas.

5.1.2. Ensaios dinâmico-oscilatórios - varreduras de frequência

As emulsões também foram submetidas a análises reológicas dinâmico-oscilatórias, com tensão e temperatura controladas, e frequência variável entre 0,1 e 3,0 Hz. Na Figura 8 são mostrados os resultados para as emulsões contendo (Q35) e não contendo (A35) quitosano em pH 3,5. Aquelas correspondentes aos tratamentos Q30, Q35 e Q40 tiveram espectros mecânicos muito similares entre si (o mesmo ocorrendo quando se compara A30, A35 e A40), razão por que os demais gráficos não foram incluídos.

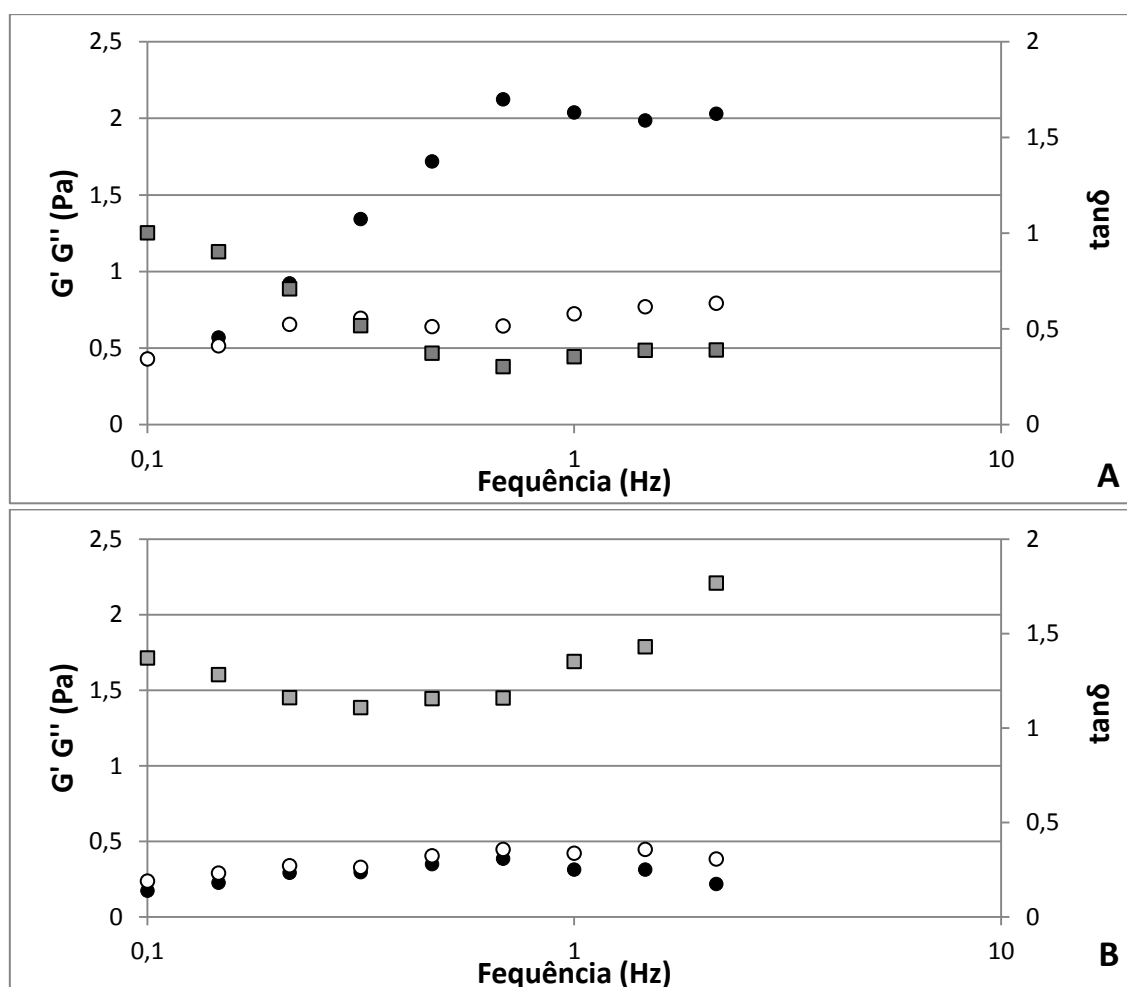


Figura 8 - Varreduras de frequência em dinâmicos oscilatórios das emulsões Q35 (A) e A35 (B). ● G' , ○ G'' e ■ $\tan \delta$

Para a emulsão Q35 (contendo quitosano), o valor de G'' apresentou um ligeiro aumento, de $\approx 0,5$ a $\approx 0,8$ Pa, com o aumento da frequência (Figura 8 - A). Entretanto, o valor de G' sofreu um aumento muito mais expressivo com o aumento da frequência, tendo também se iniciado a $\approx 0,5$ Pa e atingido $\approx 2,2$ Pa, a partir de 1 Hz. De fato, os valores de $\tan\delta$ foram inicialmente próximos de 1, mas decresceram acentuadamente e atingiram $\approx 0,5$ para frequências a partir de 1 Hz. Esse resultado mostra que a emulsão contendo quitosano teve um caráter menos viscoso e mais elástico, principalmente quando mecanicamente solicitada.

A emulsão A35 (sem adição de quitosano) apresentou valores de módulos G' e G'' muito próximos entre si, compreendidos entre $\approx 0,15$ e $\approx 0,45$ Pa, em todo o intervalo de frequências avaliado (Figura 8 - B). Apesar disso, os valores de G'' foram maiores que aqueles de G' , o que é confirmado pelos valores de $\tan\delta > 1$ (entre 1,1 e 2,0). Esses dados são coerentes, uma vez que as emulsões tinham caráter fluido visualmente nítido.

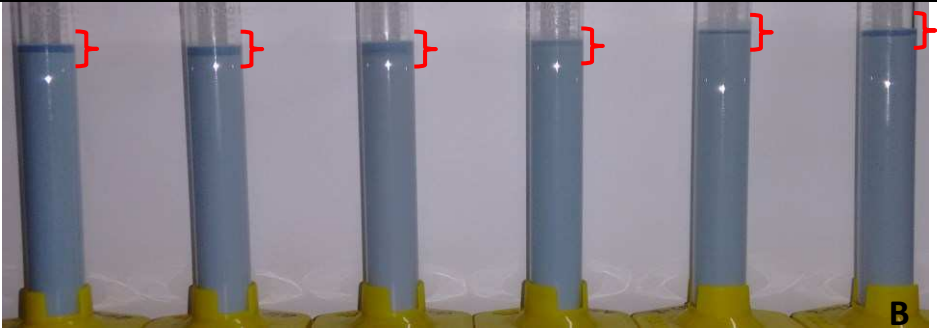
Esse conjunto de observações sugere que uma concentração relativamente pequena de quitosano [0,1% (m/V)] é capaz de alterar as características mecânicas da emulsão, acentuando seu caráter “sólido”. Tais inferências são compatíveis com aquelas feitas a partir da análise do comportamento ao escoamento, indicando que o quitosano teve um papel espessante na formulação das emulsões.

