



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013014574-9 B1



(22) Data do Depósito: 15/12/2011

(45) Data de Concessão: 15/10/2019

(54) Título: EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, USO DE UMA EMULSÃO ESTABILIZADA POR PARTÍCULA E FORMULAÇÃO

(51) Int.Cl.: A23D 7/005; A23L 27/00; A23L 33/115; A23P 10/30; A61K 47/26; (...).

(52) CPC: A23D 7/0053; A23L 27/72; A23L 33/115; A23P 10/30; A61K 47/26; (...).

(30) Prioridade Unionista: 15/12/2010 SE 1051328-1.

(73) Titular(es): SPEXIMO AB.

(72) Inventor(es): PETR DEJMEK; ANNA TIMGREN; MALIN SJÖÖ; MARILYN RAYNER.

(86) Pedido PCT: PCT SE2011051522 de 15/12/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/082065 de 21/06/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/06/2013

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a uma emulsão ou espuma estabilizada por partícula que compreende pelo menos duas fases e partículas sólidas, sendo que as ditas partículas sólidas são grânulos de amido e os ditos grânulos de amido, ou uma porção dos mesmos, estão situados na interface entre as duas fases que fornecem a emulsão ou espuma estabilizada por partícula. A invenção se refere-, ainda, ao uso da dita emulsão ou espuma estabilizada por partícula para encapsulação de substâncias escolhidas a partir de biofarmacêuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas e anticorpos, ingredientes alimentares sensíveis, vitaminas, e lipídeos em produtos alimentares, produtos cosméticos, cremes para a pele, e formulações farmacêuticas.

EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, USO
DE UMA EMULSÃO ESTABILIZADA POR PARTÍCULA E FORMULAÇÃO

Campo Técnico da Invenção

A presente invenção refere-se a uma emulsão ou
5 espuma estabilizada por partícula que compreende pelo menos
duas fases e partículas sólidas, a uma emulsão ou espuma
estabilizada por partícula seca que compreende pelo menos
duas fases e partículas sólidas e ao uso da dita emulsão ou
espuma estabilizada por partícula em diferentes aplicações.

10 Técnica Antecedente

Emulsões são uma mistura de duas ou mais fases
imiscíveis onde uma é dispersada na outra sob a forma de
pequenas gotículas. As emulsões podem ser gotas de óleo em
uma fase contínua de água ou gotas de água em uma fase
15 contínua de óleo, no caso de espumas, uma das fases consiste
em uma fase gasosa como ar, mas, em ambos os casos, as
gotículas ou bolhas precisam ser estabilizadas para evitar
que as mesmas coalesçam novamente. Os tensoativos adsorvidos
pela interface das duas fases diminuem a tensão interfacial e
20 podem aumentar a impedimento estérico ou a repulsão
eletrostática, que aumenta a estabilidade da emulsão. As
proteínas e tensoativos são usualmente usados como
emulsificantes em emulsões alimentares. No entanto, os
polissacarídeos também são usados para estabilizar emulsões,
25 especialmente goma arábica e celulosas modificadas e amidos.
Quando usado como estabilizador de emulsão, o amido é
usualmente gelatinizado e/ou dissolvido. Emulsões alimentares
são, em geral, estabilizadas por tensoativos, proteínas e
hidrocoloides; no entanto, recentemente, o uso de partículas
30 para estabilizar emulsões tem atraído interesse de pesquisa
substancial devido a suas características distintas e
aplicações tecnológicas potenciais.

Gotas de óleo estabilizadas por partículas

dispersadas, conhecidas como emulsões Pickering, foram originalmente observadas independentemente por Ramsden (1903) e Pickering (1907). Emulsões estabilizadas por partículas sólidas são usualmente mais estáveis em relação à
5 coalescência e ao envelhecimento de Ostwald (Ostwald ripening) comparadas a sistemas estabilizados por tensoativos. As mesmas exibem extrema estabilidade a longo prazo, mesmo com tamanhos de gotícula grande, e sem a adição de tensoativos. As partículas são, com frequência, partículas
10 inorgânicas como sílica, óxido de titânio ou argilas, látex, cristais de gordura, proteínas e hidrocoloides agregados. O tamanho de partículas usadas para emulsões Pickering varia de nano a micra e o tamanho de gotícula diminui com tamanho de partícula diminuído, mas apenas enquanto outras propriedades,
15 como molhabilidade, formato, superfície, etc, sejam iguais.

Existe uma necessidade tecnológica reconhecida por sistemas de entrega comestíveis que encapsulam, protegem e liberam ingredientes bioativos em, por exemplo, alimentos e produtos farmacêuticos e outras aplicações. É desejável
20 evitar o uso de tensoativos em emulsões devido a efeitos como aprisionamento de ar, formação de espuma, irritação e interações biológicas. Também existe uma necessidade por sistemas tópicos bem como outros produtos técnicos, onde emulsões ou espumas estabilizadas aprimoradas são vantajosas.

