UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ROBSON TAKESHI SHIMADA

**Estabilidade de emulsões na presença da biomassa da
microalga *Arthrospira platensis* e do polímero
hidroxipropil metilcelulose**

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo
Data do depósito na SPG:
17/03/2017

ROBSON TAKESHI SHIMADA

**Estabilidade de emulsões na presença da biomassa da
microalga *Arthrospira platensis* e do polímero
hidroxipropil metilcelulose**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química*

Orientador: Profa. Dra. Denise F. S. Petri

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Shimada, Robson Takeshi
S557e Estabilidade de emulsões na presença da biomassa da microalga
Arthrospira platensis e do polímero hidroxipropil metilcelulose /
Robson Takeshi Shimada. -- São Paulo, 2017.
84p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental
Orientador: Petri, Denise Freitas Siqueira

1. Química de superfície 2. Surfactante coloidal : Físico-química
3. Proteína 4. Polímeros sintéticos 5. Microalgas I. T. II. Petri,
Denise Freitas Siqueira, orientador.

541.3453 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Estabilidade de emulsões na presença da biomassa da
microalga *Arthrospira platensis* e do polímero hidroxipropil
metilcelulose"

ROBSON TAKESHI SHIMADA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências - no Programa de Química.

Aprovado (a) por:

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Roberto Guardani
EP - USP

Prof. Dr. Edvaldo Sabadini
IQ - UNICAMP

SÃO PAULO
02 de junho de 2017

AGRADECIMENTOS

A minha família, sempre disposta a me ajudar e dar forças para continuar.

A minha orientadora Prof^a Dra. Denise Freitas Siqueira Petri, cuja paciência infinita, amizade e sabedoria tornaram essa realização possível.

Ao Matheus Sousa, cuja ajuda no projeto foi inestimável. Espero que suas empreitadas em sua nova carreira o traga bons ventos.

Aos professores Dr. Thiago Carita Correra, Dr. Omar Abou El Seoud e Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho pelos conselhos e sugestões durante meu memorável exame de qualificação.

Ao professor Dr. Lucio Angnes, o qual foi de extrema importância durante meus primeiros passos no mundo acadêmico devido à minha iniciação científica.

Aos excelentes professores que tive na graduação do Instituto de Química, cujo alto nível de conhecimento e didática me proporcionaram uma boa base científica.

Ao Dr. Hans Michael Petri, Reoterm, pelas medidas de viscosidade das emulsões.

Costumo dizer que a pós-graduação é como a graduação, porém, mais difícil e com menos amigos, por isso, agradeço a todos os meus colegas de laboratório por tornarem, através de conversas e boas risadas, minha estadia na pós graduação muito mais prazerosa.

A CNPq, pelo financiamento deste projeto.

“Let me tell you something you already know. The world ain't all sunshine and rainbows. It's a very mean and nasty place and I don't care how tough you are it will beat you to your knees and keep you there permanently if you let it. You, me, or nobody is gonna hit as hard as life. But it ain't about how hard ya hit. It's about how hard you can get hit and keep moving forward. How much you can take and keep moving forward. That's how winning is done!”

— Sylvester Stallone, Rocky Balboa

RESUMO

Shimada, R. T. **Estabilidade de emulsões na presença da biomassa da microalga *Arthrospira platensis* e do polímero hidroxipropil metilcelulose**. 2017. 84 p. Dissertação – Programa de Pós Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Arthrospira platensis ou Spirulina é uma microalga com alto valor nutricional. Foram preparados extratos de Spirulina, caracterizados e aplicados como estabilizadores de emulsão de óleo de girassol comercial em água (O/A) (10% v/v) na ausência e na presença de quatro tipos de hidroxipropil metilcelulose (HPMC). Os extratos brutos de Spirulina foram preparados em tampões a pH 6 (EB6) e pH 8 (EB8) por sonicação para promover a lise celular e a liberação de proteínas e fosfolípidos; Parte dos extratos foi centrifugada (EC6 ou EC8). Independentemente das condições de extração, todos os extratos apresentaram valores de potencial- ζ médio variando de - (16 $\pm$ 2) mV a - (20 $\pm$ 2) mV, tamanho médio variando de (108 $\pm$ 52) nm a (306 $\pm$ 68) nm e atividade interfacial. As emulsões O/A preparadas com extratos de Spirulina (10 g / L) exibiram partículas com potencial- ζ médio variando de - (16 $\pm$ 2) mV a - (27 $\pm$ 4) mV, tamanho médio variando de $\sim$ 70 nm (EB6 ou EB8) a $\sim$ 700 nm (EC6 ou EC8). No entanto, o EB6 levou a emulsões ligeiramente mais estáveis do que as outras. A combinação de EB6 (10 g / L) e HPMC (1,0 % m/m) levou a um aumento substancial na estabilidade da emulsão, embora os valores de potencial- ζ diminuíssem uma ordem de grandeza. Em particular, a HPMC com a maior massa molar e o maior grau de substituição de grupos metila conduziu a i) camada interfacial mais robusta resultante da formação de complexos entre cadeias HPMC e proteínas EB6 e (ii) meio contínuo mais viscoso.

Palavras-chave: Spirulina; hidroxipropil metilcelulose; Estabilidade de emulsão; Complexação; Emulsionante natural

ABSTRACT

Shimada, R. T. **Stability of emulsions using the biomass of *Arthrospira platensis* microalgae and hydroxypropyl methylcellulose polymer.** 2017. 84 p. Master Thesis – Post-Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Arthrospira platensis or Spirulina is a microalga with a high nutritional value. Extracts of Spirulina were prepared, characterized and applied as oil in water (O/W) (10 % v/v) emulsion stabilizers in the absence and presence of four types of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). The emulsions were prepared with edible sunflower oil. Crude extracts of Spirulina were prepared in buffers at pH 6 (CE6-Crude extract pH6) and pH 8 (CE8-Crude extract pH8) by sonication to promote cell lysis and protein and phospholipids release; part of the extracts was centrifuged (CCE6 or CCE8). Regardless of the extraction conditions, all extracts presented mean ζ -potential ranging from $-(16 \pm 2)$ mV to $-(20 \pm 2)$ mV, mean diameter ranging from (108 ± 52) nm to (306 ± 68) nm and interfacial activity. The emulsions prepared with Spirulina extracts (10 g/L) displayed particles with mean ζ -potential ranging from $-(16 \pm 2)$ mV to $-(27 \pm 4)$ mV, mean diameter ranging from ~ 70 nm (CCE6 or CCE8) to ~ 700 nm (CE6 or CE8). However, CE6 led to emulsions slightly more stable than the others did. The combination of CE6 (10 g/L) HPMC (1.0 wt %) led to substantial increase in the emulsion stability, although the ζ -potential values decreased one order of magnitude. Particularly, the HPMC with the highest molecular weight and highest methyl substitution degree led to the most (i) robust interfacial layer resulting from the complex formation between HPMC chains and CE6 proteins and (ii) viscous continuous medium.

Keywords

Spirulina; hydroxypropyl methylcellulose; emulsion stability; complexation; natural emulsifier

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

O/A - Óleo-em-água

A/O - Água-em-óleo

HPMC - Hidroxipropil metilcelulose

D.S. - Grau de substituição

M.S. - Substituição molar

CHN - Análise elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

US- Ultrassom

EB - Extrato Bruto

EC - Extrato Centrifugado

EB6 - Extrato Bruto em tampão pH=6

EB8 - Extrato Bruto em tampão pH=8

EC6 - Extrato Centrifugado em tampão pH-6

EC8 - Extrato Centrifugado em tampão pH-8

DLS - Espalhamento de luz dinâmico

T20 - Solução de Tween 20®

K4M - Hidroxipropil metilcelulose do tipo K4M

311 - Hidroxipropil metilcelulose do tipo 311

J5MS - Hidroxipropil metilcelulose do tipo J5MS

E4M - Hidroxipropil metilcelulose do tipo E4M

EB6+K4M (1%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero K4M na concentração de 1%

EB6+311 (1%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero 311 na concentração de 1%

EEB6 (10%) - Emulsão preparada com 10 %v/v de fase óleo com EB6 como emulsionante

EEB8 (10%) - Emulsão preparada com 10 %v/v de fase óleo com EB8 como emulsionante

EEC8 (10%) - Emulsão preparada com 10 %v/v de fase óleo com EC8 como emulsionante

EEC6 (10%) - Emulsão preparada com 10 %v/v de fase óleo com EC6 como emulsionante

EEB6 + 311 (1%) - Emulsão preparada com 10 %v/v de fase óleo com EB6 como emulsionante associada com 1% m/m de polímero 311

EEB6 (10%) + K4M (1%) - emulsão preparada com 10 %v/v de fase óleo com EB6 como emulsionante associada com 1% m/m de polímero K4M

E311 (1%) - Emulsão preparada com 10 % v/v de fase óleo utilizando apenas 1% m/m de polímero 311 como emulsionante

EK4M (1%) - Emulsão preparada com 10 %v/v de fase óleo utilizando apenas 1% m/m de polímero K4M como emulsionante

EEB6 (60%) - Emulsão preparada com 60 %v/v de fase óleo com EB6 como emulsionante

EEB6 (10%) + E4M (0,3%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero E4M na concentração de 0,3 % m/m

EEB6 (10%) + E4M (0,5%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero E4M na concentração de 0,5 % m/m

EEB6 (10%) + E4M (1,0%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero E4M na concentração de 1,0 % m/m

EEB6 (10%) + J5MS (0,3%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero E4M na concentração de 0,3 % m/m

EEB6 (10%) + J5MS (0,5%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero E4M na concentração de 0,5 % m/m

EEB6(10%) + J5MS (1,0%) - Extrato Bruto em tampão pH=6 associado com polímero E4M na concentração de 1,0 % m/m

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações técnicas e características físico-químicas do óleo de girassol.....	26
Tabela 2. Composição de ácidos estruturais do óleo de girassol.....	27
Tabela 3. Resultado das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio da biomassa seca de Spirulina.....	33
Tabela 4. Dados de tamanho médio de partícula e potencial- ζ médio dos extratos em intensidade	37
Tabela 5. Dados de tamanho médio de partícula e potencial- ζ médio dos extratos em número.....	39
Tabela 6. Comparação das medidas de tensão Superficial e Interfacial a $(20,0 \pm 0,1)$ °C determinadas pelos métodos do Anel de Du Nouy e Placa de Wilhelm para as amostras de EB e EC. Branco consistiu na solução de tampão fosfato (50x 10-3M) na presença de Merthiolate®.....	40
Tabela 7. Dados de tamanho de partículas e potencial- ζ para as emulsões O/A preparadas no mesmo dia em distribuição por intensidade	47
Tabela 8. Dados de tamanho de partículas e potencial- ζ para as emulsões O/A preparadas no mesmo dia em distribuição por números.....	48
Tabela 9. Massa molar média numérica (Mn), massa molar ponderal (Mw), polidispersidade (PD = Mw/Mn). (MARANI, 2015).....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da HPMC	21
Figura 2. Mecanismos de desestabilização de emulsões. Adaptado de (MCCLEMENTS, 2007)	22
Figura 3. Esquematização das etapas de obtenção dos extratos de Spirulina.....	29
Figura 4. Representação esquemática do preparo das emulsões.....	31
Figura 5. (a) Medidas espectrofotométricas para avaliar as condições de lise por ultrassom. O pico em 620 nm, de cor característica azul, é atribuída à presença de ficocianina (b), incluída na categoria das ficobiliproteínas.....	34
Figura 6. Leituras do espectrofotômetro em 280 nm e 800 nm para amostras de Spirulina na diluição 1:100 em tampão fosfato (50 mM, pH=6,0) em função do tempo de exposição das amostras a radiação ultrassônica (130W/cm ²)	36
Figura 7. Distribuição por intensidade do tamanho de partículas dos extratos aquosos de Spirulina preparados em tampão fosfato 0,05 mol. L-1. EC8 e EC6 referem-se aos extratos centrifugados em pH = 8 e 6, respectivamente. EB8 e EB6 referem-se aos extratos brutos em pH = 8 e 6, respectivamente.	37
Figura 8. Distribuição numérica do tamanho de partículas dos extratos aquosos de Spirulina preparados em tampão fosfato 0,05 mol. L-1. EC8 e EC6 referem-se aos extratos centrifugados em pH = 8 e 6, respectivamente. EB8 e EB6 referem-se aos extratos brutos em pH =8 e 6, respectivamente.....	39
Figura 9. Valores de tensão (A) superficial e (B) interfacial determinado pelos métodos da placa de Wilhelm e anel de Du Nouy para o Branco, EB, EC, T20 e associações de EB6 com 311 e K4M.....	42
Figura 10. Imagens de microscopia confocal antes e depois do tratamento de US. A Figura à esquerda representa uma célula de <i>Spirulina platensis</i> dispersa em tampão de fosfato 50 mM em pH=6 no estado pré-tratamento de US e a Figura à direita representa um estado de pós-tratamento com US.....	43
Figura 11. Distribuição em intensidade do tamanho de partícula das emulsões O/A preparadas em diferentes pH e condições do extrato. EEB6 e EEB8 referem-se às emulsões O/A preparadas com	

extrato bruto de Spirulina no pH 6 e 8, respectivamente. EEC6 e EEC8 referem-se às emulsões preparadas com o extrato centrifugado de Spirulina em pH 6 e 8 respectivamente.....45

Figura 12. Distribuição numérica do tamanho de partícula das emulsões O/A preparadas em diferentes pH e condições do extrato. EEB6 (10%) e EEB8 (10%) referem-se às emulsões preparadas com extrato bruto de Spirulina no pH 6 e 8, respectivamente. EEC6 (10%) e EEC8 (10%) referem-se às emulsões preparadas com o extrato centrifugado de Spirulina e pH 6 e 8 respectivamente.....46

Figura 13. Perfil de transmitância integrado coletados no Lumireader®416-1 das emulsões O/A preparadas com EB6, EC6, EB8 e EC8.....49

Figura 14. Imagens das emulsões EEB6 (10%), EEB8 (10%), EEC6 (10%) e EEC8 (10%) obtidas imediatamente após preparo.....50

Figura 15. Efeito da variação da concentração do extrato EB6 na estabilidade relativa das emulsões preparadas com EB6 com 10% v/v de óleo. A, B e C são Imagens registradas 45 minutos após a análise de perfil de transmitância de emulsões preparadas com 0,5%, 1,0% e 2,0% de extrato EB6, respectivamente. D representa uma comparação entre estabilidades relativas de emulsões com as três concentrações.....50

Figura 16. Efeito da variação da concentração do extrato EB6 na estabilidade relativa das emulsões preparadas com EB6 com 60% v/v de óleo. D, E e F são Imagens registradas 45 minutos após a análise de perfil de transmitância de emulsões preparadas com 0,5%, 1,0% e 2,0% de extrato EB6, respectivamente. G representa uma comparação entre estabilidades relativas de emulsões com as três concentrações.....51