5.2. Análises visuais e do índice de cremação das emulsões (IC)

No Quadro 8 são apresentadas as fotografias das emulsões preparadas a diferentes valores de pH, com e sem adição de quitosano à fase contínua aquosa, em $t = 0$ e $t = 7$ dias.

Nas fotografias, observa-se que, em $t = 0$, para todos os seis tratamentos, sistemas opacos e visualmente homogêneos foram obtidos, o que é típico de emulsões O/A. A coloração azulada deve-se ao corante hidrofóbico Sudam Black B, previamente adicionado ao óleo. Não são observados sinais evidentes de cremação em nenhuma das emulsões.

Quadro 8 - Fotografias das diferentes emulsões, em t = 0 e t = 7 dias

Tempo	t = 0 dias					
	Q40	Q35	Q30	A40	A35	A30
Tratamento						
	A					
Tempo	t = 7 dias					
	Q40	Q35	Q30	A40	A35	A30
Tratamento						
	B					

Após 7 dias, pode-se notar que todos os tratamentos apresentaram na parte superior da proveta uma camada com coloração azul levemente mais intensa do que aquela do restante do material. Isso se deve à exsudação de óleo das emulsões e evidencia a ocorrência de separação de fases, mais pronunciada em alguns casos que em outros. Possivelmente, ocorreu uma aglomeração de gotículas de óleo e, não necessariamente, um rompimento das mesmas. A fim de avaliar de forma quantitativa a extensão dessa separação de fases em cada caso, calculou-se o cremeação (IC) das emulsões (Quadro 9).

Quadro 9 - Índice de cremeação (IC) das emulsões, em t = 7 dias

IC (%)	Tratamento					
	Q40	Q35	Q30	A40	A35	A30
t = 7	1,7 ± 1,0 ^{A,a}	2,0 ± 1,0 ^{A,a}	4,7 ± 3,0 ^{A,a}	2,3 ± 2,0 ^{A,a}	1,0 ± 0,0 ^{A,a}	1,0 ± 0,0 ^{A,a}

*Letras maiúsculas iguais dentro das linhas não indicam diferença significativa do índice de estabilidade (IC) das emulsões, ao nível de 5% de probabilidade, pela ANOVA.

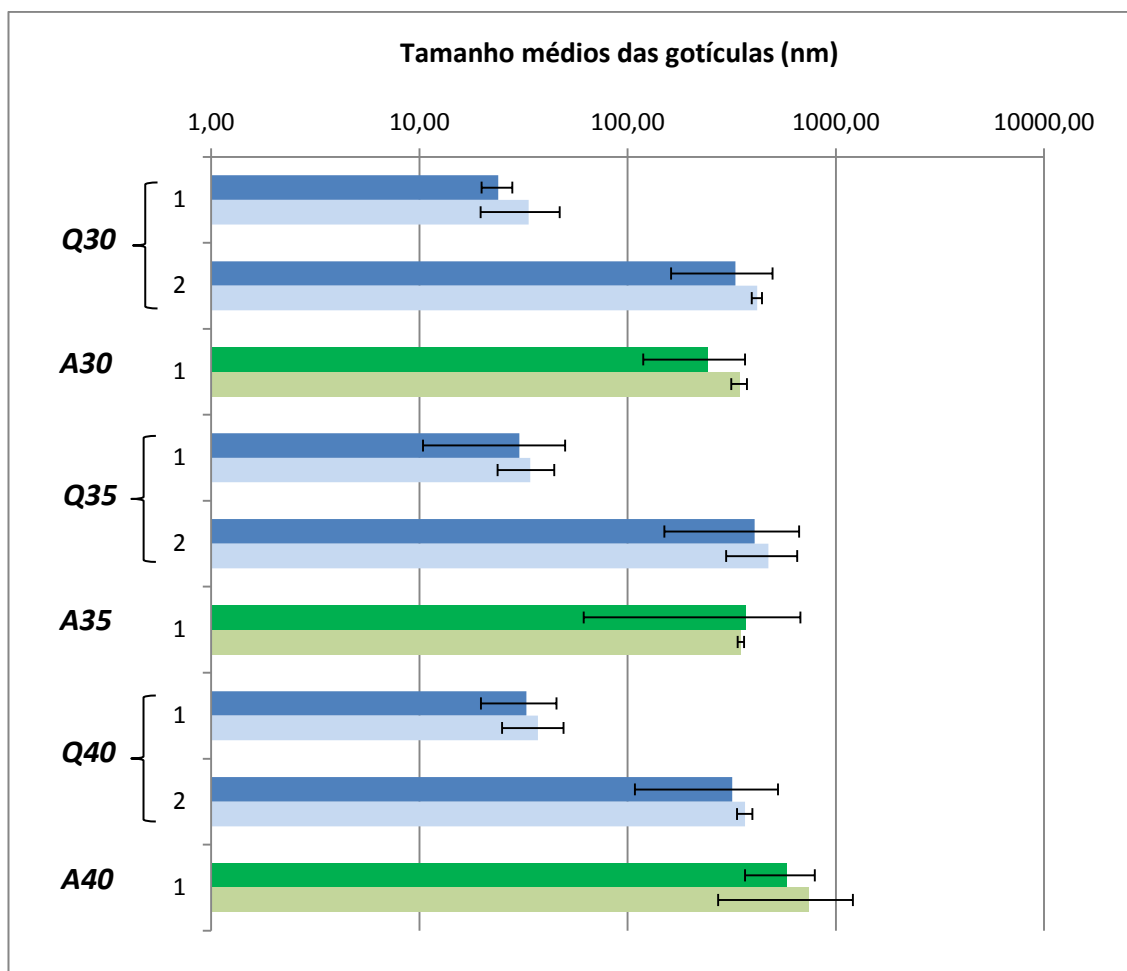
******Letras minúsculas iguais dentro das linhas não indicam diferença significativa do índice de estabilidade (IC) das emulsões que continham 0,1% (m/V) de quitosano (Q40, Q35 e Q30) e os tratamentos análogos sem a adição de nenhum polissacarídeo (A40, A35 e A30) na fase contínua, ao nível de 5% de probabilidade, pela ANOVA.