25 O amido é abundante, relativamente econômico, e é obtido a partir de fontes botânicas. Existe uma grande variação natural relacionada ao tamanho, formato e composição. O amido tem um valor nutricional intrínseco e é uma fonte não alergênica em contraste a outros emulsificantes
30 alimentares comuns que são derivados de ovo ou soja. Dependendo da origem botânica, a distribuição de tamanho e formato de grânulos de amido podem diferir substancialmente, bem como a razão entre os dois polímeros de amido,

amilopectina e amilose. Os grânulos de amido podem existir em uma variedade de formas: superfície lisa, áspera ou afiada e o formato pode ser esférico, elipsoidal, plano como discos, poligonal ou como hastes.

5 O documento nº WO2010/01 12216 revela farinha fabricada a partir de amaranto ou quinoa e o uso da mesma em produtos alimentares. O dito relatório descritivo da patente se refere a uma farinha.

10 O documento nº WO96/04316 revela amido e farinha granular pré-gelatinizada termicamente inibida. O dito relatório descritivo da patente se refere a uma farinha.

O documento nº WO96/22073 revela pré-tratamentos térmico de amido e define tal pré-tratamento térmico como "inibição térmica", que é caracterizado essencialmente por seu efeito no comportamento de viscosidade do amido quando o amido é submetido a uma sequência padrão de aquecimento acima da temperatura de gelatinização e resfriamento, o teste de Brabender. Enquanto a mesma revela o uso do amido "inibido", e mesmo amido inibido hidrofobicamente modificado em emulsões, os exemplos da descrição descrevem que a emulsão deve ser produzida a 80 °C. O pré-tratamento térmico pode danificar o amido de modo que o mesmo não gelatinize. O uso de amido gelatinizado é a forma de manual geralmente reconhecido de uso de amido hidrofobizado para emulsificação.

15

20

25 Os tratamentos térmicos de grânulos de amido como aqueles descritos em WO96/22073, e a hidrofobização de grânulos de amido descrita na técnica anterior não constituem uma parte da presente invenção, conforme se tornará evidente abaixo. A patente nº U.S. 4.587.131 revela o uso de grânulos de amido

30 •nativo, que não são usados de acordo com a presente invenção tendo em conta o fato que amido nativo não fornece os efeitos desejados necessários.

Ainda existe uma necessidade por sistemas de

entrega comestíveis que encapsulam, protegem e liberam ingredientes bioativos em, por exemplo, alimentos e produtos farmacêuticos e outras aplicações. Também existe uma necessidade por formulações tópicas com estabilidade elevada sem o uso de tensoativos que usam partículas que apresentam baixo teor de alergia e são biodegradáveis, por exemplo, em produtos cosméticos, produtos farmacêuticos para entrega tópica e outras tais aplicações. A presente invenção visa atender as necessidades mencionadas acima.

10 Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se, em um aspecto, a uma emulsão ou espuma estabilizada por partícula que compreende pelo menos duas fases e partículas sólidas, sendo que as ditas partículas sólidas são grânulos de amido e os ditos grânulos de amido ou uma porção dos mesmos estão situados na interface entre as duas fases que geram a emulsão ou espuma estabilizada por partícula. Na figura 0-1, é mostrado que um amido de óleo (de cor vermelha) e uma fase aquosa podem formar uma emulsão após um cisalhamento de alta velocidade. São os grânulos de amido na interface das duas fases que ocasionam o efeito de estabilização e não as moléculas de amido ou um efeito volumoso primário de grânulos de amido na fase contínua como foi no caso das técnicas da técnica anterior. Uma ilustração esquemática que explica a diferença entre uma emulsão estabilizada por partícula, uma emulsão estabilizada por molécula de amido e uma emulsão por estabilizada tensoativo é fornecida na figura 0-2. Uma vantagem da presente invenção é a flexibilidade do sistema. Os grânulos de amido adicionados poderiam estar presentes na interface a uma concentração pequena ou grande desde que haja o efeito de estabilização. Dessa forma, a interface é estabilizada pelos grânulos de amido adicionados e não por qualquer outro componente que possa estar presente na emulsão

ou espuma. A figura 0-3 é um micrográfico que mostra como grânulos de amido intactos estabilizam de modo eficaz gotículas de óleo que criam emulsões do tipo Pickering cobrindo-se a superfície de gotículas de emulsão. Sua
5 capacidade hidrofóbica permite que as mesmas sejam adsorvidas na interface de óleo e água, que evita recoalescência e, por conseguinte, estabilidade de gotícula. O amido é um dos ingredientes alimentares mais predominantes, tendo mostrado propriedades de emulsificação inovadoras e úteis.