Figura 17. Esquematização gráfica dos valores de DS e MS das HPMC utilizadas nas emulsões. (MARANI, 2015).....52

Figura 18. Perfis de transmitância das emulsões O/A com 10% de óleo, preparadas com associação do extrato EB6 ou EB8 com diferentes tipos de HPMC. A, B, C e D referem-se à associação de EB6 com E4M, K4M, J5MS e 311, respectivamente, nas concentrações m/m 0,3%, 0,5% e 1%. E refere-se à comparação da combinação de EB8 e EB6 com os derivados de celulose na concentração de 1% em massa.....53

Figura 19. Comparação dos perfis de transmitância das emulsões O/A (10% v/v óleo) com e sem HPMC. O perfil da esquerda compara a estabilidade de uma emulsão preparada apenas com o EB6, a

associação de EB6 e 311 e uma emulsão preparada apenas com 311. O perfil da direita faz a mesma comparação com o polímero K4M.....54

Figura 20. Imagens de microscopia confocal das emulsões preparadas com o extrato bruto de Spirulina. A) Emulsão preparada com EB6 com 10% de óleo v/v; B) Emulsão preparada com EB6 na presença de 1% de polímero HPMC 311 com 10% de óleo; C) Emulsão preparada com EB6 na presença de 60% fase óleo; D) Emulsão preparada com EB6 na presença de 1% de polímero HPMC K4M com 10% de óleo.....55

Figura 21. Distribuição do tamanho de partículas de emulsões O/A com diferentes sistemas emulsionantes. A e B são emulsões preparadas com EB6 e associadas com 311 e K4M na mesma concentração das anteriores respectivamente. C e D são emulsões preparadas apenas com os polímeros 311 e K4M na concentração de 1% em massa.....57

Figura 22. Distribuição do tamanho de partículas de emulsões O/A com diferentes sistemas emulsionantes obtida por análise numérica. E e F são emulsões preparadas com EB6 e associadas com 311 e K4M na mesma concentração das anteriores respectivamente. G e H são emulsões preparadas apenas com os polímeros 311 e K4M na concentração de 1% em massa.....58

Figura 23. Comparação entre a estabilidade das emulsões EEB6 (10%), EEB6 (60%), EEB6 (10%)+311 (1%) e EEB6(10%)+K4M (1%) por meio de registros fotográficos e perfil de transmitância ao final de seis semanas a 25°C. A, D, G e J referem-se à aparência inicial das emulsões após uma hora do preparo e B, E, H e K referem-se à aparência das emulsões após seis semanas à 25°C. C, F, I e L são os perfis de transmitância das curvas iniciais e após seis semanas.....60

Figura 24. Análise das curvas de transmitância ao longo do comprimento do tubo para um período de seis semanas. A)EEB6(10%); B)EEB6(60%); C)EEB6(10%)+311(1%); D)EEB6(10%)+K4M(1%). Abaixo, uma comparação das integrações das áreas dos gráficos de cada amostra ao longo das semanas.....61

Figura 25. Representação esquemática das emulsões estabilizadas por (a) lipídeos e proteínas do EB6, (b) polímero K4M, (c) polímero 311, (d) complexos de K4M e proteínas e lipídeos de EB6, (e) complexos de 311 e proteínas e lipídeos de EB6.....63

Figura 26. Curvas de fluxo a 25°C para as diferentes emulsões na presença e ausência de HPMC além de soluções com apenas os polímeros dispersos em água.....65

Figura 27. Curvas de viscosidade em escala (a) linear e (b) logarítmica, a 25°C para as diferentes emulsões na presença e ausência de HPMC além de soluções com apenas os polímeros dispersos em água.....	66
Figura 28. Ajustes lineares para as curvas de fluxo (Figura 27b) determinadas para (a) EEB6 (10%)+311 (1%) e (b) solução aquosa de 311 (1%) utilizando o modelo empírico da lei das potências (Equação 2).....	67
Figura 29. Representação esquemática do crescimento das bolhas sob o fenômeno de cavitação acústica. Adaptado de (LEONG ET AL, 2011).....	74
Figura 30. Configuração óptica do equipamento Zetasizer Nano ZS para medidas de potencial- ζ , Adaptado de MALVERN INSTRUMENTS.....	77
Figura 31. Configuração óptica do equipamento Zetasizer Nano ZS para medidas de espalhamento de luz dinâmico. Adaptado de MALVERN INSTRUMENTS.....	79
Figura 32. Representação do método do anel de du Nouy.....	80
Figura 33. Representação do método da placa de Wilhelmy. Adaptado de https://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/wilhelmy-plate-method/ . Acesso em 19/11/2016.....	81
Figura 34. Ilustração do tubo com amostra e localização da fonte luminosa e sensor no equipamento. O gráfico ilustra a variação de concentração de partículas do coloide para o mecanismo de desestabilização por sedimentação ao longo do tubo. Adaptado de http://www.lumireader.com/technology/ . Acesso em 19/11/2016.....	83
Figura 35. Ilustração de acúmulo de perfis de transmitância de uma amostra sob o mecanismo de sedimentação ao longo do tempo e integração dos perfis para a variação da transmitância ao longo do tempo do experimento. Adaptado de http://www.lumireader.com/technology/ . Acesso em 19/11/2016.....	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. <i>Arthrospira platensis</i>	19
1.2. Definição de emulsões e estabilidade.....	20
1.3. HPMCs.....	21
1.4. Mecanismos de instabilidade de emulsões.....	22
1.5. Uso de microalgas para estabilização de emulsões.....	23
1.6. Associação de proteínas com polissacarídeos.....	24
2. OBJETIVOS	25
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
3.1. Materiais.....	26
3.2. CHN da biomassa de <i>Spirulina</i> desidratada.....	27
3.3. Processo de obtenção do extrato de <i>Spirulina</i>	28
3.4. Avaliação da extração de proteínas em diferentes pH de tampão fosfato e diferentes tempo de exposição ao US.....	28
3.5. Medidas espectrofotométricas para avaliar as condições de lise por ultrassom.....	28
3.6. Caracterização do extrato aquoso de <i>Spirulina</i>	29
3.6.1. Potencial - ζ , distribuição de tamanho de partículas.....	29
3.6.2. Medidas da tensão superficial e interfacial.....	29
3.6.3. Microscopia confocal dos extratos.....	30
3.7. Preparo, caracterização e estudo das estabilidades das emulsões.....	30
3.7.1. Preparo das emulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A).....	30
3.7.2. Caracterização das emulsões através de espalhamento de luz dinâmico e potencial - ζ	31
3.7.3. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões através de análise de separação.....	31
3.8. Preparo, caracterização e estudo das estabilidades das emulsões na presença de HPMC.....	31
3.8.1. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões na presença de HPMC através da tecnologia STEP.....	32

3.8.2. Caracterização das emulsões na presença de HPMC por medidas de potencial - ζ e distribuição de tamanho de partículas.....	32
3.8.3. Microscopia confocal das emulsões associadas com HPMC.....	32
3.8.4. Avaliação das estabilidades das emulsões através dos perfis de luz transmitida ao longo do tubo durante 6 semanas.....	32
3.8.5. Medidas de viscosidade.....	32
3.9. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Determinação do teor proteico na biomassa de Spirulina desidratada.....	33
4.2. Avaliação da extração de proteínas em diferentes pH de tampão fosfato.....	33
4.3. Caracterização do extrato aquoso de Spirulina.....	36
4.3.1. Potencial - ζ , distribuição e tamanho de partículas.....	36
4.3.2. Medidas da tensão superficial e interfacial.....	39
4.3.3. Imagens da microscopia confocal dos extratos.....	41
4.4. Caracterização das emulsões na ausência e presença de HPMC.....	42
4.4.1. Distribuição de tamanho de partículas e potencial- ζ	42
4.4.2. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões através de perfis de transmitância integrados.....	47
4.5. Efeito da variação da concentração do extrato EB6 na estabilidade relativa das emulsões.....	49
4.6. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões com HPMC através de perfis de transmitância.....	50
4.7. Imagens da microscopia confocal das emulsões associadas ou não com HPMC.....	53
4.8. Caracterização das emulsões associadas com HPMC por potencial- ζ e distribuição de tamanho de partículas.....	55
4.9. Análise da estabilidade das emulsões com e sem HPMC durante seis semanas.....	58
4.10. Análise reológica.....	62
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
7. APÊNDICE.....	74
7.1. O fenômeno de cavitação acústica.....	74

7.2. Definição de potencial $-\zeta$	74
7.3. Determinação do potencial $-\zeta$	75
7.4. Espalhamento de luz dinâmico.....	77
7.5. Determinação do espalhamento de luz dinâmico.....	78
7.6. Tensão superficial.....	79
7.7. Medida de estabilidade relativa através do STEP (Space and Time Resolved Extinction Profiles).....	82
8. CURRICULUM VITAE.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis, conhecida também por *Spirulina platensis*, é uma cianobactéria Gram negativa pertencente ao grupo *Cyanobacterium* (conhecido como grupo das microalgas verde-azuladas). São considerados seres multicelulares e filamentosos, sendo cada filamento denominado tricoma com aproximadamente 5 micrômetros em tamanho. Tais tricomas variam consideravelmente em comprimento e são tipicamente encontradas em formato de espiral (CIFERRI, 1983).

Arthrospira platensis, denominada doravante Spirulina, é típica de ambientes aquáticos de clima tropical e subtropical com alto pH (8-11), nos quais se encontram altos níveis de íons carbonato e bicarbonato. Naturalmente, podem ser encontradas em lagos da África, Ásia e regiões da América do Sul (GAO & MA, 2008). Atualmente, a Spirulina é comercializada e consumida em países como Alemanha, Brasil, Chile, Espanha, França, Canadá, Bélgica, Egito, Estados Unidos, Irlanda, Argentina, Filipinas e Índia onde órgãos de regulamentação pública já oficializaram e autorizaram seu uso para consumo humano (ALI & SALEH, 2012). No Brasil, a produção comercial de microalgas no Brasil tem sido realizada por empresas privadas (localizadas no litoral de Santa Catarina e em vários Estados da Região Nordeste) que produzem a biomassa e a empregam na alimentação de camarões, peixes e moluscos (DERNER ET AL, 2006).

Spirulinas são consideradas seres foto autótrofos, obtendo sua energia da luz do sol e convertendo dióxido de carbono e água em açúcares. As células da Spirulina contêm moléculas especializadas em auxiliar o processo de fotossíntese como clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, que são pigmentos capazes de absorver a energia da luz e redirecioná-las para centros reacionais nos quais ocorre a fotossíntese. (FUJISAWA, 2010).

Estudos a respeito da composição da Spirulina começaram por volta de 1970 (ALI & SALEH, 2012). Em sua composição pode-se destacar o elevado teor proteico com composição de 60% a 70% de sua massa seca; lipídeos constituem por volta de 4%-7%; os carboidratos encontram-se por volta de 13,6% (SHALABY ET AL, 2010); possui 2,2%-3,5% de RNA e 0,6%-1% de DNA. Pigmentos naturais como carotenos, clorofila a e a ficocianina são encontrados em menor quantidade (ANDRADE & COSTA, 2008). A Spirulina possui importância comercial

devido ao seu uso na alimentação humana como complemento alimentar e para animais, como ração. Seus pigmentos são utilizados como corantes de elevado valor nas indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos. (VONSHAK, TOMASELLI, 1995), (MARQUEZ ET AL, 1995).

1.2. Definição de emulsões e estabilidade

Uma emulsão é uma dispersão de gotículas de um líquido em outro líquido no qual é imiscível. Emulsões de gotículas de uma fase óleo em uma fase aquosa são indicadas pelo símbolo O/A e emulsões de gotículas aquosas em uma fase óleo são indicadas por A/O. Em uma emulsão, a fase que compreende as gotículas (descontínua ou interna) é estabilizada em outra fase líquida (contínua ou externa) através da ação de um emulsionante.

As emulsões podem ser sistemas naturalmente gerados ou produzidos pelo homem. Na natureza apresentam-se no leite, no látex (seiva das seringueiras), processos digestivos entre outros. As emulsões sintéticas estão presentes em nossa vida diária em produtos como tintas, cosméticos, agrotóxicos, alimentos e nos processos de indústrias petrolíferas. (MCCLEMENTS, 2007)

As caracterizações das emulsões envolvem a determinação relativa da fase óleo e água, distribuição de tamanho da fase dispersa, comportamento reológico e estabilidade, sendo esta última uma das propriedades mais relevantes. De maneira geral, emulsões sintéticas devem manter-se estáveis e homogêneas sobre certo período de tempo visando sua aplicação como, por exemplo, em fármacos, alimentos e bebidas. Em algumas situações, porém, deseja-se justamente o contrário, como no caso da formação de emulsões estáveis resultantes do processo de recuperação primária do petróleo. (CLAUSSE ET AL, 2005)

O emulsificante é uma substância que tem um papel importante na estabilização das emulsões, adsorvendo-se na interface das gotículas da fase dispersa, formando uma camada protetora que previne estas de se agregarem com as outras. Alguns exemplos de emulsionantes seriam certos tipos de proteínas, polissacarídeos, fosfolípidios, pequenas moléculas de surfactantes, asfaltenos e partículas sólidas. (WHITEHURST, R.J., 2004). Um emulsificante primordialmente tem a capacidade de reduzir a tensão interfacial e, assim, facilitar o rompimento e formação de gotículas menores no processo de produção de uma emulsão. (MCCLEMENTS, GUMUS, 2016)

Outra maneira de aumentar a estabilidade de uma emulsão seria através do aumento da viscosidade da fase contínua (pela adição de espessantes) ou da formação de redes de gel na fase contínua (pela adição de agentes gelificantes), (WALSTRA, 1993) reduzindo o

movimento das gotículas. Alguns exemplos de espessantes seriam o amido, amido modificado, celulose modificada, alginato e algumas proteínas do ovo. No trabalho em questão foi estudado o efeito do modificador de viscosidade hidroxipropil metilcelulose (HPMC).