Pelo Quadro 9, não se observa diferença significativa entre os tratamentos contendo 0,1% (m/V) de quitosano (Q40, Q35 e Q30), em $t = 0$. Além disso, não se observa diferenças significativas entre os tratamentos contendo 0,1% (m/V) de quitosano (Q40, Q35 e Q30) e os tratamentos análogos sem a adição de nenhum polissacarídeo (A40, A35 e A30) na fase contínua, em $t = 7$. Isso pode indicar que a adição de quitosano à fase contínua dos tratamentos Q30, Q35 e Q40 não interferiu significativamente na estabilidade da emulsão, em $t = 7$ dias.

Nesse caso, a cremação observada pode ser resultado da incorporação de ar durante a dispersão em Ultra-Turrax e na homogeneização em alta pressão. Com o passar do tempo, a emulsão tende a se desaerar e gotículas de óleo não cobertas completamente com o emulsificante tendem a cremear.

5.3. Tamanhos médios das gotículas de óleo

Durante a análise dos tamanhos médios das gotículas de óleo das emulsões, considerou-se a existência de distribuições unimodais (com uma única população) de tamanhos para os tratamentos sem a adição de quitosano (A40, A35 e A30) na fase contínua, ao passo que para os tratamentos análogos (mesmo pH) contendo 0,1% (m/V) de quitosano (Q40, Q35 e Q30), considerou-se distribuições bimodais (com duas populações) de tamanho. Tal característica foi observada tanto em $t = 0$, quanto em $t = 7$ dias. Na Figura 9 são apresentados os tamanhos médios das populações de gotículas de óleo das emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias.



*Não houve diferença significativa no tamanho médios das gotículas de óleo das populações existentes em cada uma das emulsões em $t = 0$ e $t = 7$ dias, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 9 - Tamanhos médios das gotículas de óleo das populações existentes em cada uma das emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias (na figura, barras com cores mais fortes indicam o tamanho médio das gotículas em $t = 0$, enquanto as barras com cores menos intensas indicam o tamanho médio em $t = 7$ dias)

Nas emulsões que não continham quitosano na fase contínua em $t = 0$, os tamanhos médios das gotículas foram ≈ 240 nm, ≈ 370 nm e ≈ 580 nm, respectivamente, para A30, A35 e A40. Em $t = 7$ dias, esses valores foram ≈ 345 nm, 350 nm e 740 nm. Tendo em vista os valores de desvio padrão, pode-se afirmar que os valores de diâmetro médio permaneceram praticamente sem alterações significativas.

Nas emulsões contendo quitosano, em $t = 0$ observa-se que a população de gotículas de menor tamanho apresentou diâmetro médio ≈ 24 nm, ≈ 30 nm e ≈ 33 nm, respectivamente, para Q30, Q35 e Q40. Após 7 dias, esses valores de diâmetro médio permaneceram praticamente inalterados (33 nm, 34 nm e 37 nm, respectivamente). Para esses três tratamentos, a população de gotículas de maior tamanho apresentaram diâmetros médios compreendidos entre 310-410 nm, em $t = 0$ e $t = 7$. Nota-se uma similaridade entre os tamanhos médios das populações de gotículas de maior tamanho das emulsões contendo quitosano com os tamanhos médios das gotículas das emulsões sem quitosano.

Tais resultados podem indicar que não somente o emulsionante ou o sistema de homogeneização, separadamente, foram responsáveis pelos tamanhos médios observados. Adicionalmente, as soluções ácidas contendo quitosano 0,1% (m/V) usadas como fase contínua na elaboração dos tratamentos (Q30, Q35 e Q40) conferiram características de textura e consistência distintas às, respetivas, emulsões. Possivelmente, a alteração das características reológicas da fase contínua das emulsões pode ter sido determinante para as distribuições de tamanho observadas. Segundo McClements (2005), o aumento da viscosidade pode contribuir para a diminuição do tamanho das gotículas, para uma dada pressão de homogeneização. Tal efeito é atribuído ao aumento das interações hidrodinâmicas e diminuição na distância de separação entre as gotículas.

No trabalho realizado por Kaasgaard *et al.* (2010) observaram-se gotículas com tamanhos médios de 300 nm, no tratamento contendo 1% (m/m) de quitosano (tampão acetato pH 4,0) e 1% (m/m) do emulsificante Citren LR10 na fase contínua, e 5% (m/m) de fase dispersa. Embora os autores tenham utilizado o dobro das concentrações de quitosano e de emulsificante (em relação ao percentual de óleo), os tamanhos obtidos por eles encontram-se próximos ao observados no nosso estudo. Possivelmente, o processo de emulsificação tenha tido um papel crítico na formação das gotículas com tais tamanhos encontrados. Kaasgaard *et al.* (2010) relatam a utilização de duas etapas durante a emulsificação, dispersão em Ultra-Turrax (20.000 rpm, 2 min)

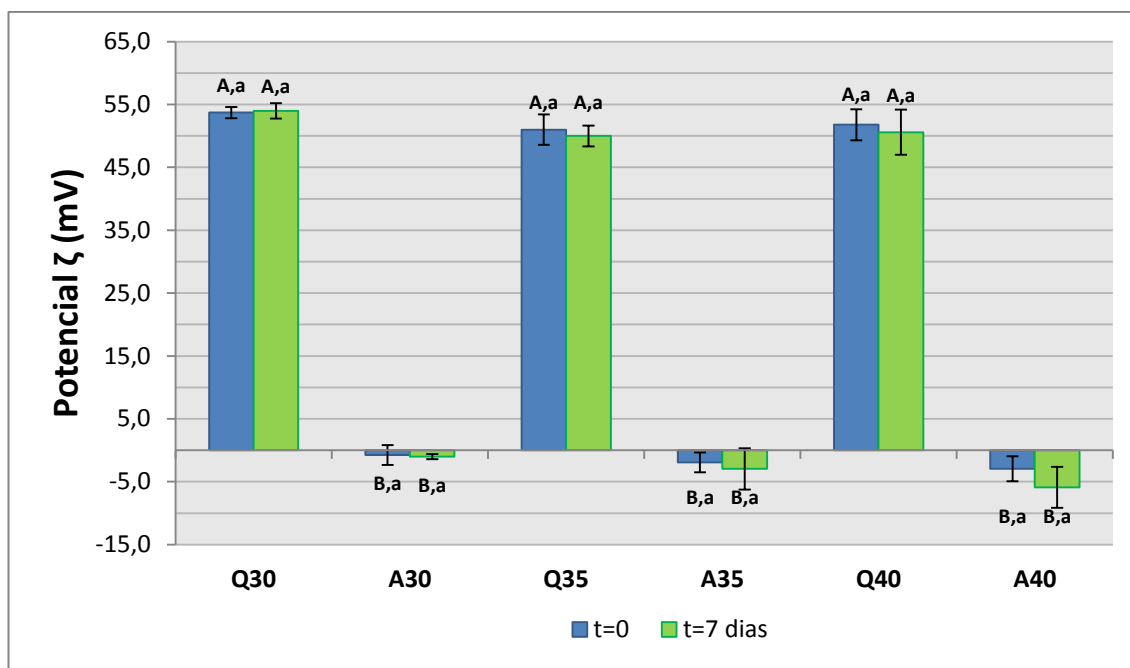
e HAP (69 MPa, 5 passagens), ou seja, um processo similar ao utilizado nesse trabalho.