10 A presente invenção refere-se, em outro aspecto, a uma emulsão ou espuma estabilizada por partícula seca, sendo que uma emulsão ou espuma estabilizada por partícula de acordo com a presente invenção foi submetida à remoção de água como através de secagem, por exemplo, secagem por
15 congelamento, secagem por aspensão e/ou secagem a vácuo.

A presente invenção refere-se, em outro aspecto, a uma emulsão ou espuma estabilizada por partícula, sendo que a dita emulsão estabilizada por partícula foi submetida a um tratamento térmico a fim de intensificar ou ajustar
20 propriedades de barreira e/ou propriedades reológicas da emulsão estabilizada por partícula. Realizando-se esse tratamento térmico, a vida de prateleira pode ser prolongada ou ajustada e, em algumas aplicações, é permitida a liberação controlada ou a entrega direcionada.

25 A presente invenção refere-se, em ainda outro aspecto, ao uso de uma emulsão estabilizada por partícula para substituir gordura em produtos alimentares.

A presente invenção refere-se, em ainda outro aspecto, ao uso de uma emulsão estabilizada por partícula
30 para encapsulação de substâncias escolhidas a partir de biofarmacêuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas, anticorpos, ingredientes alimentares sensíveis, vitaminas e lipídeos.

A presente invenção refere-se, em ainda outro aspecto, ao uso de uma emulsão estabilizada por partícula em produtos alimentares, produtos cosméticos, cremes para a pele, loções, e formulações farmacêuticas como formulações tópicas, cápsulas, supositórios, formulação de inalação, suspensões orais, soluções por via oral, produtos injetáveis de modo intramuscular e subcutâneo, e produtos de consumo como tinta.

A presente invenção refere-se, em outro aspecto, a uma formulação que compreende uma emulsão estabilizada por partícula seca de acordo com a presente invenção e uma substância escolhida a partir de biofarmacêuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas, anticorpos, ingredientes alimentares sensíveis, vitaminas, e lipídeos. A emulsão estabilizada por partícula seca também é adequada para produtos alimentares, produtos cosméticos, cremes para a pele, loções, e produtos de consumo. A formulação pode ser uma formulação farmacêutica. Dessa forma, resultados surpreendentes foram realizados de acordo com a presente invenção, isto é, que grânulos de amido hidrofobizados não gelatinizados são adequados para emulsificação a temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização. O que foi descrito acima não é conhecido a partir da técnica anterior.

Descrição das Figuras

Figura 0-1: são fotografias de amostras com 33,3 % (v/v) de óleo em tampão e 100 mg de amido/ml de óleo, emulsificação a 11.000 rpm. Esquerda: uma amostra não emulsificada que inclui (de cima para baixo) fase oleosa, fase aquosa, amido; Direita: emulsão com amido de quinoa modificado por OSA produzido por homogeneização de alto cisalhamento. 1 mg de corante solúvel em óleo (Solvent Red 26) foi adicionado às amostras.

Figura 0-2: em emulsões Pickering de amido, são

encontrados grânulos de amido na interface de óleo/água que estabiliza a emulsão. Pode haver casos onde os grânulos de amido coexistam com outros emulsificantes ou tensoativos em outros produtos à base de emulsão, no entanto, não são responsáveis pela estabilização de gotícula. Por exemplo, em molécula de amido ou emulsões estabilizadas por tensoativo, os grânulos poderiam ser adicionados na fase contínua (aquosa) volumosa, mas não estão fixados à interface de óleo e água ou atuam como partículas de estabilização em emulsões tipo Pickering. Nesse caso, os grânulos de amido podem proporcionar outras propriedades ao produto, mas encontram-se fora do escopo dessa invenção.

Figura 0-3: grânulos de amido intactos estabilizam de modo eficaz gotículas de óleo que criam emulsões tipo Pickering cobrindo a superfície de gotículas de emulsão.

Figura 0-4A: emulsão por estabilizada tensoativo convencional (esquerda); aqui, pequenos tensoativos estabilizam a interface de óleo e água. Para aumentar a espessura da emulsão, são adicionados modificadores de viscosidade. A emulsão estabilizada por partícula (direita); aqui, grânulos de amido estabilizam a interface de óleo e água e estão em um estado fraco de agregação. Isso constrói a microestrutura proporcionando comportamento viscoelástico mesmo em teores baixos de fase oleosa.

Figura 0-4B: imagem microscópica de emulsão estabilizada por grânulo de amido de quinoa, 286 mg de amido/ml de óleo (barra de escala = 100 micras). A medição reológica e de microestrutura geral indica agregação entre gotículas que formam uma rede similar a gel. A Figura 0-5A mostra uma propriedade físico-química importante do amido, a saber, sua capacidade de gelatinizar na presença de água e calor. Em primeiro lugar, uma emulsão que consiste de gotas de óleo cobertas com amido é formada, então, através da

adição cuidadosa de calor, uma gelatinização parcial dos grânulos é induzida para formar uma camada de amido coesiva ancorada na interface de óleo e água. Essa barreira intensificada pode ser útil de diversas formas. Essa técnica também foi aplicada para permitir retenção de gotas de óleo durante secagem, produzindo assim pó de cápsulas de amido carregadas de óleo.