1.3. HPMCs

Hidroxipropil metilceluloses são éteres modificados sinteticamente a partir do polímero natural da celulose possuindo, assim, uma estrutura principal composta por unidades de anidroglicose. Durante a manufatura dos éteres de celulose, as fibras de celulose são aquecidas em solução alcalina na presença de óxido de propileno e cloreto de metila os quais geram os substituintes hidroxipropila e metila, respectivamente, como representado na Figura 1. (WANG, DONG, XU, 2007)

As HPMCs, presentes na forma de pó de coloração branca, são consideradas seguras para consumo humano, sendo comumente utilizadas pela indústria alimentícia como emulsificante, formador de filme, estabilizante, agente de suspensão ou espessante (BURDUCK, A., 2007)

Figura 1 - Representação da estrutura da HPMC

A quantidade de grupos substituintes nas unidades de anidroglicose do polímero de celulose pode ser classificada através do número médio de grupos substituintes ligados ao anel, conceito conhecido como grau de substituição (D.S.). Caso todas as três posições de hidroxila disponíveis em uma unidade de glicose anidra forem substituídas, D.S. é considerado como 3; se uma média de duas posições no anel reagiram, o D.S. é considerado 2 e assim por diante. Nas HPMCs o DS caracteriza o grau de substituição das hidroxilas por grupos metila.

A substituição molar (MS) relaciona-se com o número de moles de grupos hidroxipropil substituídos por mol de anidroglicose. A designação por moles se faz necessária, pois os grupos hidroxipropil possuem um grupo hidroxila, capaz de sofrer reações em cadeia. (GREMINGER ET AL, 1974)

1.4. Mecanismos de instabilidade de emulsões

A estabilidade de uma emulsão se refere à habilidade da mesma de resistir às mudanças nas suas propriedades físico-químicas com o passar do tempo. Emulsões possuem uma tendência natural para separar-se devido à alta tensão interfacial, mesmo na presença de emulsionantes apresentando um comportamento termodinamicamente instável, porém, podendo ser cineticamente estáveis por longos períodos de tempo.

Dentre os mecanismos físico-químicos de desestabilização de emulsões temos a separação gravitacional (ascensão ou “creaming” e sedimentação), floculação, inversão de fase, coalescência e envelhecimento de Ostwald. (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismos de desestabilização de emulsões adaptado de (MCCLEMENTS, 2007)

No processo de separação gravitacional, as gotículas podem se mover para cima (ascensão ou “creaming”), se possuírem densidade menor que a da fase contínua, ou podem se mover para baixo (sedimentação), se possuírem densidade maior que a da fase contínua. A floculação é o processo de agregação de duas ou mais gotículas onde cada uma mantém a sua integridade individual. No processo de coalescência, duas ou mais gotículas se unem para formar uma gotícula maior. Envelhecimento de Ostwald é o processo no qual gotículas

maiores crescem à custa de gotículas menores devido ao transporte de massa da fase dispersa pela fase contínua. Segundo a equação de Laplace, a diferença de pressão dentro e fora da gotícula (ΔP) é maior quanto menor for o raio da gotícula (r) e maior for a tensão interfacial entre as fases óleo e água ($\gamma_{O/A}$):

$$\Delta P = \frac{2\gamma_{O/A}}{r} \quad (1)$$

Quando há uma miscibilidade mínima de uma fase na outra, moléculas das gotículas difundem através da fase contínua para coalescer nas gotículas maiores, onde ΔP é menor porque o r é maior.

A inversão de fase seria a transição de uma emulsão O/A para uma A/O ou vice-versa. Tais mecanismos de instabilidade físico-química normalmente estão inter-relacionados como a ascensão ou sedimentação de gotículas devido ao aumento de tamanho proporcionado por coalescência, envelhecimento de Ostwald ou floculação. (MCCLEMENTS, 2007)

1.5. Uso de microalgas para estabilização de emulsões

O aumento da demanda por produtos comerciais mais ecologicamente corretos e sustentáveis levam ao estudo de alternativas para os emulsificantes sintéticos, sendo crescente o interesse pelas propriedades de moléculas como saponinas, proteínas globulares, polissacarídeos e fosfolipídios (BOUYER ET AL, 2012).

Dentre os estudos realizados para avaliação de novos emulsificantes para uso na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética o uso de proteínas derivadas de microalgas como *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris*. (URSU ET AL, 2014; BENELHADJ ET AL, 2016)

Particularmente, o uso da *Arthrospira platensis* se mostra interessante pela sua rica composição proteica e potencial nutricional da sua biomassa. Estudos anteriores mostram que os complexos proteicos como a ficocianina, pigmento que auxilia na atividade fotossintética das microalgas (e que pode ser encontrado em até 20% de sua massa seca) (VONSHAK, 1997) apresentam capacidade de redução da tensão superficial entre ar e água, e consequentemente, potencial para serem utilizados como emulsionantes (CHRONAKIS ET AL, 2000)

Outros estudos compararam proteínas extraídas da Spirulina com proteínas do ovo (NIRMALA ET AL, 1992) e soja (DEVI ET AL, 1984) encontrando valores superiores em relação à capacidade emulsionante e estabilidade de emulsões preparadas com óleo de amendoim

refinado sendo estas propriedades associadas a grupos de proteínas de baixa massa molar, a qual varia de 14.300 a 66.000 g/mol.

Grupos de pesquisa brasileiros também possuem trabalhos publicados a respeito da utilização de proteínas de microalgas, mais especificamente a ficocianina, pigmento proteico de propriedades antioxidantes como um aditivo de estabilização e emulsificação em sorvetes visando a indústria alimentícia. (RODRIGUES ET AL, 2012)

1.6. Associação de proteínas com polissacarídeos

Polissacarídeos e proteínas são utilizados com bastante frequência como componentes funcionais em várias formulações de emulsões da indústria alimentícia, sendo a sua associação bastante interessante por poder aumentar a estabilidade de emulsões, e consequentemente, aumentar o tempo de prateleira dos produtos (GHOSH & BANDYOPADHYAY, 2012). Outro efeito bastante relevante proveniente desta associação seria a alteração das propriedades organolépticas das formulações como cor, odor e textura (MORRIS, 1994).

Apesar de ser possível encontrar alguns trabalhos de grupos preocupados em estudar a viabilidade do uso da biomassa de Spirulina para a estabilização de emulsões, não foram encontrados trabalhos que tratem da associação da mesma com polissacarídeos ou polímeros como HPMC. Torna-se, portanto, relevante um estudo a respeito da caracterização e comportamento de emulsões preparadas com esta associação visando a aplicação da biomassa de Spirulina em formulações do ramo alimentício.

2. Objetivos

Esta dissertação tem por objetivos estudar:

- (i) As características e estabilidade de emulsões preparadas com a biomassa de *Spirulina platensis* na forma de diferentes extratos.
- (ii) Avaliar a influência de diferentes HPMC e seu efeito na estabilidade das emulsões preparadas com biomassa de *Spirulina*, bem como propor as melhores combinações entre HPMC e extratos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

A *Spirulina*, desidratada e em formato de flocos, foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC. Foram preparadas soluções tampão de fosfato (50 mmol.L^{-1} , pH = 6,0, 7,0 e 8,0) através de sais NaHPO_4 e NaH_2PO_4 fornecidos pela Synth, aos quais foi adicionada solução de Merthiolate® (Digluconato de Clorexidina, 10 mg.mL^{-1}) na proporção de $1 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de Merthiolate® para cada $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solução tampão fosfato. O Merthiolate inibe a proliferação de fungos no meio. A solução de Tween 20 (Sigma-Aldrich) foi preparada na concentração de $0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$ (acima da concentração micelar crítica) no mesmo tampão fosfato. Para o preparo das emulsões tipo O/A e A/O e medidas de tensão interfacial utilizou-se óleo de girassol da marca Bunge comprado em um supermercado local. As especificações técnicas e composição e do óleo de girassol são descritas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Especificações técnicas e características físico-químicas do óleo de girassol

ÍNDICES	UNIDADES	VALORES DE REFERÊNCIA
Peso Específico (25°C)	g/cm^3	0,915 - 0,920
Índice de Refração (25°C)	-	1,467 - 1,469
Índice de Iodo	$\text{g I}_2 / 100\text{g}$	110 - 143
Índice de Saponificação	mg KOH/g	188 - 194
Matéria Insaponificável	%	< 1,5%
Acidez, óleo refinado	$\text{g ácido oleico/100g}$	< 0,3
Índice de Peróxido	meq/kg	< 10,0

Valores de Referência: RDC Nº482, de 23/09/1999, da Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA.

Tabela 2-Composição de ácidos estruturais do óleo de girassol

ÁCIDOS GRAXOS	ESTRUTURA	VALORES DE REFERÊNCIA (%)
	C<14	< 0,4
Ácido Mirístico	C14:0	< 0,5
Ácido Palmítico	C16:0	3,0 - 10,0
Ácido Palmitoleico	C16:1	< 1,0
Ácido Esteárico	C18:0	1,0 - 10,0
Ácido Oleico (Ômega 9)	C18:1	14,0 - 35,0
Ácido Linoleico (Ômega 6)	C18:2	55,0 - 75,0
Ácido Linolênico (Ômega 3)	C18:3	< 0,3
Ácido Araquídico	C20:0	< 1,5
Ácido Eicosenoico	C20:1	< 0,5
Ácido Behênico	C22:0	< 1,0
Ácido Erúcico	C22:1	< 0,5
Ácido Lignocérico	C24:0	< 0,5
Ácido Nervônico	C24:1	< 0,5

Valores de Referência: RDC Nº482, de 23/09/1999, da Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA.

As emulsões O/A foram preparadas com extrato de Spirulina na ausência e presença de quatro tipos de hidroxipropil metilcelulose (HPMC), Methocell K4M, J5MS, 311 e E4M de grau alimentício, cedidos gentilmente pela Dow Sudeste Brasil Ltda. Os polímeros foram dispersos na fase aquosa na concentração de 2 % em massa e esta solução concentrada foi utilizada para preparar as emulsões associadas com HPMC.

Para a coleta de imagens por microscopia confocal, foi utilizado como corante o Vermelho do Nilo diluído em metanol. O Vermelho do Nilo cora seletivamente somente regiões hidrofóbicas, como os lipídeos dos extratos de microalga utilizados nas emulsões. (HAYNES & CHO, 1988)

3.2. CHN da biomassa de Spirulina desidratada

Foi realizada uma análise elementar para carbono, hidrogênio e nitrogênio com o equipamento Perkin Elmer – CHN 2400, disponível na Central Analítica. Foi analisada em duplicata uma amostra da biomassa desidratada de Spirulina utilizada no preparo das emulsões e extratos. A análise de CHN permitiu analisar o teor de proteínas da amostra

através da multiplicação da porcentagem de nitrogênio por 6,25, como descrito na norma - 510-42625. (HAMES ET AL, 2008) NREL/TP

3.3. Processo de obtenção do extrato de Spirulina

A biomassa de Spirulina em formato de flocos foi macerada em um cadinho de porcelana até a obtenção de um pó bastante fino de modo a aumentar a área de contato no processo de lise da parede celular. O pó de Spirulina foi pesado e adicionado à solução de tampão fosfato em um tubo Falcon na concentração de 20 g de pó de Spirulina / L de solução tampão. O tubo Falcon foi colocado em um suporte sob banho de gelo durante a aplicação do ultrassom conforme a Figura 3. Utilizou-se o processador de US Hielscher UP100H cuja frequência aplicada era de 30 kHz e um sonotrodo da categoria MS7 (130 W/cm²) no modo de aplicação contínuo e máxima amplitude durante 5 minutos.

3.4. Avaliação da extração de proteínas em diferentes pH de tampão fosfato.

Para a avaliação do efeito do pH do meio fornecido pelo tampão de fosfato na quantidade de proteínas extraídas pelo processo de ultrassom, foram analisadas amostras de extrato centrifugado por 30 minutos em 4000 rpm (1073 g, centrífuga FANEN) nos pH 6, 7 e 8 preparadas com 6 minutos de exposição à radiação de ultrassom. As amostras foram diluídas em 1:100 (v/v) e suas absorbâncias foram lidas no espectrofotômetro Beckman Coulter DU 600 na faixa de comprimento de onda de 300 a 700 nm.

3.5. Medidas espectrofotométricas para avaliar as condições de lise por ultrassom

Foi utilizado o espectrofotômetro Beckman Coulter DU 600 para medir as absorbâncias do extrato de Spirulina na diluição de 1:100 (v/v) em duas condições: extrato bruto (EB) resultante direto do processo de extração e extrato centrifugado (EC) resultante do processo de centrifugação (centrífuga FANEN) a 1431 g durante 30 minutos, do qual descartou-se o conteúdo sólido acumulado no fundo do tubo de centrifugação. Os EBs preparados nos tampões em pH 6 e pH8 foram codificados como EB6 e EB8, respectivamente. As medidas foram feitas em triplicata com leitura em comprimento de onda fixo em 800 nm para EB e 280 nm para o EC sendo realizada imediatamente após a agitação manual das amostras. Os valores de 280 nm e 800 nm estão relacionados com a quantidade de proteínas liberadas no meio (ligações peptídicas) e a lise da célula (espalhamento de luz dos fragmentos maiores), respectivamente. Foram analisadas amostras de EB após tempos de exposição ao ultrassom que variavam de zero a oito minutos. Estas mesmas amostras eram submetidas à centrifugação nas condições citadas e seu sobrenadante de cor azulada era analisado como

CE6 ou CE8, correspondendo aos preparos em tampões de pH 6 e pH 8, respectivamente. A cor azul está relacionada com a presença do pigmento ficocianina, cujo grupo cromóforo pode ser observado na Figura 5b.

Figura 3 - Esquema representativo das etapas de obtenção dos extratos de Spirulina.

3.6. Caracterização do extrato aquoso de Spirulina

3.6.1. Potencial ζ , distribuição de tamanho de partículas

Os extratos EB6, EB8, EC6 e EC8 foram caracterizados através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial ζ na temperatura de 25°C com o equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido) operando com laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) com potência de 4 mW, disponível na Central Analítica do IQUSP. As medidas foram realizadas em triplicata sob a diluição de 1:100 em volume nos respectivos tampões utilizando as configurações padrão do software do equipamento.

3.6.2. Medidas da tensão superficial e interfacial do extrato de Spirulina

Usou-se para as medidas de tensão superficial e interfacial do extrato de *Spirulina* o tensiômetro (Krüss K100) na temperatura de $(20,0 \pm 0,1)$ °C e um recipiente de vidro, o qual foi

previamente limpo com uma mistura de água destilada, hidróxido de amônio e peróxido de hidrogênio na proporção de 8:1:1 em volume, respectivamente, a aproximadamente 50 °C, por 15 min. As dispersões de EB e EC nas concentrações de 1 g / 100 mL foram preparadas em tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH = 6,0), no mesmo dia em que foram analisadas. Foram feitas associações dos extratos EB6 com os polímeros K4M e 311 na concentração de 1% para avaliar o efeito da associação dos polímeros na tensão superficial e interfacial. As medidas foram realizadas em duplicata respeitando-se o tempo de equilíbrio de 15 minutos, através do método do anel de Du Nouy e da placa de Wilhelmy; ambos foram limpos em chama oxidativa de um bico de Bunsen, aguardando o resfriamento antes de cada medida. Mediu-se um branco na ausência dos extratos EC e EB, o qual consistia no tampão fosfato 50 mmol. L⁻¹ (pH=6,0) com adição de Merthiolate® na concentração previamente citada. As medidas de tensão interfacial foram realizadas conforme o procedimento indicado pela fabricante no qual insere-se o anel ou placa na solução aquosa e em seguida, adiciona-se lentamente a fase óleo de mesmo volume por cima da aquosa com o auxílio de uma pipeta.