Observa-se que tanto as emulsões que continham 0,1% (m/V) de quitosano (Q40, Q35 e Q30) na fase contínua, quanto as emulsões que não continham nenhum polissacarídeo (A40, A35 e A30), apresentaram-se estáveis durante o intervalo de tempo analisado. Assim, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos tamanhos médios das gotículas de óleo das populações, em cada uma das emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias. Tais resultados indicam que as variáveis de emulsificação utilizadas (relacionadas à composição e ao processo de emulsificação) parecem ter sido suficientes para formar gotículas estáveis, em $t = 7$ dias.

No Apêndice 2 são apresentados os tamanhos médios das populações de gotículas de óleo das emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias. As distribuições de diâmetro são mostradas no Apêndice 3. Nas análises, não foram considerados os pequenos picos supostamente representativos de uma pequena fração de gotículas com valores de diâmetro da ordem de 5000 nm nos tratamentos Q30, A30, Q35, A35 e Q40 (destacado pela cor cinza no Apêndice 2). Com efeito, de acordo com o limite de detecção da técnica e o formato dos picos, apresentados nos gráficos analisados (Zetasizer Software 7.03, 2013, Malvern Instruments Ltd.), é muito provável que esses picos não representem de fato gotículas presentes nos sistemas, mas sim um erro da função de correlação utilizada no tratamento dos resultados. Nota-se, além disso, que a representatividade dessas supostas populações de gotículas apresentou-se baixa ($\approx 2\%$ na maioria dos casos) e, portanto, não considerar esses picos não deve trazer prejuízos à interpretação global dos resultados.

5.4. Avaliação do tamanho e do potencial zeta das gotículas de óleo

Os valores de potencial ζ das gotículas de óleo presentes nos diferentes tratamentos, analisados em $t = 0$ e $t = 7$ dias, são apresentados na Figura 10.



*Letras maiúsculas iguais não indicam diferença significativa para o potencial ζ entre os tratamentos que continham 0,1% (m/V) de quitosano na fase contínua (Q40, Q35 e Q30), ao nível de 5% de probabilidade, pela ANOVA. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o potencial ζ entre os tratamentos que continham 0,1% (m/V) de quitosano (Q40, Q35 e Q30) e tratamentos análogos sem a adição de nenhum polissacarídeo (A40, A35 e A30) na fase contínua, ao nível de 5% de probabilidade, pela ANOVA.

**Letras minúsculas iguais não indicam diferença significativa no potencial ζ das gotículas de óleo entre $t = 0$ e $t = 7$ dias, para cada um dos tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 10 - Potencial ζ das gotículas de óleo, em $t = 0$ e $t = 7$ dias

A análise desses resultados mostra diferenças muito acentuadas entre as emulsões que não continham quitosano e aquelas contendo o polissacarídeo: no primeiro caso, os valores foram negativos e próximos de zero (módulo ≤ 5 mV), ao passo que no segundo os valores de potencial ζ foram positivos e cerca de 10 vezes maiores em magnitude (módulo ≥ 50 mV).

Considerando que o emulsificante Tween 20 possui moléculas eletricamente neutras, valores de potencial ζ próximos de zero eram de fato esperados nas emulsões sem quitosano (tratamentos A30, A35 e A40). A

pequena densidade de carga elétrica negativa observada na interface das gotículas nesses sistemas pode ser atribuída a pequenas quantidades de ácidos graxos livres presentes na fase dispersa (PERRECHIL e CUNHA, 2013) ou a ânions lactato interagindo com moléculas de Tween 20 na interface O/A.

As emulsões contendo quitosano 0,1% (m/V) previamente solubilizado na fase contínua (tratamentos Q30, Q35 e Q40) apresentaram valores positivos de potencial ζ . Isso sugere a existência de interações intermoleculares entre o emulsificante Tween 20 e cadeias protonadas de quitosano, que podem ter se adsorvido sobre a interface e conferido cargas elétricas positivas às gotículas. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de potencial ζ entre os tratamentos que continham quitosano. Isso pode sugerir que, na faixa de concentrações de ácido láctico utilizadas, o aumento do percentual de grupos amina protonados quando se reduz o pH é compensado pelo concomitante aumento da concentração de ânions lactato no meio, de modo que o balanço entre a quantidade total de entidades negativa e positivamente carregadas no sistema permanece aproximadamente constante.

Também é importante notar que, tanto para as emulsões contendo quitosano quanto para aquelas que não continham, não se observaram variações significativas nos valores de potencial ζ das gotículas de óleo em $t = 0$ e $t = 7$ dias. Esse dado pode indicar a estabilidade da dupla camada elétrica das gotículas durante o intervalo de tempo considerado.

Os resultados obtidos encontram-se coerentes com os obtidos no trabalho realizado por Kaasgaard *et al.* (2010), que reportaram valores de potencial ζ da ordem de de -50 mV, na ausência de quitosano, e +50 mV em emulsões contendo 1% (m/m) de quitosano solubilizado em tampão acetato pH 4,0. A divergência da magnitude no valor de potencial ζ no sistema sem quitosano reportada por esses autores, com relação ao presente estudo, pode ser devida à utilização de 1% (m/m) do emulsificante Citren LR10, com características químicas distintas do Tween 20 aqui utilizado. Tal observação pode indicar que, além da concentração de quitosano em solução, a concentração do ácido, bem como as propriedades químicas do mesmo (como o pK_a), podem influenciar os valores de potencial ζ .