Figura 0-5B: princípio de encapsulação de substâncias solúveis em água por emulsões duplas (A) e encapsulação de óleo com outras substâncias dispersadas em (B). O tratamento térmico também pode ser aplicado para aumentar as propriedades de barreira da camada de amido e aprimorar adicionalmente capacidade de encapsulação (C e D). Usando-se emulsões Pickering de amido, as gotículas são grandes o suficiente para conter as gotículas ou cristais internos e a camada de amido é coesiva o suficiente para manter estabilidade de gota.

Figura 0-6 Esquerda: emulsão ordinária, Direita: emulsão dupla. As emulsões duplas com estabilidade elevada podem ser preparadas para proteger ingredientes solúveis em água sensíveis. As emulsões duplas são atrativas para proteger ingredientes solúveis em água sensíveis dentro de uma fase oleosa.

Figura 1-1: distribuições de tamanho de partícula de grânulos de amido de quinoa (D_{43} 3,45 μm) após mistura de alto cisalhamento em um Ystral D-79282 a 22.000 rpm por 30 segundos (linha sólida). As gotículas de emulsão estabilizada por quinoa resultantes (D_{43} 50,6 μm), 6,65 ml de fase contínua, 0,35 ml dispersado e 100 mg de amido de OSA a 2,9 %/ml de óleo após mistura de alto cisalhamento sob as mesmas condições (linha tracejada). Imagem de microscópico de uma emulsão estabilizada por amido (inserto).

Figura 1 -2: tamanho de gotícula (D_{43}) e volume de

oclusão relativo como uma função da quantidade de amido adicionado por ml de óleo medida após 1 e 7 dias. As concentrações marcadas a até j correspondem a imagens de emulsões na figura 1 -3. A linha tracejada vertical indica o recorte de tamanho de gotícula teórico para gotículas neutras de flutuabilidade.

Figura 1-3: imagens de emulsão em creme/assentada após 1 dia (topo) e após 7 dias (fundo), amido à esquerda de zero e 5% de óleo, óleo à direita de zero e 1.250 mg de amido. As letras correspondem a concentrações marcadas mostradas na plotagem na figura 1-2.

Figura 2-1: tamanho de gota como uma função da quantidade de amido adicionado para 4 variedades de amido: quinoa, arroz, milho, e cevada cerosa, todas as quais foram modificadas por OSA e em um tampão de fosfato de NaCl a 0,2 M. A quantidade de amido adicionado corresponde a 1,1, 2,2, e 3,9 % em volume do total sistema.

Figura 2-2. área de superfície específica medida de emulsões estabilizadas por amido versus área de superfície estimada que poderia ser estabilizada por um dado tamanho e concentração de grânulo de amido. Sólido representa o caso no qual a medida é igual ao previsto.

Figura 3-1: emulsões foram produzidas com o uso de técnicas de processamento diferentes, sendo que o propósito é demonstrar que as emulsões estabilizadas por grânulo de amido podem ser produzidas com o uso de uma variedade de métodos. Imagens (de cima para baixo) de emulsões produzidas por: nível 2 sorvall 300 s, nível 8 sorvall 300 s, homogeneizador de pressão alta de escala laboratorial, circulando com o uso de uma bomba peristáltica. As imagens à esquerda são micrográficos de emulsões (ampliação de 100 x). As imagens à direita são características de emulsão geral.

Figura 4-1: emulsões produzidas com 214 mg de

amido/ml de óleo com quantidades variadas de fração de volume de óleo. Efeito de tempo de armazenamento, e concentração de óleo em aparência visual e (esquerda) e índice de emulsão (direita).

5 Figura 4-2: módulo elástico como uma função de estresse de cisalhamento complexo em quatro concentrações de óleo.

 Figura 5-1: penetração de pele *in vitro* de salicilato de metila através de pele de porco a 32 °C, de 55%
10 de emulsões Pickering de amido oleosas; óleo de parafina (círculos), Miglyol (quadrados) e óleo de castanha (triângulos).

 Figura 6-1: módulo elástico (G' , Pa) como uma função de força complexa para emulsões estabilizadas por amido em
15 várias proporções entre amido e óleo que têm 40 % de fases dispersadas totais (óleo e amido).

 Figura 7-1: micrográficos de uma emulsão não tratada com 7 % de óleo Mygliol estabilizado com 214 mg de amido por ml de óleo (esquerda superior), emulsão
20 correspondente congelada com congelador a jato e descongelada (direta superior), emulsão correspondente congelada com nitrogênio líquido e descongelada (esquerda inferior), e emulsão correspondente tratada com calor 1 minuto a 70 °C (direita inferior).