3.6.3. Microscopia confocal dos extratos

Amostras de extrato do tipo EB6 bem como as emulsões preparadas com HPMCs e extratos de microalga foram analisadas através de microscopia confocal, no Microscópio Zeiss modelo LSM 510-Meta, disponível na Central Analítica do IQUSP. Nas amostras de extratos de Spirulina não foi necessária nenhuma adição de corante visto que as proteínas da Spirulina apresentam alta resposta à fluorescência. Os comprimentos de excitação e emissão fornecidos pelo software do microscópio foram 552 nm e 636 nm, respectivamente. (MARINÉ, CLAVERO, ROLDÁN, 2004).

3.7. Preparo, caracterização e estudo das estabilidades das emulsões

3.7.1. Preparo das emulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A)

As emulsões foram preparadas em tubos Falcon de 14 mL, aos quais se adicionou óleo de girassol na proporção de 60% ou 10% em volume, completando o restante com os extratos EB e EC na concentração de 10 g de pó de Spirulina / L de tampão fosfato 50 mM nos pH de 6,0 e 8,0. A mistura era inicialmente submetida à agitação tipo vortex por 2 minutos e em seguida, aplicava-se radiação ultrassônica (US Hielscher UP100H) nos mesmos parâmetros utilizados na

lise celular para a obtenção do extrato. Para as emulsões contendo os polímeros HPMC, uma solução mãe do polímero em questão na concentração de 2,0 % (m/m) dissolvida no tampão fosfato de pH=6 ou pH=8 era adicionada na emulsão preparada com o extrato de modo que a concentração final do polímero na emulsão fosse de 0,3% (m/m), 0,5% (m/m) ou 1,0% (m/m). A Figura 4 ilustra o preparo das emulsões.

Figura 4 - Representação esquemática do preparo das emulsões.

3.7.2. Caracterização das emulsões através de espalhamento de luz dinâmico e potencial - ζ

As emulsões O/A e A/O foram caracterizadas através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial - ζ com o mesmo procedimento utilizado para a caracterização dos extratos. A caracterização por DLS e potencial - ζ das emulsões foi complementada por imagens fotográficas obtidas regularmente durante três semanas.

3.7.3. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões através de análise de separação

A estabilidade coloidal das emulsões foi avaliada pelo equipamento de análise de separação LUMiReader®416-1 (L.U.M., Alemanha), na temperatura de $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$. O software SEP View 4.01 registra curvas de intensidade de luz transmitida integrada ao longo da emulsão O/A contida em uma cubeta de vidro de caminho óptico de 1 cm e 5 cm de comprimento, em função do tempo; dessa forma, pode-se estudar a estabilidade da emulsão em função do tempo. O recipiente no qual foram analisadas as emulsões foi inclinado a 20° de modo a maximizar a instabilidade e o tempo de estudo foi de 45 minutos (ver Apêndice).

3.8. Preparo, caracterização e estudo das estabilidades das emulsões na presença de HPMC

3.8.1. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões na presença de HPMC através da análise de separação

O preparo de emulsões na presença de HPMC foi realizado em tubo Falcon de 14 mL com os componentes extrato de Spirulina, óleo de girassol, tampão fosfato no pH desejado e solução concentrada de polímero HPMC. Os componentes foram submetidos ao ultrassom sob banho de gelo nas condições previamente apresentadas para o preparo das emulsões sem HPMC. As emulsões preparadas com EB6 com 10% v/v em fase óleo foram associadas aos quatro tipos de HPMC (E4M, 311, K4M e J5MS) nas concentrações de 0,3%, 0,5% e 1,0% em massa e a seguir foram medidas as suas estabilidades através do perfil de transmitância do LUMiReader®416-1. Além das associações, foram realizadas leituras de estabilidade com emulsões preparadas apenas com os polímeros 311 e K4M na concentração de 1% em massa.

3.8.2. Caracterização das emulsões na presença de HPMC por medidas de potencial ζ e distribuição de tamanho de partículas

As emulsões com melhor desempenho no perfil de transmitância das associações com HPMC (EB6+311 e EB6+K4M) para 10% e 60% de volume em óleo foram caracterizadas através de tamanho, distribuição de partículas e potencial- ζ e seus resultados foram confrontados com emulsões O/A preparadas apenas com os polímeros 311 e K4M na concentração de 1% m/m.

3.8.3. Microscopia confocal das emulsões associadas com HPMC

Para marcar as gotículas da fase óleo das emulsões foi utilizado o corante Vermelho do Nilo, diluído em metanol a 1% em volume (MARINÉ, CLAVERO, ROLDÁN, 2004). Os comprimentos de excitação e emissão usados fornecidos pelo software do microscópio foram os mesmos dos experimentos com os extratos sendo 552 nm e 636 nm, respectivamente.

3.8.4. Avaliação das estabilidades das emulsões através dos perfis de luz transmitida ao longo do tubo durante 6 semanas

Amostras das emulsões EEB6(10%), EEB6(60%), EEB6(10%)+311 (1%) e EEB6(10%)+K4M (1%) foram submetidas à estudo de estabilidade ao longo de seis semanas através da análise do perfil de transmitância ao longo do tubo acompanhado por registros fotográficos.

3.8.5. Medidas de viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas no Viscotester IQ (Haake), utilizando um sistema de controle de temperatura tipo Peltier, com rotor CC25 de cilindros coaxiais com tamanho de 25 mm, conforme a norma DIN53019. Foram analisadas amostras de EEB6(10%), EEB6 (10%)+K4M (1%), K4M (1%), EEB6(10%)+311 (1%), EEB6(60%) e 311 (1%) a 25°C.

3.9. Análise estatística

A análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste *post hoc* foi utilizada para avaliar as diferenças entre os grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado uma diferença significativa. As análises foram realizadas no Excel 2013® para Windows® (Microsoft Office Home e Student®, 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do teor proteico na biomassa de *Spirulina* desidratada

As medidas de CHN realizadas para a amostra de biomassa seca forneceram as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio indicadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio da biomassa seca de *Spirulina*

Amostra	% Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
<i>Spirulina em pó</i>	40,5±0,1	6,62±0,03	8,0±0,1

O teor de proteínas encontrado ao aplicar a norma NREL/TP-510-42625 foi de 49,78% com desvio de 1,15%. A composição encontrada para a amostra analisada apresentou conteúdo proteico semelhante a um estudo de composição química da *Spirulina platensis* da Fazenda Tamanduá realizado pela Embrapa (MANRICH ET AL, 2014).

4.2. Avaliação da extração de proteínas em diferentes pH de tampão fosfato e diferentes tempo de exposição ao US

As análises de absorbância dos extratos centrifugados indicaram, indiferentemente do pH, um significativo pico de absorbância no comprimento de onda de 620 nm (Figura 5), característico da presença da ficobiliproteína ficocianina-c (BOUSSIBA & RICHMOND, 1979). A ficocianina-c é o pigmento participante do processo de fotossíntese da *Spirulina* que consiste em aproximadamente em 20% em massa das proteínas celulares, sendo o pigmento

quantitativamente predominante. Um estudo anterior (CHRONAKIS ET AL, 2000) relaciona a capacidade de redução da tensão interfacial na interface água - ar ao conjunto de proteínas extraídas da *Spirulina*, atribuindo esta característica, principalmente aos complexos proteicos e pigmentos como a ficocianina-c. A presença mais intensa da absorbância em 620 nm no pH 6 indicaria uma maior concentração no sobrenadante de ficocianina-c do que em tampões de pH mais elevado, informação que pode ser associada à uma melhor estabilidade de emulsões preparadas com este tampão.

Figura 5 – (a) Medidas espectrofotométricas para avaliar as condições de lise por ultrassom. O pico em 620 nm, de cor característica azul, é atribuída à presença de ficocianina (b), incluída na categoria das ficobiliproteínas.

Para avaliar a capacidade de lise das células de *Spirulina* por irradiação de ultrassom foram medidas as absorbâncias de amostras dos extratos EB e EC em diferentes tempos de exposição (PESSOA JÚNIOR & KILIKIAN, 2005). A leitura das amostras em 800 nm (Figura 6) visou o acompanhamento da variação do tamanho de partícula dos fragmentos de parede celular através do espalhamento de luz, o qual mostrou um perfil ligeiramente ascendente até o tempo de exposição de 3 minutos, alcançando um patamar estável nos minutos seguintes. Pode-se inferir que a partir de 3 minutos a radiação ultrassônica, através do fenômeno de cavitação acústica, não é capaz de fragmentar em pedaços menores a parede celular da *Spirulina*.

Como já fora comentado, a leitura da absorbância em 280 nm teve como objetivo acompanhar a liberação de proteínas no meio de lise com o rompimento celular. As ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas são as principais responsáveis pela absorção da luz neste intervalo. A Figura 6 mostra um perfil ascendente até o tempo de 6,5 minutos, ou seja, após a estabilização do perfil de espalhamento de luz a 800 nm. Tal comportamento pode ser devido a uma lise tardia de algumas células já sensibilizadas pelo ultrassom. Nota-se também a absorbância considerável observada no tempo zero, antes da aplicação da radiação o que indica a presença de células que podem ter sido rompidas no processo de maceração ou secagem da biomassa da microalga. Portanto, para o processo de lise de *Spirulina* e obtenção do extrato o tempo de 6 minutos sob radiação de ultrassom foi considerado adequado para obtenção de uma quantidade razoável de conteúdo proteico liberado.

Figura 6 - Leituras do espectrofotômetro em 280 nm e 800 nm para amostras de Spirulina na diluição 1:100 em tampão fosfato ($50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH=6,0) em função do tempo de exposição das amostras a radiação ultrassônica (130 W/cm^2).

4.3. Caracterização do extrato aquoso de Spirulina

4.3.1. Potencial ζ , distribuição e tamanho de partículas.

Os gráficos de distribuição de partículas dos extratos por intensidade (Figura 7) mostram duas populações com tamanhos distintos: uma com tamanhos entre 298 nm e 415 nm e outra com tamanhos entre 4247 nm e 5560 nm (Tabela 4). As populações com tamanhos menores foram atribuídas ao conteúdo proteico do extrato, já as com os maiores tamanhos foram atribuídas a complexos proteicos maiores associados aos fragmentos de parede celular da cianobactéria. Nota-se que os tamanhos médios da população menor são estatisticamente semelhantes em pH 6 e pH 8 para um mesmo tipo de extrato. Em pH 6 não há diferença estatisticamente significativa entre os tipos de extrato EB e EC (ANOVA, $p = 0.148$). Em pH 8 os tamanhos médios de EC e EB são estatisticamente diferentes (ANOVA, $p = 0.03$). Os valores de potencial- ζ não variaram significativamente com o tipo de extrato ou pH; o valor médio ficou em $-(19 \pm 2) \text{ mV}$.

Figura 7-Distribuição por intensidade do tamanho de partículas dos extratos aquosos de Spirulina preparados em tampão fosfato 0,05 mol. L⁻¹. EC8 e EC6 referem-se aos extratos centrifugados em pH = 8 e 6, respectivamente. EB8 e EB6 referem-se aos extratos brutos em pH = 8 e 6, respectivamente.

Tabela 1. Dados de tamanho médio de partícula e potencial- ζ médio dos extratos em Intensidade

Caracterização dos extratos					
Amostra	População	Tamanho de partícula (nm)	Potencial - ζ (mV)	% em área	PDI
EB6	1	331 $\pm$ 64	-(20 $\pm$ 2)	83,5%	1
	2	5560 $\pm$ 854		16,5%	
EB8	3	415 $\pm$ 227	-(19 $\pm$ 1)	60,8%	0,83
	4	4394 $\pm$ 939		37,9%	
EC6	5	319 $\pm$ 156	-(17 $\pm$ 2)	74,5%	0,24
	6	4434 $\pm$ 64		25,5%	
EC8	7	298 $\pm$ 165	-(16 $\pm$ 2)	81,4%	0,40
	8	4247 $\pm$ 998		18,6%	

Quando se utiliza a análise de tamanho de partícula através da distribuição numérica (Tabela 5) ao invés da distribuição por intensidade (Tabela 4), nota-se que as partículas maiores, observadas na distribuição por intensidade desaparecem. Isto ocorre, pois, as partículas maiores, mesmo não sendo numericamente abundantes, acabam contribuindo grandemente para a intensidade, mascarando a participação das partículas menores. Consequentemente, para as análises de distribuição de tamanho de partículas, usaremos os resultados da distribuição em número, por serem mais representativos, de acordo com a Tabela 5.

Os valores de potencial- ζ encontrados são negativos e não sofrem influência significativa em módulo, seja pelo pH ou após processo de centrifugação. A aplicação de US em pH 6 e pH 8, é esperada a lise da célula, fragmentação da parede celular e membrana e consequente liberação de complexo de multiproteínas e material genético como DNA. O potencial- ζ negativo pode ser proveniente tanto dos grupos fosfato (da parede celular, fosfolipídeos e DNA) como das ficobiliproteínas. Trabalhos anteriores que estudaram apenas o isolado proteico da *Spirulina* encontraram o valor de pI3 para o ponto isoelétrico (BENELHADI ET AL, 2016), reforçando o grande potencial de cargas líquidas negativas provenientes de grupos laterais dos aminoácidos destes complexos proteicos.

Figura 8-Distribuição numérica do tamanho de partículas dos extratos aquosos de *Spirulina* preparados em tampão fosfato 0,05 mol. L⁻¹. EC8 e EC6 referem-se aos extratos centrifugados em pH = 8 e 6, respectivamente. EB8 e EB6 referem-se aos extratos brutos em pH=8 e 6, respectivamente.