Quando se considera, simultaneamente, que as emulsões contendo quitosano apresentaram um elevado percentual de gotículas diâmetro na faixa de 20-40 nm (cerca de 10 vezes menores que o diâmetro médio das gotículas das emulsões sem quitosano) e que tais gotículas possuem carga elétrica líquida positiva, pode-se levantar a hipótese de que i) as moléculas de quitosano adsorvem-se sobre as de Tween 20 presentes na interface das gotículas e ii) essa adsorção é rápida, ocorrendo nos primeiros instantes que seguem a formação da emulsão, de modo a reduzir consideravelmente a taxa de coalescência nesses instantes. Entretanto, não há elementos que permitam afirmar que o efeito estabilizante ao longo de 7 dias seja devido apenas a estabilização eletrostática.

5.5. Efeito da adição de quitosano sobre a tensão interfacial de sistemas compostos por soluções aquosas de ácido láctico e óleo de girassol

Os valores positivos, da ordem de + 50 mV, obtidos nas medidas de potencial ζ para as emulsões contendo quitosano são indicativos de que as moléculas de quitosano protonadas interagem com as moléculas do emulsificante Tween 20 localizadas na interface das gotículas. Se essa hipótese for verdadeira, espera-se que os valores de tensão interfacial para interfaces óleo e solução aquosa de ácido láctico com a presença de Tween 20 apresente alguma variação devido à presença do quitosano. Como não se dispõe de um aparato para medir diretamente a tensão interfacial nas gotículas, foi feito um experimento para a medida direta da tensão interfacial dinâmica entre os dois líquidos (óleo e solução de ácido láctico) diretamente postos em contato. Foram avaliados dois sistemas: i) óleo de girassol e solução de ácido láctico (pH 3,5) contendo 1% (V/V) de Tween 20, e ii) óleo de girassol e solução de ácido láctico (pH 3,5) contendo 1% (V/V) e 0,05% (m/V) de quitosano. Os resultados são apresentados na Figura 11.

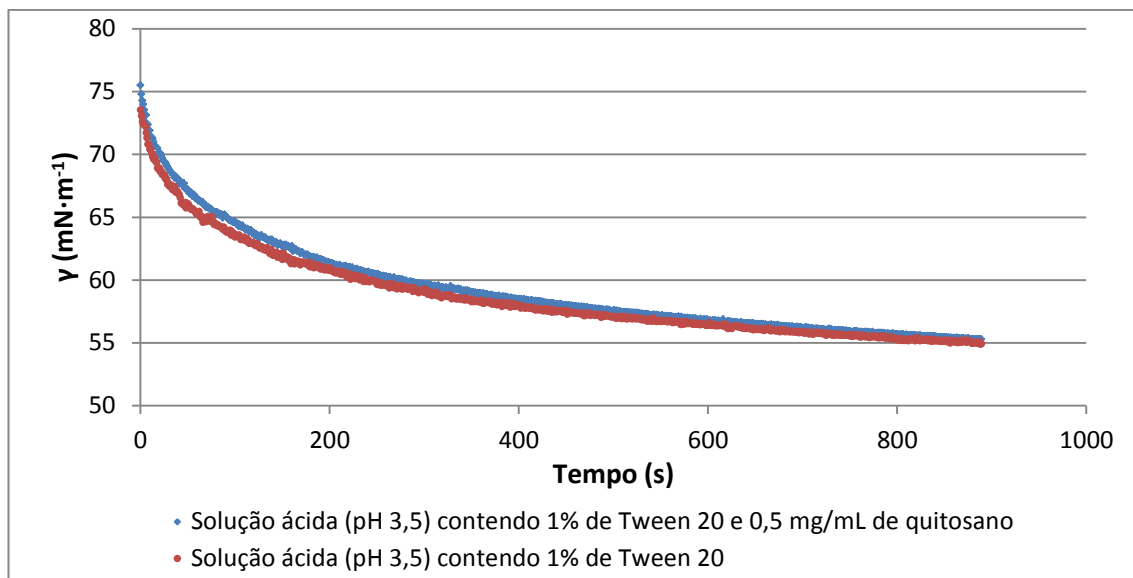


Figura 11 - Tensão interfacial da solução ácida (pH 3,5) contendo 0,05% (m/V) de quitosano e 1% (V/V) de Tween 20 e de uma solução ácida (pH 3,5) contendo 1% (V/V) de Tween 20, em função do tempo

Foi observado que os valores de tensão interfacial nos dois sistemas analisados são inicialmente próximos de 75 mN/m, decaindo exponencialmente com o passar do tempo e tendendo a um valor constante de ≈ 55 mN/m, após 15 minutos. Esse decaimento se deve à migração progressiva das moléculas do tensoativo (Tween 20) para a interface.

Nota-se ainda que, visualmente, as curvas correspondentes aos dois sistemas foram praticamente superpostas. Assim, a simples análise visual dessas curvas não permite inferir se houve ou não contribuição do quitosano, juntamente com o Tween 20, para a redução progressiva dos valores da tensão interfacial líquido-líquido. Então, foram ajustados modelos exponenciais para representar matematicamente o decaimento da tensão interfacial em função do tempo, nos sistemas contendo ou não quitosano (Eqs. (30) e (31), respectivamente):

$$\gamma = 52,03 + 24,29 \cdot e^{-0,07t} \quad (30)$$

$$\gamma = 52,19 + 22,89 \cdot e^{-0,07t} \quad (31)$$

Observou-se $R^2 = 0,96$ e $R^2 = 0,96$ para os modelos exponenciais que representam matematicamente o decaimento da tensão interfacial em função do tempo, respectivamente, Eqs. 30 e 31. Assim, considera-se que a equação foi adequada para modelar as variáveis experimentais.

O primeiro termo das Eqs. (30) e (31) refere-se à tensão de equilíbrio, isto é, o valor mínimo atingido por essa grandeza após decorrido o tempo necessário para que se estabeleça o equilíbrio do tensoativo entre a interface e o seio das fases. Esse termo apresentou um valor numérico estatisticamente menor para o sistema contendo quitosano, sugerindo que, na presença de Tween 20, o quitosano adicionado à solução de ácido láctico tenha contribuído para a redução do valor de tensão interfacial. O segundo termo das Eqs. (30) e (31) refere-se à taxa exponencial de decaimento da tensão interfacial em função do tempo. A partir dos resultados apresentados, acredita-se que o quitosano possa atuar como um coadjuvante na redução da tensão interfacial água-óleo e, possivelmente, como agente estabilizante.