25 Figura 7-2: micrográficos de uma emulsão dupla antes (esquerda) e após (direita) congelamento e descongelamento. Nitrogênio líquido foi usado para congelamento.

 Figura 7-3: distribuição de tamanho de partícula de emulsões duplas termotratadas e não tratadas antes e após
30 congelamento de descongelamento.

 Figura 8-1: micrográfico SEM de gotas de emulsão seca por congelamento contendo camada de amido gelatinizado e

óleo Miglyol. As emulsões foram termotratadas antes da secagem por congelamento. As gotas intactas e gotas que sofreram colapso parcial que deixaram bolsos vazios de camada de amido foram obtidas.

5 Figura 8-2: micrográfico SEM de gotas de emulsão seca por congelamento contendo manteiga de castanha. As emulsões não foram termotratados antes da secagem por congelamento. As gotas agregadas e não agregadas intactas foram obtidas e as imagens mostram presença de óleo livre.

10 Figura 8-3: micrográfico SEM de gotas de emulsão seca por congelamento contendo manteiga de castanha e camada de amido gelatinizado. As emulsões foram termotratadas antes da secagem por congelamento. As gotas agregadas e não agregadas foram obtidas.

15 Figura 8-4: micrográfico SEM de gotas de emulsão secadas por aspersão contendo manteiga de castanha e grânulos de amido. As esferas cobertas com amido carregadas de óleo permanecem intactas após secagem por aspersão.

20 Figura 8-5: distribuição de tamanho de partícula (D_{43}) de emulsões antes (esquerda) e após (centre) secagem por congelamento, e de uma emulsão dupla secada por congelamento (direita). As emulsões secadas foram hidratadas novamente antes da medição. O maior tamanho de partícula de emulsões aquecidas após secagem foi ocasionado por agregação.

25 Figura 9-1: micrográficos com luz polarizada de gotas de emulsão não aquecidas (figura superior) e aquecidas (figura inferior). As partes cristalinas de grânulos de amido são birrefringentes conforme observado pela cor brilhante na totalidade da superfície em (figura superior) e próximo à superfície de óleo (figura inferior). A área difusa fora das gotas (figura inferior) mostra amido gelatinizado parcial.

30

Figura 9-2: a atividade lipase como uma função de temperatura de tratamento térmico após emulsificação.

Figura 10-1: micrográficos de uma emulsão recentemente preparada com 10 % de óleo de peixe estabilizado com 500 mg de amido por ml de óleo (esquerda), que corresponde a após 1 semana de armazenamento (centro), ou 5 termotratado e armazenado por 1 semana (direita).

Figura 11-1: espuma estabilizada por grânulo de amido com uma estrutura rígida.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES PREFERENCIAIS

Em uma modalidade da invenção, os grânulos de amido 10 usados na emulsão ou espuma estabilizada por partícula são nativos ou foram submetidos a uma modificação física e/ou modificação química para aumentar a capacidade hidrofóbica dos grânulos de amido. O amido pode ser quimicamente modificado por tratamento com diferentes anidridos de 15 alquenil succinila, por exemplo, anidrido de octenil succinila (OSA), que é aprovado para aplicações alimentares em uma quantidade adicionada de até 3% com base no peso seco de amido. O anidrido de propenil succinila também pode ser usado. O grupo octenila hidrofóbica e o grupo carboxila ou 20 carboxilato de sódio aumentou a capacidade do amidos de estabilizar emulsões. Também é possível tornar os grânulos de amido mais hidrofóbicos através do enxerto com outros produtos químicos com uma cadeia lateral hidrofóbica, por exemplo, por esterificação com ácidos dicarboxílicos. As 25 partículas de amido modificado têm uma superfície bastante uniforme, pelo menos em relação à capacidade hidrofóbica, dessa forma, as gotículas cobertas com grânulo de amido têm propriedades de superfície similares àquelas dos grânulos de amido individuais. Quando as propriedades de superfície de grânulo permitem uma forte adsorção na interface de óleo e 30 água (um ângulo de contato não tão longe de 90°), as partículas, quando dispersadas na fase aquosa, também estão em um estado de agregação fraca. Nesse caso, uma barreira à

base de partícula estérica consiste em mais de uma simples camada densamente embalada de grânulos de amido na superfície de gotícula, mas também estende-se como uma rede/camada desordenada de grânulos entre gotículas (algumas das quais
5 podem ser observadas na figura 0-4B), que têm a totalidade da estrutura agregada mantida por forças atrativas entre partículas, criando assim, a fraca estrutura similar a gel observada.