Tabela 2. Dados de tamanho médio de partícula e potencial- ζ médio dos extratos em número

Caracterização dos extratos					
Amostra	População	Tamanho de partícula (nm)	Potencial - ζ (mV)	% em área	PDI
EB6	9	306±68	-(20 ± 2)	100%	1
EB8	10	198±107	-(19 ± 1)	100%	0,83
EC6	11	148±73	-(17 ± 2)	100%	0,24
EC8	12	108±52	-(16 ± 2)	100%	0,40

4.3.2. Medidas da tensão superficial e interfacial

Segundo os dados da Tabela 6, a comparação entre o método do Anel de Du Nouy e da Placa de Wilhelm mostra valores de tensão superficial líquido/ar bastante semelhantes e próximos a faixa de $(37,7 \pm 0,3) 10^{-3} \text{ N/m}$ a $(41,20 \pm 0,01) 10^{-3} \text{ N/m}$, como mostra a Tabela 6. Os valores de tensão interfacial entre os extratos e a fase óleo (óleo de girassol comercial) mostraram valores bastante similares também oscilando entre $(10,4 \pm 0,8)$ e $(12,6 \pm 0,1) 10^{-3} \text{ N/m}$. Em comparação com os valores de tensão interfacial sem nenhum tensoativo (branco), estes valores mostram que EB e EC são eficientes na redução da tensão interfacial A/O, pois reduziu de $(19,7 \pm 0,4) 10^{-3} \text{ N/m}$ para $\sim 11 \times 10^{-3} \text{ N/m}$. Usou-se com comparação uma solução de tensoativo Tween 20 (T20) na concentração de $0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$, valor acima da sua concentração micelar crítica, que é $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ¹². Os valores de tensão superficial líquido-ar determinados para T20 foram comparáveis com aqueles determinados para EB e EC. Já os valores de tensão interfacial O/A com T20 foram aproximadamente a metade dos valores médios obtidos com EC ou EB, mostrando que os extratos têm empacotamento e/ou orientação diferente dos de tensoativos. Observa-se que apesar das diferentes condições de preparo dos extratos (com ou sem a centrifugação) ou pH existem reduções consideráveis de tensão superficial, evidenciando a presença de fosfolipídeos, proteínas e outros agentes surfactantes nos extratos de Spirulina.

Tabela 6-Comparação das medidas de tensão Superficial e Interfacial a $(20,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ determinadas pelos métodos do Anel de Du Nouy e Placa de Wilhelm para as amostras de EB e EC. Branco consistiu na solução de tampão fosfato ($50 \times 10^{-3} \text{ M}$) na presença de Merthiolate®.

	Tensão Superficial		Tensão Interfacial	
	(10^{-3} N/m)		(10^{-3} N/m)	
Amostras	Anel	Placa	Anel	Placa
Branco	$71,0 \pm 0,1$	$71,3 \pm 0,2$	$22,8 \pm 0,8$	$19,7 \pm 0,4$
EB6	$37,7 \pm 0,3$	$39,4 \pm 0,7$	$12,0 \pm 0,1$	$10,4 \pm 0,8$
EC6	$41,2 \pm 0,1$	$39,7 \pm 0,8$	$12,6 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,1$
T20	$37,8 \pm 0,1$	$37,2 \pm 0,6$	-----	$5,5 \pm 0,2$
EB6+K4M (1%)	$41,1 \pm 0,1$	$40,3 \pm 0,3$	$15,8 \pm 0,1$	$13,5 \pm 0,1$
EB6+311(1%)	$40,4 \pm 0,5$	$39,5 \pm 0,2$	$15,3 \pm 0,1$	$13,2 \pm 0,6$

Apesar de as duas técnicas apresentarem resultados semelhantes para uma mesma amostra analisada, o tempo de medida era muito menor para o método da placa, não excedendo 10 segundos, enquanto o método do anel era mais demorado (7 minutos em média). A precisão do método do anel pode ser considerada maior que a da placa tendo em vista seus valores de desvio padrão menores. Entretanto, foi notável a maior sensibilidade do método da placa principalmente para a medida de tensão interfacial da solução de T20, a qual não pode ser obtida pelo método do anel por causa do rompimento precoce da lamela.

Em relação às associações com HPMC, para os polímeros 311 e K4M na concentração em massa de 1% nos extratos, a Figura 9 mostra um ligeiro aumento na tensão superficial e interfacial em ambos os casos, indicando que os mesmos não possuem contribuição para a estabilidade coloidal das emulsões sob este aspecto, agindo predominantemente como modificadores reológicos. Dados de medida de SFT e realizados apenas com o método do anel para soluções de 311 e K4M a 1% (m/m) em tampão de pH=6, não mostrados na Tabela 6, foram de $(40,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \text{N/m}$ e $(47,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-3} \text{N/m}$ corroborando com a hipótese de que, apesar de ambos possuírem efeitos na tensão superficial, a associação do extrato e dos polímeros de HPMC não trazem um efeito conjunto vantajoso na diminuição de tensão interfacial.

Figura 9-Valores de tensão (A) superficial e (B) interfacial determinado pelos métodos da placa de Wilhelm e anel de Du Nouy para o Branco, EB, EC, T20 e associações de EB6 com 311 e K4M.

4.3.3. Imagens da microscopia confocal dos extratos

Na Figura 10 à esquerda, é possível perceber a estrutura helicoidal típica do gênero *Arthospira* (VONSAKI & TOMASELLI, 2000) antes do processo de sonicação. À sua direita, após a aplicação de US, não se observa mais a forma helicoidal, mas sim, os fragmentos de tricomas cujas dimensões variam de 3 μm a 15 μm .

A presença de pigmentos ligados ao processo de fotossíntese de cianobactérias como clorofila a e ficobilinas que apresentam fluorescência inerente com excitação em 543 nm e 633

nm e emissão na faixa de 590-800 nm possibilita a observação sem necessidade de corantes (MARINÉ ET AL, 2004).

Figura 10-Imagens de microscopia confocal antes e depois do tratamento de US. A figura à esquerda representa uma célula de *Spirulina platensis* dispersa em tampão de fosfato 50 mM em pH=6 no estado pré-tratamento de US e a figura à direita representa um estado de pós-tratamento com US.

4.4. Caracterização das emulsões na ausência e presença de HPMC

4.4.1. Distribuição de tamanho de partículas e potencial ζ

Os dados de distribuição de tamanho de partículas apresentam poucas diferenças entre as distribuições por intensidade e por número, diferentemente da análise dos extratos nas Figuras 7 e 8. A maioria das populações da Figura 11 são praticamente monomodais com tamanhos de gotículas médio que variam de 940 nm a 300 nm na distribuição por intensidade (Tabela 7), enquanto que na distribuição por números (Figura 12), os tamanhos variam de 822 nm a 213 nm aproximadamente (Tabela 8). De acordo com os dados de distribuição numérica da Tabela 8, os pares de emulsões EEB6 e EEB8 ($p = 0,134$) e as emulsões EEC6 e EEC8 ($p = 0,674$) não são estatisticamente diferentes entre si em relação à distribuição de tamanho, porém, ao comparar as populações de emulsões preparadas com EB e EC, sendo os pares EEB6 e EEC6 ($p = 0,000423$) e EEB8 e EEC8 ($p = 0,000783$) temos que as emulsões preparadas com extrato bruto apresentam populações com partículas maiores. Em outras palavras, as gotículas das emulsões preparadas com os EB tendem a ser ligeiramente maiores que as preparadas com o extrato centrifugado enquanto que as preparadas com tampão de pH=6 tendem a apresentar tamanhos estatisticamente semelhantes que as preparadas em tampão pH=8. O aumento no tamanho médio das gotículas nos extratos preparados com EB se comparados

com EC pode ser atribuído à adsorção de fragmentos de fosfolipídeos associados às proteínas na interface água-óleo das gotículas.

A comparação entre tamanhos das populações das gotículas de óleo nas emulsões EEB6 e EEB6 (60%), sendo a primeira, preparada com 10% v/v de óleo e a segunda preparada com 60% v/v de óleo indica que não existe diferença estatística entre as duas populações ($p = 0,23$). O aumento da carga de óleo na emulsão apenas proporcionou o aumento da concentração das gotículas e não um aumento do volume, diferente do que se imaginaria com as imagens de microscopia confocal da Figura 20C com a presença de gotículas maiores. Atribui-se a presença de gotículas maiores na imagem de microscopia à coalescência das mesmas devido à pressão sofrida pela amostra ao ser comprimida pela placa de vidro. É necessário também comentar que tentou-se preparar emulsões com maiores porcentagens de óleo, sendo 60% v/v o limite máximo no qual foi possível preparar uma emulsão sem haver separação de fases imediata.

Informações obtidas interessantes da Tabela 7 seriam os tamanhos das populações 16 e 19, as quais provavelmente representam agregados proteicos livres e não as gotículas de fase óleo, estes últimos presentes em quantidades muito inferiores e representados pelas populações 15 e 18 respectivamente.

De acordo com os valores de potencial- ζ (Tabelas 7 e 8), os quais não são alterados pela distribuição em intensidade ou numérica, apresentam potenciais que variam de -25 mV a -28 mV, aproximadamente para as emulsões preparadas com os extratos em pH=6 enquanto que as preparadas com pH=8 variam de -16 mV a -17 mV, aproximadamente. Um potencial- ζ negativo indicaria a presença de estruturas proteicas ou fosfolipídicas carregadas negativamente na superfície das gotículas como já discutido anteriormente na caracterização dos extratos. Potenciais- ζ negativos podem ser utilizados para prever a estabilidade coloidal de uma emulsão através de repulsão eletrostática, sendo valores de módulo 30 mV ou acima considerados efetivos para este tipo de estabilização (HUNTER, 2013).

Figura 11-Distribuição em intensidade do tamanho de partícula das emulsões O/A preparadas em diferentes pH e condições do extrato. EEB6 e EEB8 referem-se às emulsões O/A preparadas com extrato bruto de Spirulina no pH 6 e 8, respectivamente. EEC6 e EEC8 referem-se às emulsões preparadas com o extrato centrifugado de Spirulina em pH 6 e 8 respectivamente.

Figura 12-Distribuição numérica do tamanho de partícula das emulsões O/A preparadas em diferentes pH e condições do extrato. EEB6 (10%) e EEB8 (10%) referem-se às emulsões preparadas com extrato bruto de Spirulina no pH 6 e 8, respectivamente. EEC6 (10%) e EEC8 (10%) referem-se às emulsões preparadas com o extrato centrifugado de Spirulina e pH 6 e 8 respectivamente.

Tabela 7- Dados de tamanho de partículas e potencial- ζ para as emulsões O/A preparadas no mesmo dia em distribuição por Intensidade.

Emulsão	População	Tamanho de partícula médio (nm)	Potencial - ζ (mV)	% em área	PDI
EEB6 (10%)	13	939 $\pm$ 155	-(27 $\pm$ 4)	100%	0,24
EEB8 (10%)	14	646 $\pm$ 95	-(16 $\pm$ 2)	100%	0,39
EEC6 (10%)	15	409 $\pm$ 160	-(25 $\pm$ 7)	96,5%	0,25
	16	98 $\pm$ 16		2,3%	
	17	5374 $\pm$ 326		1,2%	
EEC8 (10%)	18	299 $\pm$ 99	-(17 $\pm$ 3)	95,9%	0,45
	19	71 $\pm$ 12		4,1%	
EEB6 (10%)+311(1%)	20	973 $\pm$ 143	-(2,3 $\pm$ 0,3)	100%	0,70
E311(1%)	21	1188 $\pm$ 168	-(1,0 $\pm$ 0,2)	100%	0,12
EEB6 (10%)+K4M(1%)	22	1318 $\pm$ 207	-(12 $\pm$ 4)	100%	0,40
EK4M(1%)	23	1561 $\pm$ 327	-(1,1 $\pm$ 0,5)	100%	0,15
EEB6(60%)	34	1087 $\pm$ 192	-(28 $\pm$ 3)	100%	0,48

Tabela 8 - Dados de tamanho de partículas e potencial- ζ para as emulsões O/A preparadas no mesmo dia em distribuição por números

Emulsão	População	Tamanho de partícula (nm)	Potencial $-\zeta$ (mV)	% em área	PDI
EEB6 (10%)	24	791 $\pm$ 34	-(27 $\pm$ 4)	100%	0,24
EEB8 (10%)	25	699 $\pm$ 52	-(16 $\pm$ 2)	100%	0,39
EEC6 (10%)	26	87 $\pm$ 21	-(25 $\pm$ 7)	84,6%	0,25
	27	193 $\pm$ 65		15,4%	
EEC8 (10%)	28	62 $\pm$ 12	-(17 $\pm$ 3)	96,2%	0,45
	29	173 $\pm$ 52		3,8%	
EEB6(10%)+311(1%)	30	1637 $\pm$ 366	-(2,3 $\pm$ 0,3)	100%	0,70
E311(1%)	31	1560 $\pm$ 159	-(1,0 $\pm$ 0,2)	100%	0,12
EEB6(10%)+K4M(1%)	32	1762 $\pm$ 53	-(12 $\pm$ 4)	100%	0,40
EK4M(1%)	33	1744 $\pm$ 250	-(1,1 $\pm$ 0,5)	100%	0,15
EEB6(60%)	34	959 $\pm$ 144	-(28 $\pm$ 3)	100%	0,48

4.4.2. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões através de perfis de transmitância integrado

Para comparar a estabilidade das emulsões pelo Lumireader, analisam-se as variações da luz transmitida integradas pelo comprimento do tubo de amostra ao longo do tempo de medida. Maiores variações, correspondem à uma maior instabilidade do sistema. Considera-se uma técnica de caráter exploratório, porém razoavelmente confiável para comparar a estabilidade de diferentes sistemas.

A análise comparativa da estabilidade das emulsões O/A preparadas com os diferentes extratos observados na Figura 13 mostra que as emulsões com melhores estabilidades são as preparadas com o extrato bruto de modo que a presença de fragmentos de parede celular contribui para melhorar a estabilidade das emulsões O/A. O pH aparentemente tem pouco efeito nas propriedades emulsionantes dos extratos na presença de um extrato EB.

A grande instabilidade relativa da EEC8 pode ser entendida como uma redução da carga líquida das proteínas, desfavorecendo a sua estabilização via repulsão eletrostática, a qual permaneceria favorável em uma emulsão preparada com um meio de pH =6.

Considerando que o extrato de Spirulina EB6 apresentou o melhor resultado de estabilização coloidal dentre os testados no item anterior, este foi escolhido para preparar novas emulsões em combinação com derivados de celulose de grau alimentício (HPMC) em diferentes concentrações. A associação com HPMC visa à melhoria da estabilidade das emulsões com o aumento da viscosidade do meio de modo a diminuir a frequência de colisões entre as gotículas de óleo dispersas em água estabilizadas pelas proteínas da Spirulina.

O registro fotográfico após as medidas de transmitância na Figura 14 ressalta as diferenças visuais entre as emulsões preparadas com o extrato bruto que tem aspecto esverdeado devido à forte presença de clorofila a qual fica retida na estrutura celular externa que é separada na centrifugação. As emulsões preparadas com o extrato centrifugado basicamente têm aspecto azulado em razão dos pigmentos hidrofílicos ligados também ao processo de fotossíntese chamados de ficocianinas. O efeito do pH aparentemente consegue influenciar na intensidade da coloração verde ou azulada. (ANDRÉS-BELLO, 2013)

Figura 13-Perfil de transmitância integrado coletados no Lumireader®416-1 das emulsões O/A preparadas com EB6, EC6, EB8 e EC8.