Durante a pesquisa bibliográfica, não foram identificados trabalhos prévios que avaliassem a tensão entre soluções de quitosano contendo Tween 20, ou qualquer outro Tween, e óleos comestíveis. Entretanto, Calero *et al.* (2010), utilizando a técnica da gota pendente para determinar a tensão superficial (solução-ar) de uma solução contendo 0,5% (m/m) de quitosano no estado nativo em de ácido acético com pH 3,90, observaram que a tensão superficial decaiu de 65 ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) em 100 s para 45 ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) em 10000 s. Concluiu-se que o quitosano na interface solução-ar contribuiu para a redução da tensão superficial.

6. CONCLUSÃO

Verificou-se que a inclusão de quitosano (0,1 % m/V) em emulsões produzidas a partir de soluções aquosas de ácido láctico (90 % V/V) contendo Tween 20 (1% V/V) + óleo de girassol (10 % V/V), não teve nenhum efeito visualmente significativo sobre a estabilidade cinética das emulsões durante 7 dias, comparado aos tratamentos controle. Um pequeno volume de óleo (estatisticamente igual) foi exsudado em todos os sistemas após esse tempo. Entretanto, análises instrumentais revelaram que a adição de quitosano às emulsões teve efeitos significativos em diferentes propriedades físicas das mesmas, comparado aos controles: *i)* a existência de um elevado percentual de gotículas de óleo com diâmetro médio cerca de 10 vezes menor, *ii)* valores de potencial ζ positivos e cerca de 10 vezes maiores em módulo, *iii)* um aumento de cerca de 3 vezes na viscosidade das emulsões. Adicionalmente, observou-se que o quitosano, juntamente com o Tween 20, contribuiu para a redução do valor da tensão interfacial de equilíbrio entre o óleo e solução aquosa de ácido láctico.

Globalmente, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o quitosano tem potencial de aplicabilidade como estabilizante em emulsões do tipo O/A, por ter sido capaz de modificar características que são comumente correlacionadas com o controle cinético da desestabilização desses sistemas, como maior viscosidade e carga elétrica mais pronunciada na superfície das gotículas.

7. REFERÊNCIAS

ANRAKUA, M.; TANAKAB, M.; HIRAGAA, A.; NAGUMOC, K. IMAFUKUC, T.; MAEZAKID, Y.; IOHARAA, D.; UEKAMAE, K.; WATANABEC, H.; HIRAYAMAA, F.; MARUYAMAC, T.; OTAGIRIA, M. *Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients*. **Carbohydrate Polymers** 112 (2014) 152-157.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. *Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais*. **Revista eletrônica de materiais e processos** 2 (2007) 27-34.

BENNEKUM, A. M.; NGUYEN, D. V.; SCHULTHESS, G.; HAUSER, H.; PHILLIPS, M. C. *Mechanisms of cholesterol-lowering effects of dietary insoluble fibres: relationships with intestinal and hepatic cholesterol parameters*. **British Journal of Nutrition** 94 (2005) 331-337.

CALERO, N.; MUÑOZ, J.; COX, P. W.; HEUER, A.; GUERRERO, A. *Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein*. **Food Hydrocolloids** 30 (2013) 152-162.

CALERO, N.; MUÑOZ, J.; RAMÍREZ, P.; GUERRERO, A. *Flow behaviour, linear viscoelasticity and surface properties of chitosan aqueous solutions*. **Food Hydrocolloids** 24 (2010) 659-666.

CAO, L.; WERKMEISTER, J. A.; WANGA, J.; GLATTAUER, V.; McLEAN, K. M.; LIU, C. *Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP-2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles*. **Biomaterials** 35 (2014) 2730-2742.

CHIEN, P.-J.; SHEU, F.; LIN, H.-R. *Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life*. **Food Chemistry** 100 (2007) 1160-1168.

CODEX ALIMENTARIUS. *Codex general standard for food additives: codex stan 192-1995*. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf>. Acesso em: 25 de jan. 2015.

CUI, Z.; BEACH, E. S.; ANASTAS, P. T. *Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance*. **Green Chemistry Letters And Reviews** 4 (2011) 35-40.

DALTIN, D. **Tensoativos** - Química, propriedades e aplicações. 1 ed., São Paulo: Blucher, 2011. 327 p.

DHIWAR, C.; TIWARI, A., BAJPAI, A. K. *Nano-iron oxide-encapsulated chitosan microspheres as novel adsorbent for removal of Ni (II) ions from aqueous solution*. **Research on Chemical Intermediates** 39 (2013) 2989-3009.

DICKINSON, E. *Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers*. **Food Hydrocolloids** 23 (2009) 1473-1482.

FAO/WHO. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 19th session (19 - 24 march, 1990) of the codex committee on food additives and contaminants. Hague, Netherlands (1991).

FAO/WHO. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 25 th session (23 - 26 april, 2002) of the second session of the ad hoc codex intergovernmental task force on fruit and vegetable juices. Rio de Janeiro, Brasil, (2003).

GOPAL, A.; KANT, V.; GOPALAKRISHNAN, A.; TANDAN, S. K.; KUMAR; D. *Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats*. **European Journal of Pharmacology** 731 (2014) 8-19.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, S. O.; GONZÁLEZ-ORTIZ, M.; MARTÍNEZ-ABUNDIS, E.; ROBLES-CERVANTES, J. A. *Chitosan improves insulin sensitivity as determined by the euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in obese subjects*. **Nutrition Research** 30 (2010) 392-395.

HONARKAR, H.; BARIKANI; M. *Applications of biopolymers I: chitosan*. **Chemical Monthly** 140 (2009) 1403-1420.

JAFARI, S. M.; BEHESHTI, P; ASSADPOOR, E. *Rheological behavior and stability of D-limonene emulsions made by a novel hydrocolloid (Angum gum) compared with Arabic gum*. **Journal of Food Engineering** 109 (2012) 1-8.

KAASGAARD, T.; KELLER, D. *Chitosan Coating Improves Retention and Redispersibility of Freeze-Dried Flavor Oil Emulsions*. **Journal Agricultural and Food Chemistry** 58 (2010) 2446-2454.

KHAN, A.; OTHMAN, M. B. H.; RAZAK, K. A.; AKI, H. M. *Synthesis and physicochemical investigation of chitosan-PMAA-based dual-responsive hydrogels*. **Journal of Polymer Research** 20 (2013) 272-280.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. **International Journal of Food Microbiology** 144 (2010) 51-63.

KNORR, D. *Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management*. **Food Technology** 45 (1991) 114-123.

KUMAR, M. N. V. R. *A review of chitin and chitosan applications*. **Reactive Functional Polymers** 46 (2000) 1-27.