No presente contexto, uma "emulsão estabilizada por
10 partícula" significa uma emulsão que tem pelo menos duas fases, sendo que os grânulos de amido ou uma porção dos mesmos são dispostos na interface entre as pelo menos duas fases, por exemplo, na interface entre uma fase oleosa e uma fase à base de água, e, dessa forma, estabilizando a emulsão.

15 Em uma modalidade da invenção, os grânulos de amido da emulsão ou espuma estabilizada por partícula são mais hidrofóbicos por modificação física, por exemplo, por aquecimento seco ou por outros meios, como uma mudança no pH, tratamento de pressão alta, irradiação, ou enzimas. O
20 aquecimento seco faz com que as proteínas de superfície do grânulo de amido mude de natureza de hidrofílica para hidrofóbica. Uma vantagem de modificação térmica é que nenhuma marcação específica é necessária quando usada em aplicações alimentares. Ademais, a alteração hidrofóbica
25 ocorre explicitamente na superfície de grânulo.

Em uma modalidade da invenção, os grânulos de amido da emulsão ou espuma estabilizada por partícula têm, de preferência, um tamanho granular pequeno na faixa de aproximadamente 0,2 a 20 micras, de preferência, 0,2 a 8
30 micras, com mais preferência, 0,2 a 4 micras, com ainda mais preferência, 0,2 a 1 micra.

Em uma modalidade da invenção, os grânulos de amido da emulsão ou espuma estabilizada por partícula são obtidos a

partir de qualquer fonte botânica. Mostrou-se que os grânulos de amido estabilizam emulsões de óleo em água. Em contraste às partículas comumente usadas para emulsões Pickering, o amido (incluindo amido hidrofobicamente modificado) é um
5 ingrediente alimentar aceito. Os grânulos de amido são abundantes, relativamente econômicos e são obtidos a partir de muitas fontes botânicas. Existe uma grande variação natural relacionada ao tamanho, formato e composição. O amido tem valor nutricional intrínseco e é uma fonte não alergênica
10 em contraste a outros emulsificantes alimentares comuns que são derivados de ovo ou soja. Os grânulos de amido da emulsão ou espuma estabilizada por partícula são, por exemplo, obtidos a partir de quinoa, arroz, milho, amaranto, cevada, milho doce não amadurecido, centeio, triticale, trigo,
15 fagópiro, tifa, filipêndula, durião, teff, aveia, pastinaca, painço pequeno, arroz selvagem, alpiste, pata de vaca, inhame, e taro incluindo variedades de amilose elevada e cerosas dos supracitados.

Pelo menos duas fases da emulsão ou espuma
20 estabilizada por partícula são escolhidas a partir de fase à base de óleo/fase de base aquosa, e fase gasosa/fase de base aquosa. Em uma modalidade da invenção a emulsão é uma emulsão de óleo em água ou uma emulsão de água em óleo, ou uma espuma.

25 Em uma modalidade da invenção, a quantidade de grânulos de amido adicionados na emulsão ou espuma estabilizada por partícula corresponde a aproximadamente 0,005 a 70 % em volume da emulsão total. A quantidade de grânulos de amido adicionados é, de preferência, determinada
30 pela cobertura da gotícula e a cobertura deveria ser maior que 10%.

De acordo com a presente invenção, a possibilidade de preparar emulsões de um dado tamanho de gotícula depende

criticamente da disponibilidade de uma quantidade de grânulos de amido suficiente para estabilizar a superfície resultante. A quantidade suficiente pode ser descrita em termos da área que os grânulos de amido podem cobrir quando espalhados em uma camada única em relação à área de superfície da emulsão a
 5 uma dada densidade de embalagem. Especificamente, se a emulsão contém um volume de óleo (V_0) e contém gotículas de diâmetro de cobertura (D_{32}) de D_0 , então a superfície interfacial total das gotículas de óleo (S_0) é dada por:

$$10 \quad S_0 = \frac{6 V_0}{D_0}$$

Para estabilizar essa interface de área S_0 , uma camada de amido S_s que ocupa a mesma área é necessária.

Presume-se que a área ocupada por um grânulo de amido seja esférica de diâmetro D_s , e fixada à interface de
 15 óleo e água em um ângulo de contato de 90° com uma fração de embalagem interfacial ϕ .

$$a_s = \frac{\pi D_s^2}{4\phi}$$

O número de grânulos de amido (presumindo que os mesmos tenham D_s de diâmetro) para um dado peso de amido, W_s ,
 20 e densidade de amido, ρ_s .

$$n_s = \frac{W_s}{\rho_s \frac{\pi}{6} D_s^3}$$

A área total que os mesmos ocupam $S_s = n_s a_s$, ou igual
 a:

$$S_s = \frac{6 W_s}{\rho_s \phi 4 D_s}$$

25 A fração de embalagem interfacial ϕ é o inverso da quantidade de espaço entre as partículas, e alcança um limite teórico de $\phi \sim 0,907$, isto é, embalagem hexagonal. No entanto existem muitos casos onde é levemente superior (1,2) ou ainda

significativamente inferior (0,10) e para sistemas extremamente puros tão baixos quanto (0,002) e dependem ainda do sistema (Gautier et al. 2007, Tcholakova et al. 2008). Para a prática, determinou que a faixa se situaria entre 0,10 e 1,2.