Figura 14-Imagens das emulsões EEB6 (10%), EEB8 (10%), EEC6 (10%) e EEC8 (10%) obtidas imediatamente após preparo.

4.5. Efeito da variação da concentração do extrato EB6 na estabilidade relativa das emulsões

Os resultados de perfil de transmitância das curvas integradas mostram uma diferença clara entre utilizar uma concentração de 0,5% e 1,0% de extrato EB6, sendo o primeiro bem mais instável o que indica uma insuficiência de proteínas ou fosfolípídeos para recobrir toda a interface entre a fase dispersa e a fase contínua (Figura 15) e mostrando que concentrações iguais ou acima de 1,0% do extrato podem ser mais adequadas para o preparo das emulsões.

Figura 15-Efeito da variação da concentração do extrato EB6 na estabilidade relativa das emulsões preparadas com EB6 com 10% v/v de óleo. A, B e C são Imagens registradas 45 minutos após a análise de perfil de transmitância de emulsões preparadas com 0,5%, 1,0% e 2,0% de extrato EB6, respectivamente. D representa uma comparação entre estabilidades relativas de emulsões com as três concentrações.

O mesmo experimento para uma emulsão com 60% v/v em fase óleo mostra uma variação quase imperceptível da separação de fases ao final da medida (Figuras 16D-G). A Figura 16D indica ao final de 43 minutos do teste que há uma pequena separação de fases no fundo do tubo. O aumento de viscosidade causado pelo aumento de volume da fase dispersa pode ser o responsável pela melhora aparente na estabilidade com apenas 0,5% de extrato EB6.

Figura 16-Efeito da variação da concentração do extrato EB6 na estabilidade relativa das emulsões preparadas com EB6 com 60% v/v de óleo. D, E e F são imagens registradas 45 minutos após a análise de perfil de transmitância de emulsões preparadas com 0,5%, 1,0% e 2,0% de extrato EB6, respectivamente. G representa uma comparação entre estabilidades relativas de emulsões com as três concentrações.

4.6. Avaliação das estabilidades relativas das emulsões com HPMC através de perfis de transmitância

Os polímeros HPMC utilizados para a estabilização das emulsões diferem-se quanto ao grau de substituição (DS) e a substituição molar (MS). DS refere-se ao número médio de grupos substituintes metila(-CH₃) unidos aos grupos anidro glicosídicos da celulose. Um maior grau de substituição está relacionado à maior presença destes grupos apolares. A substituição molar, MS, diz refere-se ao número de moles do grupo hidroxipropóxi (-OCH₂CH(OH)CH₃) por mol de anidroglicose. Este grupo substituinte contém uma hidroxila secundária e está relacionado à maior presença de grupos polares. A Figura 17 representa os valores de DS e MS das diferentes HPMC utilizadas.

	K4M	E4M	J5MS	311
DS	1,5	1,9	1,5	2,1
MS	0,25	0,25	0,75	0,9

Figura 17-Esquemática gráfica dos valores de DS e MS das HPMC utilizadas nas emulsões.(MARANI, 2015).

A Figura 18 mostra que as combinações de EB6 com os polímeros de tipo E4M e J5MS tiveram os piores desempenhos se comparados com os tipos K4M e 311. A concentração polimérica de 1 % m/m de K4M e 311 levou aos melhores resultados de estabilidade coloidal. De modo a comparar o desempenho dos extratos EB6 e EB8 frente à combinação com HPMC, compararam-se as curvas de perfil de transmissão das suas associações com 311 e K4M na concentração de 1% e descobriu-se uma maior instabilidade das emulsões com EB8 para ambas as combinações.

Figura 18-Perfis de transmitância das emulsões O/A com 10% de óleo, preparadas com associação do extrato EB6 ou EB8 com diferentes tipos de HPMC. A, B, C e D referem-se à associação de EB6 com E4M, K4M, J5MS e 311, respectivamente, nas concentrações m/m 0,3%, 0,5% e 1%. E refere-se à comparação da combinação de EB8 e EB6 com os derivados de celulose na concentração de 1% em massa.

A Figura 19 apresenta a comparação entre perfis de transmitância para a avaliação da estabilidade relativa das emulsões O/A (10% v/v óleo) com e sem HPMC K4M e 311. Não é possível observar mudanças significativas para as emulsões com o extrato, com a associação extrato e HPMC ou mesmo uma emulsão preparada apenas com HPMC, pois todas se mostraram muito estáveis dentro do período de 43 minutos das medidas. Torna-se necessário, portanto, analisar a estabilidade das amostras em períodos de tempo maiores, justificando as medições dos perfis de transmitância ao longo de seis semanas (dados apresentados na seção 4.8).

Figura 19 - Comparação dos perfis de transmitância das emulsões O/A (10% v/v óleo) com e sem HPMC. O perfil da esquerda compara a estabilidade de uma emulsão preparada apenas com o EB6, a associação de EB6 e 311 e uma emulsão preparada apenas com 311. O perfil da direita faz a mesma comparação com o polímero K4M.

4.7. Imagens da microscopia confocal das emulsões associadas ou não com HPMC

O preparo das emulsões EEB6 (60%) visava o estudo de uma emulsão preparada com um volume máximo de fase óleo para a verificação de possível inversão de fase tornando uma emulsão O/A em uma emulsão A/O. Emulsões com volume de fase óleo maior que 60% originaram emulsões que apresentaram separação de fase imediatamente ao preparo. De acordo com a Figura 20 C, temos que as emulsões EEB6 (60%) continuam a ser O/A, devido à alta característica hidrofílica das proteínas e fosfolipídeos, assemelhando tais agentes estabilizantes a um valor de HLB alto, sendo impróprio para emulsões inversas.

Ao observar as emulsões (Figura 20), identificam-se as gotículas aparentemente esféricas da fase interna de óleo de girassol. A emulsão com 10% v/v de óleo (Figura 20 A) apresenta gotículas de óleo (marcadas em vermelho) com tamanhos variados. A emulsão com 60% de fase óleo (Figura 20 C) apresenta gotículas de óleo com tamanho notavelmente maior que as gotículas de óleo da emulsão com 10% v/v de óleo. As Figuras 20 B e 20 D representam emulsões contendo as associações de EEB6 (10%) com 311 e K4M, respectivamente; em comparação com a emulsão com 10% v/v de óleo (Figura 20 A), elas apresentam uma maior uniformidade de tamanho de gotículas e as gotículas aparentemente são menores. No caso das emulsões preparadas com a associação EEB6 e 311 as gotículas pareceram estar associadas, formando grandes domínios em vermelho (Figura 20 B).

Figura 19-Imagens de microscopia confocal das emulsões preparadas com o extrato bruto de Spirulina. A) Emulsão preparada com EB6 com 10% de óleo v/v; B) Emulsão preparada com EB6 na presença de 1% de polímero HPMC 311 com 10% de óleo; C) Emulsão preparada com EB6 na presença de 60% fase óleo; D) Emulsão preparada com EB6 na presença de 1% de polímero HPMC K4M com 10% de óleo.

4.8. Caracterização das emulsões associadas com HPMC por potencial- ζ e distribuição de tamanho de partículas

As emulsões preparadas com associação de extrato com HPMC foram comparadas frente à distribuição de tamanho de partícula e potencial- ζ como pode ser observado na Figura 21 e 22 e nas Tabelas 7 e 8. Nota-se em todas as análises distribuições monomodais, isto é, uma distribuição mais homogênea de tamanho de partículas. Novamente, pode-se observar a clara diferença entre uma distribuição numérica (Figura 22 e Tabela 8) e uma distribuição por intensidade (Figura 21 e Tabela 7) com tamanhos maiores para as distribuições por intensidade que levam em consideração a contribuição por espalhamento de luz de partículas maiores.

Comparando as distribuições em número das emulsões preparadas com associação de EB6 e HPMC (picos 30 e 32) e uma preparada apenas com o extrato (pico 24), podemos afirmar que as gotículas das associações são maiores do que as gotículas não-associadas (sendo $p < 0,05$ para os pares EEB6 (10%) e EEB6 (10%)+K4M (1%) e EEB6 (10%) e EEB6 (10%)+311 (1%)). Isso pode ser entendido como um aumento de tamanho diante da presença de um invólucro nas partículas de óleo formado por moléculas de HPMC e proteínas da Spirulina ou a uma perda de eficiência em diminuir a tensão interfacial da mistura entre o extrato e polímero como observado nos estudos anteriores de tensão interfacial. As populações das associações não são estatisticamente diferentes entre si, sendo $p > 0,05$ para EEB6 K4M e EEB6 311. Isso indica falta de preferência de um ou outro polímero para se orientar ao redor das gotículas. O aumento de tamanho médio observado pode ser resultado de processos de agregação como envelhecimento de Ostwald ou coalescência. Ambos são mecanismos conhecidos de instabilidade coloidal e tendem a aumentar o tamanho das gotículas.

Pode-se atribuir o aumento do tamanho médio das gotículas das emulsões preparadas com associação de EB6 e HPMC à formação de complexos entre proteínas e o polímero. Emulsões geralmente são estabilizadas por diferentes emulsificantes presentes no sistema como surfactantes, proteínas ou hidrocoloides. Estes últimos, podendo ser complexos entre proteínas e polissacarídeos, são de grande interesse em formulações de aplicação alimentícia por aumentarem a estabilidade de emulsões, e consequentemente, seu tempo de prateleira. Pode-se atribuir, de maneira geral, a espessura da camada protetora dos emulsificantes ao redor das gotículas em ordem crescente como surfactantes < proteínas < polímeros solúveis em água < partículas sólidas (Dickinson, 2009).

Figura 20-Distribuição do tamanho de partículas de emulsões O/A com diferentes sistemas emulsionantes. A e B são emulsões preparadas com EB6 e associadas com 311 e K4M na mesma concentração das anteriores respectivamente. C e D são emulsões preparadas apenas com os polímeros 311 e K4M na concentração de 1% em massa.

Figura 21-Distribuição do tamanho de partículas de emulsões O/A com diferentes sistemas emulsionantes obtida por análise numérica. E e F são emulsões preparadas com EB6 e associadas com 311 e K4M na mesma concentração das anteriores respectivamente. G e H são emulsões preparadas apenas com os polímeros 311 e K4M na concentração de 1% em massa.

Os dados fornecidos pelas Tabelas 7 e 8 mostram que a presença do polímero blindou as cargas do extrato EB6, reduzindo drasticamente os valores de potencial- ζ . A combinação EB6 e K4M foi que provocou a menor redução no valor de potencial- ζ , talvez por interagir mais fracamente com os componentes do extrato bruto. Os valores de massa molar média numérica (M_n) e massa molar média ponderal (M_w) foram determinados por cromatografia de permeação em gel (GPC) (MARANI, 2015), como mostra a Tabela 9. As cadeias de 311 são aproximadamente 4 vezes maiores que as de K4M, causando efeitos viscosificantes maiores. O aumento da viscosidade na fase contínua retarda a coalescência das gotículas de óleo, favorecendo a estabilidade coloidal. Por outro lado, os valores relativamente baixos de DS e MS do polímero K4M parecem desfavorecer a associação com o extrato bruto, o que faz com que as cargas fiquem menos blindadas.

Tabela 9 - Massa molar média numérica (M_n), massa molar média ponderal (M_w), polidispersidade ($PD = M_w/M_n$) dos polímeros HPMC. (MARANI, 2015)

Polímero	M_n , g/mol	M_w , g/mol	PD
K4M	$9,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	2,25
E4M	$1,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	2,22
J5MS	$1,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	1,96
311	$4,1 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	1,62

4.9. Análise da estabilidade das emulsões com e sem HPMC durante seis semanas

As Figuras 23C, 23F, 23I e 23L apresentam os perfis de transmitância integrada de emulsões imediatamente após o preparo e após seis semanas de repouso em bancada no laboratório ($T = 24 \pm 1$) °C. Notam-se pequenos aumentos de transmitância. Porém, quando se combina a análise de estabilidade com os registros fotográficos (Figuras 23A, 23B, 23D, 23E, 23G, 23H, 23J e 23K) nota-se visualmente separação de fases após seis semanas. O perfil de transmitância integrado não consegue exibir tais desestabilizações por serem justamente uma integração das curvas de transmitância coletadas durante as medidas cuja variação acaba sendo muito sutil ao longo do tempo de medida (43 min). Sendo assim, fez-se necessário a análise das curvas em função da extensão do tubo (Figura 24).

Dentre as emulsões observadas na Figura 24, a mais estável ao longo de seis semanas a temperatura ambiente foi a emulsão EEB6 (10%) associada com o polímero 311. A integração da área sob as curvas com a evolução do tempo mostrou que a menor variação, ou seja, a maior estabilidade foi para a emulsão associada EB6 e 311. Essa maior estabilização é devida principalmente por ser a emulsão com fase contínua de maior viscosidade dentre as amostras (conforme apresentado no item seguinte), o que diminui consideravelmente o número de eventuais colisões e coalescência entre as gotículas. Além disso, uma possível complexação entre o polímero 311 e os componentes do EB6 (fragmentos de fosfolipídios, proteínas) na interface pode favorecer a estabilidade da emulsão por efeitos estéricos, retardando mecanismos como o envelhecimento de Ostwald. A emulsão contendo EEB6 e 311 foi a mais estável ao longo de períodos mais extensos e, por isso, seria a mais interessante para uma futura aplicação comercial.

Figura 23-Comparação entre a estabilidade das emulsões EEB6 (10%), EEB6 (60%), EEB6 (10%)+311 (1%) e EEB6(10%)+K4M (1%) por meio de registros fotográficos e perfil de transmitância ao final de seis semanas a 25°C. A, D, G e J referem-se à aparência inicial das emulsões após uma hora do preparo e B, E, H e K referem-se à aparência das emulsões após seis semanas à 25°C. C, F, I e L são os perfis de transmitância das curvas iniciais e após seis semanas.

Figura 24-Análise das curvas de transmitância ao longo do comprimento do tubo para um período de seis semanas. A) EEB6(10%); B)EEB6(60%); C)EEB6(10%)+311(1%); D)EEB6(10%)+K4M(1%). Abaixo, uma comparação das integrações das áreas dos gráficos de cada amostra ao longo das semanas.