KUREK, M.; GALUSC, S.; DEBEAUFORT, F. *Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein.* **Food Packing and Shelf Life** 1 (2014) 56-67.

LEE, S-Y.; WEE, A-S.; LIM, C-K.; ABBAS, A. A.; SELVARATNAM, L. A.; MERICAN, M.; AHMAD, T. S. KAMARUL, T. *Supermacroporous poly(vinyl alcohol)-carboxylmethyl chitosan-poly(ethylene glycol) scaffold: an in vitro and in vivo pre-assessments for cartilage tissue engineering.* **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** 24 (2013) 1561-1570.

LEI, F.; LIU, F.; FANG YUAN, GAO, Y. *Impact of chitosan-EGCG conjugates on physicochemical stability of β -carotene emulsion.* **Food Hydrocolloids** 39 (2014-a) 163-170.

LEI, F.; WANG, X.; LIANG, C.; YUAN, F.; GAO, Y. *Preparation and Functional Evaluation of Chitosan-EGCG Conjugates.* **Journal of Applied Polymer Science** 131 (2014-b) 1-8.

LI, X.; XIA, W. *Effects of concentration, degree of deacetylation and molecular weight on emulsifying properties of chitosan.* **International Journal of Biological Macromolecules** 48 (2011) 768-772.

LIN, S.-J.; PASCALL, M. A. *Incorporation of vitamin E into chitosan and its effect on the film forming solution (viscosity and drying rate) and the solubility and thermal properties of the dried film.* **Food Hydrocolloids** 35 (2014) 78-84.

LIU, J.; ZHANG, J.; XIA, W. *Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo.* **Food Chemistry** 107 (2008) 419-425.

MAHFOUDHI, N.; SESSA, M.; CHOUAIBI, M.; FERRARI, G.; DONSI, F.; HAMD, S. *Assessment of emulsifying ability of almond gum in comparison with gum arabic using response surface methodology.* **Food Hydrocolloids** 37 (2014) 49-59.

MARTÍNEZ, A.; CHORNET, E.; RODRIG, D. *Steady-shear rheology of concentrated chitosan solutions*. **Journal of Texture Studies** 35 (2004) 53-74.

MIKEŠOVÁ, J.; HAŠEK, J.; TISHCHENKO, G.; MORGANTI, P. *Rheological study of chitosan acetate solutions containing chitin nanofibrils*. **Carbohydrate Polymers** 112 (2014) 753-757.

MATTIOLI-BELMONTEA, M.; COMETA, S.; FERRETTI, C.; IATTAC, R.; TRAPANI, A.; CECI, E.; FALCONI, M.; GIGLIOF, E. *Characterization and cytocompatibility of an antibiotic/chitosan/cyclodextrins nanocoating on titanium implants*. **Carbohydrate Polymers** 110 (2014) 173-182.

McCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions - Principles, Practicies, and Techniques**. 2 ed. Boca Raton: CRC PRESS, 2005. 609p.

MUDGIL, D.; BARAK, S. *Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review*. **International Journal of Biological Macromolecules** 61 (2013) 1-6.

PENG, Y.; LI, Y. *Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films*. **Food Hydrocolloids** 36 (2014) 287-293.

PERDUCA, M. J.; SPOTTI, M. J.; SANTIAGO, L. G.; JUDIS, M. A.; RUBIOLO , A. C.; CARRARA, C. R. *Rheological characterization of the hydrocolloid from Gleditsia amorphoides seeds*. **LWT - Food Science and Technology** 51 (2013) 143-147.

PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. *Stabilization of multilayered emulsions by sodium caseinate and κ-carrageenan*. **Food Hydrocolloids** 30 (2013) 606-613.

PORTO, B. C.; CRISTIANINI, M. *Evaluation of cashew tree gum (Anacardium occidentale L.) emulsifying properties*. **LWT - Food Science and Technology** 59 (2014) 1325-1331.

QIAN, H. F.; CUI, S. W.; WANG, Q.; WANG, C.; ZHOU, H. M. *Fractionation and physicochemical characterization of peach gum polysaccharides*. **Food Hydrocolloids** 25 (2011) 1285-1290.

RENOUD, P.; TOURY, B.; BENAYOUN, S.; ATTIK, G.; GROSGOGEAT, B. *Functionalization of titanium with chitosan via silanation: Evaluation of biological and mechanical performances*. **Plos One** (2012) 1-11.

RODRÍGUEZ, M. S.; ALBERTENGO, L. A.; AGULLÓ, E. *Emulsification capacity of chitosan*. **Carbohydrate Polymers**, 48 (2002) 271-276.

SANTANA, R. C.; PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. *High- and Low-Energy Emulsifications for Food Applications: A Focus on Process Parameters*. **Food Engineering Reviews** 5 (2013) 107-122

SCHULZ, P. C.; RODRIGUEZ, M. S.; DEL BLANCO, L. F.; PISTONESI, M.; AGULLO, E. *Emulsification properties of chitosan*. **Colloid e Polymer Science** 276 (1998) 1159-1165.

SHAH, N.; MEWADA, R. K.; MEHTA, T. *Chitosan: Development of nanoparticles, other physical forms and solubility with acids*. **Journal of Nano Research** 24 (2013) 107-122.

SIGMA ALDRICH - Chitosan Medium Molecular Weight (2014).

Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=p&t®ion=BR>>. Acesso em: 10 de jan. 2015.

SREEDHARA, A.; VEGARUD, G. E.; RUKKE, E.-O.; DEVOLD, T. G.; EKEBERG, D.; SCHÜLLER, R. B. *Colloidal Stability and Rheological Behaviour*

of Rapeseed Oil in Water Emulsions Stabilized with Whey Protein and Chitosan. Annual Transactions of the Nordic Rheology Society 21 (2013) 187-194.

SUN, X.; WANG, Z.; KADOUH, H.; ZHOU, K. *The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. LWT - Food Science and Technology* 57 (2014) 83-89.

TAO, S.; GAO, S.; ZHOU, Y.; CAO, M.; XIE, W.; ZHENG, H.; FAN, L. *Preparation of carboxymethyl chitosan sulfate for improved cell proliferation of skin fibroblasts. International Journal of Biological Macromolecules* 54 (2013) 160-165.

THIESSEN, D. B.; MAN, K. F. Surface Tension Measurement. In: WEBSTER, J. G. *The measurement, instrumentation and sensors – Handbook*. 2 ed. Boca Raton: CRC PRESS, 1999. 2588p.

TIAN, X. L.; TIAN, D. F.; WANG, Z. Y.; MO, F. K. *Synthesis and evaluation of chitosan-Vitamin C complex. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 71 (2009) 371-376.

VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Chitosans. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A. **Food Polysaccharides and Their Applications**. 2 ed. Boca Raton: CRC PRESS, 2006. 712p.

YUAN, F.; GAO, Y.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. *Modulation of physicochemical properties of emulsified lipids by chitosan addition. Journal of Food Engineering* 114 (2013-a) 1-7.

YUAN, Y.; WAN, Z.-L.; YIN, S.-W.; TENG, Z.; YANG, X.-Q.; QI, J.-R.; WANG, X.-Y. *Formation and dynamic interfacial adsorption of glycinin/chitosan soluble complex at acidic pH: Relationship to mixed emulsion stability. Food Hydrocolloids* 31 (2013-b) 85-93.

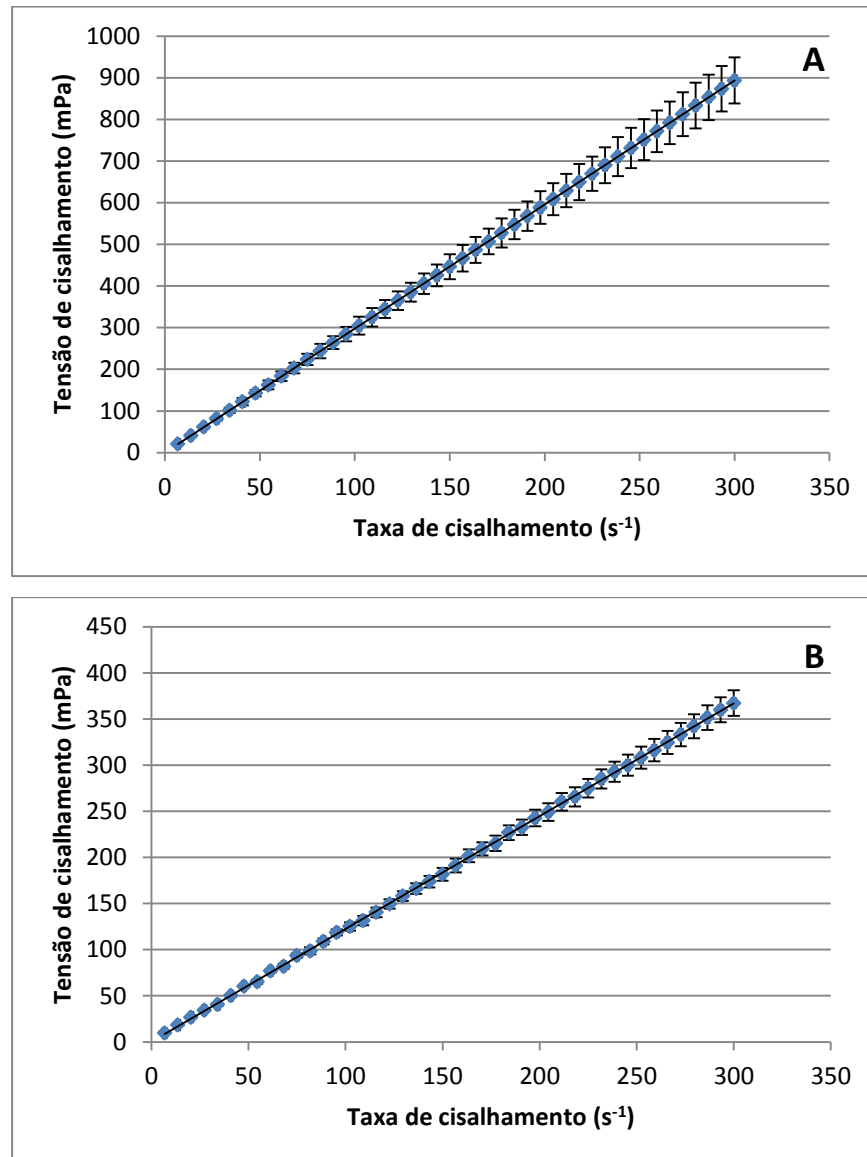
ZAIN, N. M.; STAPLEY, A. G. F.; SHAMA, G. *Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications*. **Carbohydrate Polymers** 112 (2014) 195-202.

ZAVALETA-AVEJAR, L.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; GIMENO, M.; PÉREZ-OROZCO, J. P.; SHIRAI, K. *Rheological and antioxidant power studies of enzymatically grafted chitosan with a hydrophobic alkyl side chain*. **Food Hydrocolloids** 39 (2014) 113-119.

ZHAO, L.; HU, Y.; XU, D.; CAI, K. Surface functionalization of titanium substrates with chitosan-lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 119 (2014) 115-125.

ZINOVIADOU, K. G.; SCHOLTEN, E.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. *Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes*. **International Dairy Journal** 26 (2012) 94-101.

APÊNDICE 1 - Reogramas das emulsões contendo 0,1% (m/V) de quitosano (A), não contendo nenhum polissacarídeo (B), na fase contínua com pH 3,5



APÊNDICE 2 - Tamanho médio das populações de gotículas de óleo das emulsões, em t = 0 e t = 7 dias

Trat.	Tempo (dias)	População 1 (nm)	%	População 2 (nm)	%	População 3 (nm)	%
Q30	0	24 ± 4	84 ± 7	329 ± 200	15 ± 6	4964 ± 100	1 ± 1
	7	33 ± 10	70 ± 20	419 ± 20	27 ± 20	5023 ± 200	3 ± 3
A30	0	243 ± 100	91 ± 3	5164 ± 50	9 ± 3	-	-
	7	345 ± 30	89 ± 1	5037 ± 100	11 ± 1	-	-
Q35	0	30 ± 20	72 ± 20	408,0 ± 300	27 ± 20	4801 ± 200	1 ± 1
	7	34 ± 10	67 ± 20	475 ± 200	32 ± 20	4883 ± 200	1 ± 2
A35	0	369 ± 300	96 ± 4	5390 ± 200	6 ± 2	-	-
	7	350 ± 10	94 ± 7	5262 ± 400	9 ± 6	-	-
Q40	0	33 ± 1	71 ± 20	318 ± 200	27 ± 20	5074 ± 200	2 ± 2
	7	37 ± 10	69 ± 20	366 ± 30	29 ± 10	5160 ± 100	3 ± 3
A40	0	579 ± 200	100 ± 0	-	-	-	-
	7	741 ± 500	100	-	-	-	-

APÊNDICE 3 - Distribuição de tamanho das populações de gotículas de óleo das emulsões, em $t = 0$ e $t = 7$ dias