Dessa forma, para cobrir uma área de óleo S_0 , é necessária uma área de amido S_s . Através da definição de $S_0=S_s$ e da redistribuição, é obtido o que segue:

$$\frac{W_s}{V_0} = \frac{4\phi\rho_s D_s}{D_0}$$

Isso tem as unidades de mg/ml (ou kg/m³).

Exemplo: Creme Tópico

Uma emulsão com um tamanho de gota médio (D_{32}) D_0 49 µm deve ser produzida e grânulos de amido de quinoa são usados para estabilizar isso, que tem um diâmetro médio $D_s=2,27$ µm e densidade sólido $\rho_s=1.550$ kg/m³ com uma densidade de embalagem interfacial $\phi= 0,73$, A quantidade de amido necessária por volume de óleo é:

$$\frac{W_s}{V_0} = \frac{4\phi\rho_s D_s}{D_0} = \frac{4 \cdot 0,72 \cdot 1550 \cdot 2,27E-6}{49E-6} = 214 \text{ mg/ml}$$

Em uma modalidade da invenção, a emulsão ou espuma estabilizada por partícula foi submetida a um tratamento térmico a fim de alterar propriedades de barreira da emulsão estabilizada por partícula. Existe uma necessidade por sistemas de entrega para encapsular, proteger e liberar ingredientes bioativos em alimentos e produtos farmacêuticos. Muitos dos ingredientes ou compostos usados em tais aplicações são lipofílicas ou deseja-se que sejam contidas em ou dispersadas na fase lipídica. Mostrou-se que os grânulos de amido que foram usados na emulsão da invenção estabilizam a interface contra coalescência. No entanto, em algumas situações, existe a necessidade de aprimorar adicionalmente

as propriedades de barreira. Isso também foi realizado e propriedades de barreira aprimoradas das emulsões ou espumas estabilizadas por partícula foram fornecidas com a aplicação de calor, levando a uma emulsão com camadas de amido parcialmente gelatinizadas. Uma figura esquemática desse conceito é mostrada na figura 0-5A. Em geral, os sistemas de entrega poderiam alcançar inúmeras funções diferentes, por exemplo, um alimento à base de emulsão que atrasa digestão de lipídio e induz saciedade ou, talvez, liberação direcionada e controlada de componentes bioativos no trato gastrointestinal. Para quantificar a impenetrabilidade da camada de amido parcialmente gelatinizada, a diminuição na taxa de lipólise foi medida, sob a premissa que superfícies rigidamente cobertas com grânulos de amido que são difíceis de deslocar da interface, irá reduzir a capacidade da lipase de digerir os lipídeos presentes no óleo emulsificado.

Em uma modalidade da invenção, a emulsão ou espuma estabilizada por partícula foi submetida à secagem, secagem por congelamento, secagem por aspersão e/ou secagem a vácuo, através da qual uma emulsão ou espuma estabilizada por partícula seca é obtida. As emulsões secas podem adicionada ao alimento, cremes e farmacêuticos como um ingrediente e podem ser usadas para formulações de aspersão em pó como inaladores. O sistema de emulsão pode ser diluído sem perda e deslocamento do amido. Isso significa que a emulsão ou espuma estabilizada por partícula seca pode ser adicionada a outros processos em pequenas quantidades, no ponto desejado no processo. Isso aprimora a funcionalidade de ingredientes sensíveis.

Em uma modalidade da invenção, a emulsão estabilizada por partícula é usada para controlar a densidade de gotículas de emulsão. Os parâmetros que influenciam o que foi citado acima são a densidade do óleo, a densidade do

líquido, a concentração do amido bem como o tamanho dos grânulos de amido. As propriedades reológicas da emulsão podem ser variadas através da variação da razão entre amido e óleo. A emulsão resultante mudará as propriedades de fluxo de um creme de viscosidade baixa para um gel de partícula 5 carregado com gotícula facilmente dispersado e fraturado que exibe um estresse de rendimento em concentrações baixas. É possível formar um gel de óleo/partícula de carregamento de espaço a uma concentração de volume baixo de 0,5% de amido e 10 5% de óleo. Em volumes de fase altamente dispersados (mais óleo e grânulos de amido), a emulsão se torna mais rígida e mais sólida. Essa é uma propriedade útil tendo em vista que podem ser produzidos produtos com uma faixa de texturas sem o uso de modificadores de viscosidade adicionais (como 15 polímeros) visto que as partículas atuam como emulsificantes e um espessante (ilustrado na figura 0-4A).