Interações entre polímeros e proteínas são dirigidas por interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas (DE KRUIF et al, 2001). Analisando os

substituintes das HPMCs, temos que os grupos hidroxipropil contém hidroxilas capazes de realizar ligações de hidrogênio com as proteínas dos extratos de Spirulina. Considerando as condições de meio com pH=6 e os dados de potencial ζ das gotículas das emulsões E311 e EK4M serem de módulo próximo ao nulo (Tabela 8), podemos supor que interações eletrostáticas entre as cadeias de HPMC, que são neutras, e as proteínas de potencial- ζ negativo devem ser praticamente inexistentes. Entretanto, interações do tipo, dipolo-dipolo ou dipolo-dipolo induzido podem ser consideradas. O polímero 311, de acordo com a Tabela 9 e Figura 19, possui os maiores valores de massa molar média numérica ($4,1 \times 10^5$ g/mol) e valor de MS (0,90), respectivamente de modo que ele teria as maiores extensões de cadeias e maior quantidade de hidroxilas, favorecendo as maiores interações dipolo-dipolo com as proteínas e com a fase continua (aumentando a viscosidade do meio).

As associações com o polímero K4M ou 311 apresentaram melhores resultados de estabilidade relativa através dos perfis de transmitância integrada (Figura 18) do que aquelas com os polímeros E4M e J5MS. O resultado se mostra interessante pois, o K4M apresenta os menores valores de massa molar média numérica ($9,5 \times 10^4$ g/mol) e de MS (0,25) indicando que esta vantagem na estabilização das emulsões possa ser devido a interações hidrofóbicas ou interações dispersivas.

A Figura 25 ilustra as diferentes interações propostas nas diferentes emulsões com EB6 e HPMC. Na Figura 25a temos uma gotícula de óleo estabilizada pelos lipídeos (mais especificamente fosfolipídios da membrana celular) e proteínas da Spirulina e nas Figuras 25d e 25e temos as representações das associações com as HPMC, na qual a associação de EB6 com K4M formaria complexos mais fracamente ligados às proteínas e fosfolipídios do que as associações com 311.

Figura 25 – Representação esquemática das emulsões estabilizadas por (a) lipídeos e proteínas do EB6, (b) polímero K4M, (c) polímero 311, (d) complexos de K4M e proteínas e lipídeos de EB6, (e) complexos de 311 e proteínas e lipídeos de EB6.

4.10. Análise reológica

De acordo com a Figura 26, as emulsões e soluções de polímeros apresentam curvas de fluxo com comportamentos próximos a fluidos pseudoplásticos. No comportamento pseudoplástico, a tensão de cisalhamento para iniciar o fluxo é maior que a necessária para manter o fluxo, pois parte da energia da tensão inicial será desviada para a organização do meio, a qual pode acontecer na forma de orientação de partículas ou moléculas no sentido do fluxo; alongamento de gotículas ou moléculas dobradas; deformação de gotículas esféricas ou mesmo desagregação de agrupamentos de partículas e moléculas.

As curvas de viscosidade (Figura 27) foram ajustadas para o modelo empírico de lei das potências (BARNES, HUTTON & WALTERS, 1989) (Figura 28), que prediz a dependência linear do log da viscosidade com o log da taxa de cisalhamento:

$$\log \eta = \log K + (n - 1) \log \gamma \quad (2)$$

$$\text{ou } \eta = K \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad (3)$$

Onde K (Pa.sn) é o índice de consistência de fluxo, relacionado com a capacidade do material resistir à mudanças de formato e n é o índice de comportamento. Se $n = 1$, o fluido tem comportamento newtoniano, enquanto que $n < 1$ indica comportamento pseudoplástico.

O valor de n determinado para a emulsão EEB6 (10%)+311(1%) e a solução aquosa de 311(1%) foram de 0,41 e 0,59, respectivamente, enquanto que os valores de K foram de 12.6 Pa.s and 2.7 Pa.s, respectivamente. O comportamento pseudoplástico e a consistência foram mais pronunciados na mistura de EB6 e 311 do que na solução aquosa da HPMC 311, indicando interação favorável entre os componentes do extrato (fosfolipídeos e proteínas) e as cadeias do polímero 311.

Um trabalho de Petrovic e seus colegas, (PETROVIC, SOVILJ, KATONA & MILANOVIC, 2010) relata o comportamento de misturas entre HPMC na concentração de 1% m/m e dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante carregado negativamente, nos quais foram observados comportamento pseudoplástico ($0.81 < n < 0.48$) e tixotrópico na concentração de SDS entre 0,15% m/m a 1,0% m/m, causada pela formação de um complexo entre as cadeias de HPMC e as moléculas de SDS.

Figura 26-Curvas de fluxo a 25°C para as diferentes emulsões na presença e ausência de HPMC além de soluções com apenas os polímeros dispersos em água.

(a)

(b)

Figura 27- Curvas de viscosidade em escala (a) linear e (b) logarítmica, a 25°C para as diferentes emulsões na presença e ausência de HPMC além de soluções com apenas os polímeros dispersos em água.

(a)

(b)

Figura 28- Ajustes lineares para as curvas de fluxo (Figura 27b) determinadas para (a) EEB6 (10%)+311 (1%) e (b) solução aquosa de 311 (1%) utilizando o modelo empírico da lei das potências (Equação 2).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os extratos preparados com o intuito de utilizar a rica composição proteica da *Spirulina* mostraram poder de redução da tensão interfacial entre óleo e água. Particularmente os extratos brutos preparados em pH 6 (EB6) se mostraram como os mais eficientes para (i) reduzir a tensão superficial água/ar e interfacial água/óleo e (ii) manter emulsões O/A (10 v/v %) estáveis por tempos mais longos. Os valores de potencial- ζ sugerem que esses extratos (EB6) contém fragmentos da parede de membrana celular, como fosfolipídios, que favorecem a estabilização das emulsões por aumento de carga na interface. No caso das emulsões A/O (60 v/v%), os EB6 foram os únicos extratos que apresentaram efeitos emulsificantes satisfatórios.

Extratos brutos de *Spirulina*, por si só, são capazes de formar uma camada carregada negativamente sobre a fase dispersa devido à ação dos lipídeos e proteínas em sua composição. Entretanto, este filme interfacial provavelmente é muito fino, como proposto na Figura 25a, e não previne a coalescência das gotículas por período de tempo muito longo (mais que um mês). As cadeias de HPMC também foram capazes de adsorver nas gotículas de óleo, diminuindo sua tensão interfacial, porém, formando uma camada protetora fina e livre de cargas (Figuras 25b e 25c). A alta massa molar média da HPMC 311 em comparação com as outras HPMCs estudadas favoreceu o aumento da viscosidade do meio. Entretanto, somente este fator não foi suficiente para resultar em estabilidade de longo prazo.

A combinação dos diferentes tipos de HPMC com EB6 levou à formação emulsões mais estáveis do que aquelas preparadas somente com EB6. Particularmente, associações das emulsões com HPMC 311 e K4M promoverem as melhores estabilidades relativas a longo prazo. Provavelmente a complexação entre as cadeias poliméricas, as proteínas e lipídeos criam filmes interfaciais mais robustos e espessos, como proposto nas Figuras 25 d e 25e. O comportamento pseudoplástico mais acentuado de emulsões contendo EB6 e 311 frente à solução aquosa de HPMC 311, corrobora com esta hipótese de formação de complexos. Tais complexos além de estruturarem melhor a interface O/A causam aumento de viscosidade do meio contínuo; ambos efeitos corroboram para o aumento da estabilidade das emulsões.

O presente estudo mostra o importante papel da formação de complexos entre polímeros e proteínas e lipídeos na estabilidade de emulsões. Como futuros estudos, pode se explorar o papel de polissacarídeos carregados negativamente, como xantana, carboximetil celulose, ou positivamente, como quitosana quaternizada, na formação de complexos com extrato bruto de *Spirulina*, e seus efeitos emulsificantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, Shabana Kouser; SALEH, Arabi Mohammed. Spirulina-an overview. *Int J Pharm Pharm Sci*, v. 4, n. 3, p. 9-15, 2012.

ANDRADE, Michele da Rosa; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. *Ciência e agrotecnologia*, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

ANDRÉS-BELLO, A. et al. Effect of pH on color and texture of food products. *Food Engineering Reviews*, v. 5, n. 3, p. 158-170, 2013.

BARNES, Howard A.; HUTTON, John Fletcher; WALTERS, Kenneth. *An introduction to rheology*. Elsevier, 1989.

BENELHADJ, Sonda et al. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate. *Food chemistry*, v. 194, p. 1056-1063, 2016.

BOUSSIBA, Samy; RICHMOND, Amos E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, v. 120, n. 2, p. 155-159, 1979.

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

BURDOCK, George A. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 12, p. 2341-2351, 2007.

CAROLINE, D. Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering. *Journal of Modern Optics*, v. 31, n. 3, p. 276-277, 1984.

CHRONAKIS, Ioannis S. et al. The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 173, n. 1, p. 181-192, 2000.

CIFERRI, Orio. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological reviews*, v. 47, n. 4, p. 551, 1983.

CLAUSSE, D. et al. A method for the characterization of emulsions, thermogravimetry: Application to water-in-crude oil emulsion. *Journal of colloid and interface science*, v. 287, n. 2, p. 694-703, 2005.

DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgae, products and applications. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DEVI, M. Anusuya; VENKATARAMAN, L. V. Functional Properties of Protein Products of Mass Cultivated Blue-Green Alga *Spirulina Platensis*. *Journal of Food Science*, v. 49, n. 1, p. 24-27, 1984.

DICKINSON, Eric. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food hydrocolloids*, v. 23, n. 6, p. 1473-1482, 2009.

EVERETT, Douglas Hugh. Basic principles of colloid science. The Royal Society of Chemistry, 2009.

FORD, J. L. Particle Size Analysis in Pharmaceuticals and Other Industries. Theory and Practice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 45, n. 11, p. 1015-1015, 1993.

FUJISAWA, Takatomo et al. Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA research*, p. dsq004, 2010.

GAO, Kunshan; MA, Zengling. Photosynthesis and growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta) in response to solar UV radiation, with special reference to its minor variant. *Environmental and experimental botany*, v. 63, n. 1, p. 123-129, 2008.

GHOSH, Amit K.; BANDYOPADHYAY, Prasun. Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids. INTECH Open Access Publisher, 2012.

GREMINGER, G. et al. Hydroxypropyl methylcellulose ethers and method of preparation. U.S. Patent n. 3,839,319, 1 out. 1974.

HAMES, B.; SCARLATA, C.; SLUITER, A. Determination of protein content in biomass. National Renewable Energy Laboratory, p. 1-5, 2008.

HAYNES, Lynn C.; CHO, M. J. Mechanism of Nile red transfer from o/w emulsions as carriers for passive drug targeting to peritoneal macrophages in vitro. *International journal of pharmaceuticals*, v. 45, n. 1-2, p. 169-177, 1988.

HIEMENZ, Paul C.; RAJAGOPALAN, Raj (Ed.). Principles of Colloid and Surface Chemistry, revised and expanded. CRC press, 1997.

HUNTER, Robert J. Zeta potential in colloid science: principles and applications. Academic press, 2013.

DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. Food hydrocolloids, v. 15, n. 4, p. 555-563, 2001.

LEONG, Thomas; ASHOKKUMAR, Muthupandian; KENTISH, Sandra. The fundamentals of power ultrasound—a review. Acoust. Aust, v. 39, n. 2, p. 54-63, 2011.

MALVERN INSTRUMENTS, Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes Technical Note

MANRICH, Anny. Determinação da composição química da *Spirulina platensis*. ANAIS DO VIII WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, p. 116, 2014.

MARANI, P.L.. Título: Estudo da influência das características estruturais da Hidroxipropil-Metil-Celulose (HPMC) nas propriedades de superfície de filmes poliméricos, na incorporação e liberação de nicotina. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015

MARINÉ, M. Hernández; CLAVERO, E.; ROLDÁN, M. Microscopy methods applied to research on cyanobacteria. Limnetica, v. 23, n. 1-2, p. 179-186, 2004.

MARQUEZ, Facundo J. et al. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 62, n. 2, p. 159-164, 1995.

MATIJEVIC, Egon. Introduction to colloid surface chemistry (Shaw, Duncan J.). J. Chem. Educ, v. 45, n. 3, p. 212, 1968.

MCCLEMENTS, David Julian. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 47, n. 7, p. 611-649, 2007.

MCCLEMENTS, David Julian; GUMUS, Cansu Ekin. Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. Advances in colloid and interface science, 2016].

MORRIS, Edwin R. Rheological and organoleptic properties of food hydrocolloids. In: Food hydrocolloids. Springer US, 1994. p. 201-210.

NEUMANN, A. Wilhelm; DAVID, Robert; ZUO, Yi (Ed.). Applied surface thermodynamics. CRC press, 2010.

NIRMALA, C.; PRAKASH, V.; VENKATARAMAN, L. V. Physico-chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). Food/Nahrung, v. 36, n. 6, p. 569-577, 1992.

PECORA, Robert (Ed.). Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy. Springer Science & Business Media, 2013.

PETROVIC, Lidija B. et al. Influence of polymer–surfactant interactions on o/w emulsion properties and microcapsule formation. Journal of colloid and interface science, v. 342, n. 2, p. 333-339, 2010.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: Manole, 440 p., 2005.

RODRIGUES, E. L.; TOCHETTO, L. D. S.; FRANKEN, L.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. EMULSIFICATION ACTIVITY OF PHYCOCYANIN FROM MICROALGA *Spirulina platensis*. In: IUFoST – World Congress of Food Science and Technology, 16, 2012, Foz do Iguaçu. Anais..., Foz do Iguaçu, 2012.

RODRIGUES, E.F.; Vendrusculo, L.P.; COSTA, Jorge Alberto Vieira; COLLA, Luciane Maria. Emulsificantes microalgais aplicados em sorvete. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAIFERM, 2015, Fortaleza. Anais do XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAIFERM, 2015.

SHALABY, Emad A.; SHANAB, Sanaa MM; SINGH, Vikramjit. Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. Journal of Medicinal Plants Research, v. 4, n. 24, p. 2622-2632, 2010.

THE DOW CHEMICAL COMPANY. Methocel Cellulose Ethers: Technical Handbook. Disponível em<http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_004f/0901b8038004fa1b.pdf?filepath=methocel/pdfs/noreg/192-01062.pdf&fromPage=GetDoc> . Acesso em 27 maio 2016.

URSU, Alina-Violeta et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, v. 157, p. 134-139, 2014.

VONSHAK, Avigad (Ed.). *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press, 1997. 285 p.

VONSHAK, Avigad; TOMASELLI, Luisa. *Arthrospira (Spirulina): systematics and ecophysiology*. In: *The ecology of cyanobacteria*. Springer Netherlands, 2000. p. 505-522.

WALSTRA, Pieter. Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, v. 48, n. 2, p. 333-349, 1993.

WANG, Lili; DONG, Wei; XU, Yongshen. Synthesis and characterization of hydroxypropyl methylcellulose and ethyl acrylate graft copolymers. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 4, p. 626-636, 2007.

WHITEHURST, Robert J. (Ed.). *Emulsifiers in food technology*. John Wiley & Sons, 2008.

7. APÊNDICE

7.1. O fenômeno de cavitação acústica

Cavitação pode ser definida como a formação, crescimento e subsequente colapso implosivo de bolhas pré-existentes em um líquido. Tais bolhas oscilam em fase com a aplicação de onda sonoras, contraindo durante a compressão e expandindo durante a rarefação (Figura 29). O colapso das bolhas ocorre de maneira violenta podendo produzir intenso aquecimento local e altas pressões

O crescimento e colapso de bolhas induzido pelo ultrassom são acompanhados pela geração de ondas de choque, microcorrentes e microjatos os quais levam a um aumento da turbulência e forças de cisalhamento as quais podem ser utilizadas para induzir emulsificação de líquidos imiscíveis ao dispersar gotículas de um líquido em outro quando a cavitação ocorre na interface entre dois líquidos. (LEONG ET AL, 2011)

Figura 29 -Representação esquemática do crescimento das bolhas sob o fenômeno de cavitação acústica. Adaptado de LEONG ET AL, 2011.

7.2. Definição de potencial $-\zeta$

Potencial $-\zeta$ é uma propriedade física exibida por qualquer partícula em suspensão. Sua análise pode ser utilizada para otimizar formulações de suspensões e emulsões. O conhecimento acerca do potencial $-\zeta$ pode reduzir o tempo necessário para produzir

formulações de triagem além de ser um auxílio na predição de estabilidade em longo prazo. (EVERETT, 2009), (HUNTER, 2013).

O surgimento de cargas elétricas nas dispersões de coloidais em meios aquosos podem ser advindas de ionização de grupos de superfície (mudanças de pH do meio), adsorção de espécies carregadas (íons e surfactantes iônicos) ou perda diferencial de íons de uma camada cristalina.

Tais cargas elétricas na superfície das partículas afetam a distribuição dos íons na região interfacial da vizinhança, resultando em um aumento da concentração de contra íons (íons de carga oposta à da partícula) próximos da superfície. Surge, assim, uma dupla camada elétrica ao redor de cada partícula no meio. Esta dupla camada pode ser dividida em: camada de Stern, mais interna, onde os íons são mais fortemente ligados; e camada difusa, mais externa, onde os íons estão mais fracamente associados. Dentro desta camada difusa, existe uma região imaginária dentro da qual os íons e partículas formam uma entidade estável, isto é, quando a partícula se move (e.g. devido à gravidade), íons dentro desta região se movem também. Os íons que estão fora desta região permanecem na composição do dispersante.

O potencial elétrico nesta região de divisão, que chamaremos de plano hidrodinâmico de cisalhamento, é denominado potencial $-\zeta$. A magnitude do potencial $-\zeta$ fornece uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Na situação em que todas as partículas em suspensão possuem um grande potencial $-\zeta$ positivo ou negativo em módulo, elas tendem a se repelir umas às outras diminuindo as chances de coalescência. (HUNTER, 2013)

7.3. Determinação do potencial $-\zeta$

Partículas carregadas suspensas em um líquido, quando expostas a ação de um campo elétrico, tendem a se movimentar em direção ao eletrodo de carga elétrica oposta. Forças viscosas agindo nestas partículas são contrárias a este movimento. Quando estas duas forças opostas alcançam o equilíbrio, as partículas se movimentam com velocidade constante. Tal velocidade é dependente da força do campo elétrico, da constante dielétrica e viscosidade do meio e do potencial $-\zeta$.

A velocidade de uma partícula em uma unidade de campo elétrico é denominada mobilidade eletroforética. O potencial $-\zeta$ relaciona-se com a mobilidade eletroforética através da equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (4)$$

Na equação de Henry, U_E = mobilidade eletroforética, ζ =potencial- ζ , ε =constante dielétrica, η =viscosidade e $f(\kappa a)$ =função de Henry.

O equipamento utilizado nos experimentos usa uma combinação de espalhamento de luz com efeito Doppler para medir a mobilidade eletroforética. O sistema de medição do potencial- ζ é composto de sete componentes principais (Figura 30). O laser (1) providencia uma fonte de luz que iluminam as partículas dentro da amostra. Esta fonte de luz é dividida em um feixe incidente e um feixe de referência. O feixe incidente do laser passa pelo centro da célula de amostra (2) e o feixe de luz espalhada em um ângulo de aproximadamente 13° é detectado em (3). Quando um campo elétrico é aplicado na célula, quaisquer partículas que estiverem se movimentando pelo volume mensurado irão provocar uma variação da intensidade de luz detectada cuja frequência é proporcional à velocidade da partícula. Esta informação é direcionada para um processador de sinal digital (4) e então para um computador (5). O software do equipamento então calcula a mobilidade eletroforética e em seguida o potencial- ζ a partir de um espectro de frequência. O atenuador (6) ajusta a intensidade da luz que incide na amostra, modulando a intensidade da luz espalhada para que esta esteja dentro dos limites adequados de medição do detector. O compensador óptico (7) corrige quaisquer diferenças na espessura da parede e refração do dispersante, mantendo, assim, um alinhamento otimizado. (MALVERN INSTRUMENTS)

Figura 30-Configuração óptica do equipamento Zetasizer Nano ZS para medidas de potencial-ζ. Adaptado de MALVERN INSTRUMENTS.

7.4. Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico (“dynamic light scattering”, DLS) é uma técnica que relaciona o movimento Browniano com o tamanho de partículas suspensas em um líquido. O movimento Browniano pode ser definido como o movimento randômico de partículas em uma solução a partir de suas interações com as moléculas de solvente que as rodeiam. Quanto maior o tamanho da partícula, menor será o movimento Browniano. Partículas menores movimentam-se mais rapidamente, pois as colisões com as moléculas de solvente são relativamente mais intensas. A velocidade do movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão translacional, de símbolo D . (CAROLINE, 1984)

O tamanho hidrodinâmico (d_H) de uma partícula correlaciona-se com o coeficiente de difusão translacional (D) através da equação de Stokes-Einstein:

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

Onde k é a constante de Boltzmann, T é temperatura em Kelvin e η é a viscosidade do meio. A temperatura é um fator bastante relevante pois sua variação ou oscilação leva ao surgimento de correntes de convecção na amostra causando movimentos não-randômicos (ou não-

brownianos), além de afetar diretamente a viscosidade do líquido no qual as partículas estão suspensas. (PECORA, 2013; FORD, 1993).

7.5. Determinação do espalhamento de luz dinâmico

O arranjo instrumental da técnica de DLS consiste de seis componentes principais, como ilustrado na Figura 31. Um laser (1) incide sobre a amostra contida na célula em (2). Em amostras diluídas, boa parte deste feixe de laser passa através da amostra enquanto uma pequena parte é espalhada em todas as direções. Um detector (3) posicionado a 90° mede a intensidade da luz espalhada. O atenuador (4) tem a função de reduzir a intensidade da fonte de laser e consequentemente da luz espalhada caso esta esteja acima dos limites tolerados pelo detector. A intensidade de luz espalhada captada pelo detector é acumulada no autocorrelator (5), responsável por correlacionar a intensidade de luz espalhada durante sucessivos intervalos de tempo para determinar as flutuações de intensidade. As informações do autocorrelator são direcionadas para um computador (6), onde o software do equipamento analisa as funções de autocorrelação através de modelos matemáticos para obter informações de tamanho.

Figura 31-Configuração óptica do equipamento Zetasizer Nano ZS para medidas de espalhamento de luz dinâmico. Adaptado de MALVERN INSTRUMENTS.

7.6. Tensão superficial

Tensão superficial de um líquido pode ser definida como o trabalho necessário para aumentar a área de uma superfície em uma interface líquido-ar. É designado pelo símbolo sigma (σ) e possui a unidade de mN/m (força por comprimento). Em uma interação líquido-sólido, usa-se o termo energia superficial livre, enquanto para interações líquido-líquido, o termo utilizado é tensão superficial (líquido-ar) ou interfacial (líquido-líquido).

Há várias maneiras de se determinar a tensão superficial ou interfacial, como por exemplo, tensiometria, gota pendente, ascensão capilar e estalagmometria. (HIEMENZ, 1997)

Por tensiometria há o método da placa de Wilhelmy e o do anel de Du Nouy. O método do anel de du Nouy é o método mais comum para medidas de tensão superficial ou interfacial. Neste método, um anel é colocado em uma alça como mostrado na Figura 32. Aproxima-se a solução a ser analisada até o seu contato com o anel e, após uma pequena submersão deste no líquido, separam-se ambos lentamente (acarretando a formação de um filme de líquido que se chama comumente de lamela) e usa-se a força máxima ($F_{\text{máx}}$), que seria a quantidade máxima de forma utilizada para esticar este filme antes dele ser rompido; a força de empuxo do volume de líquido erguido F_E ; o perímetro do anel L com contato com o líquido e o ângulo de contato θ de acordo com a equação:

$$\sigma = \frac{F_{\text{máx}} - F_E}{L \cos \theta} \quad (4)$$

Figura 32-Representação do método do anel de du Nouy.

Durante o movimento de subida do anel para a realização da medida, a superfície analisada sofre perturbação, tornando dificultada a medida da tensão superficial em equilíbrio. Amostras de líquidos puros não apresentam este problema, porém, em soluções de surfactantes o método do anel não seria o mais adequado. Problemas como leves deformidades na geometria do anel são responsáveis pela não interação uniforme do anel com a superfície da amostra, sendo necessária uma correção matemática, muitas vezes executada pelo próprio software do equipamento.

A técnica da placa de Wilhelmy é considerada uma técnica precisa e relativamente fácil de aplicar (NEUMANN ET AL, 2010). O método padrão consiste em aproximar a amostra de líquido até que a mesma toque uma fina placa de platina de 1 cm x 2 cm, a qual está suspensa e conectada a um sensor de força, como ilustra a Figura 33. A força necessária para retirar ou inserir a placa no líquido é diretamente proporcional à tensão superficial do mesmo e ao ângulo de contato θ de acordo com a equação:

$$f = p\sigma\cos\theta - V\Delta\rho g \quad (5)$$

Onde p é o perímetro molhado da placa, σ é a tensão superficial líquido-ar, θ o ângulo de contato, V é volume do líquido deslocado, $\Delta\rho$ é a diferença de densidade entre o líquido e o ar (ou entre os dois líquidos) e g é a aceleração da gravidade. Escolhe-se a platina como material componente da placa (e do anel), por ser um material quimicamente inerte, não sofre oxidação sob exposição à chama, além de ser otimamente molhável devido à sua alta energia livre de superfície. Com a placa de Wilhelmy, forma-se o menisco sem a necessidade de movimento da placa acima da superfície da amostra, consequentemente, eliminando os efeitos de perturbação da situação de equilíbrio de superfície presente quando se usa o anel de Du Nouy.

Figura 33 - Representação do método da placa de Wilhelmy. Adaptado de <https://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/wilhelmy-plate-method/>. Acesso em 19/11/2016

7.7. Medida de estabilidade relativa através do STEP (Space and Time Resolved Extinction Profiles)

O Lumireader utiliza uma tecnologia chamada STEP (Space and Time Resolved Extinction Profiles) para avaliar a estabilidade relativa em um curto período na qual a amostra de coloide é colocada em um tubo de vidro transparente (Figura 34) cujo todo seu comprimento é irradiado por uma fonte de luz em múltiplos comprimentos de onda. Os sensores localizados paralelamente e atrás do tubo com a amostra coletam os comprimentos de onda transmitidos e o software consegue mediar a transmitância de luz ao longo do tubo.

Amostras de natureza coloidal, diferentemente de uma solução, apresentam ao longo do tempo mecanismos de instabilidade como sedimentação, envelhecimento de Ostwald, floculação e coalescência transformando a coleta de dados de transmitância ao longo do tempo em distintos perfis de transmitância. Conforme ocorrem estes mecanismos de desestabilização, ocorre uma variação de concentração nas partículas em relação ao comprimento do tubo, que é medida indiretamente pela chegada heterogênea dos raios luminosos ao detector. É possível integrar os valores de transmitância ao longo do comprimento do tubo e informar o quanto a transmissão variou ao longo do tempo do experimento. (Figura 35).

A tecnologia é indicada e utilizada principalmente na indústria como auxiliar no desenvolvimento e otimização de fórmulas além de controle de qualidade.

Figura 34-Illustração do tubo com amostra e localização da fonte luminosa e sensor no equipamento. O gráfico ilustra a variação de concentração de partículas do coloide para o mecanismo de desestabilização por sedimentação ao longo do tubo.

Figura 35- Ilustração de acúmulo de perfis de transmitância de uma amostra sob o mecanismo de sedimentação ao longo do tempo e integração dos perfis para a variação da transmitância ao longo do tempo do experimento.

8. CURRICULUM VITAE

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome: Robson Takeshi Shimada

Naturalidade: São Paulo – SP

Data de Nascimento: 25/08/1990

FORMAÇÃO

2009 –2013 - Universidade de São Paulo – São Paulo - SP

Bacharelado em Química com atribuições Tecnológicas

IDIOMAS

Inglês: Lê bem, escreve bem, ouve bem, fala bem. (TOEFL iBT = 96/120)

EXPERIÊNCIAS

2014-2015 – Natura -Pesquisador temporário-Setor de Inovação (Inova Talentos)

Desenvolvimento de diferentes tipos de formulações cosméticas (cremes para hidratação corporal, filtros solares, maquiagem, óleos e ceras, produtos para cabelos, sabonetes etc). Pesquisa de tecnologias e desenvolvimento de protótipos inovadores.

2013 – 2013: Clariant S/A -Estagiário de pesquisa e desenvolvimento

Laboratório Consumer Care, atuando no desenvolvimento e avaliação de performance de formulações para Industrial & Homecare e Personal Care.

CURSOS COMPLEMENTAR

- Entendendo Inovação aberta (Natura-2015)
- Liderança de equipes (ESPM-2016)
- Desenvolvimento de formulações de filtros solares (ABC-2014)
- Workshop de fragrâncias e aromas (Givaudan-2015)
- Fundamentos da análise sensorial (ABC-2014)

PUBLICAÇÃO

Robson T. Shimada, Matheus S. Fonseca, Denise F.S. Petri. The role of hydroxypropyl methylcellulose structural parameters on the stability of emulsions containing Spirulina biomass. Colloids and Surfaces A 529 (2017) 137–145

PREMIAÇÕES

- Primeiro lugar Hackathon (Edição Huggies) da Kimberly&Clark 2016 por melhor proposta de inovação em produto.
- Terceiro lugar na competição Dia do Empreendedor organizado pelo grupo Rotary em 2014.