Em uma modalidade da invenção, as emulsões estabilizadas por partícula são usadas para substituir 20 gordura em produtos alimentares. Devido ao alto teor calórico de gordura, percebeu-se que substituir gordura pelas emulsões da invenção é benéfico para a indústria de alimentos. Em uma modalidade da invenção, uma espuma estabilizada por partícula pode substituir cristais de gordura em creme batido.

Em uma modalidade da invenção, as emulsões 25 estabilizadas por partícula são usadas para encapsulação de substâncias escolhidas de probióticos, células vivas, biofarmacêuticos, proteínas, enzimas, anticorpos, ingredientes alimentares sensíveis, vitaminas, e lipídeos. As emulsões estabilizadas por partícula também são benéficas 30 para dissimulação de sabor de substâncias de sabor ou aroma de forma inaceitável como óleo de peixe e antibióticos. Em uma modalidade, a emulsão estabilizada por partícula é usada como uma emulsão dupla. As emulsões duplas são caracterizadas

por ter uma emulsão primária dispersada como gotículas de uma emulsão secundária. Por exemplo, gotículas de água dentro de gotículas de óleo dispersadas em uma segunda fase aquosa (consulte figura 0-6). Uma emulsão dupla de estabilidade satisfatória tem uma eficácia de encapsulação inicial de 95% e, após 4 semanas de armazenamento, ainda tem 70 a 80%. Ao usar Emulsões Pickering de Amido, as gotículas são grandes o suficiente para conter as gotas e a camada de amido é coesiva o suficiente para manter estabilidade de gota. O teste mostrou uma eficácia de encapsulação inicial >98,5% e, após 4 semanas de armazenamento, ainda tem >90%. Mesmo após um ciclo de congelamento e descongelamento, perdeu-se apenas <1 % de fase interna.

Em uma modalidade, a emulsão estabilizada por partícula é usada para encapsular substâncias deficientemente solúveis na fase oleosa. Em algumas aplicações médicas que usam emulsões convencionais uma substância ativa deficientemente solúvel no óleo, a substância cristaliza. Esses cristais são muito grandes para as gotas pequenas ocasionando instabilidade. Ao usar Emulsões Pickering de Amido, as gotículas são grandes o suficiente para conter os cristais e a camada de amido é coesiva o suficiente para manter a estabilidade de gota (consulte figura 5B-direita).

Em uma modalidade da invenção, as emulsões estabilizadas por partícula são usadas em produtos alimentares, produtos cosméticos, cremes para a pele, loções e formulações farmacêuticas. A emulsão estabilizada por partícula de acordo com a presente invenção é um emulsificante não alergênico que pode ser usado em cosméticos e cremes para a pele como hidratantes e protetores solar.

Em uma modalidade da invenção, deseja-se aumentar as propriedades de barreira para liberar, de modo mais satisfatório, perfis para a pele ou evitar desestabilização

do ingrediente ativo/emulsões. A etapa de aquecimento é usada a fim de gelatinizar parcialmente o amido e, dessa forma, criar um filme mais justo. Para determinadas aplicações, a etapa de aquecimento mencionada acima é realizada.

5 A presente invenção será exemplificada por diversos experimentos não limitadores que são apresentados abaixo.

Descrição experimental

Experimento 1

10 No experimento 1, a capacidade de grânulos de amido estabilizarem emulsões de óleo em água foi estudada.

O amido foi isolado de Quinoa (Biofood, Suécia) por um processo de moagem úmida e modificado por OSA para 2,9%. Quinoa foi escolhida devido a sua pequena distribuição de tamanho de grânulo unimodal e ligeiramente pequena. A fase
15 contínua das emulsões foi um tampão de fosfato com pH 7 com NaCl a 0,2M, densidade 1009,6 kg/m³, a 20 °C, a fase dispersada foi o óleo triglicerídeo de cadeia média Miglyol 812, densidade 945 kg/m³ a 20 °C (Sasol, Alemanha).

Métodos

Isolamento de amido de quinoa

20 As sementes de Quinoa foram moídas com água em um misturador (Philips HR7625, Holanda) e filtradas através de um pano de peneira. Permitiu-se que o amido se assentasse e o sobrenadante foi removido. Água fresca foi adicionada ao
25 amido, que, após assentamento e remoção de água, foi secado em um secador a vácuo a 20 °C por 4 dias. As proteínas no amido secado foram removidas por lavagem do amido duas vezes com solução de NaOH a 3%, uma vez com água e uma vez com ácido cítrico (pH 4,5) antes de o amido ser secado com ar à
30 temperatura ambiente e desagregado com argamassa e pilão.

Modificação por OSA

O amido foi perfeitamente suspenso na parte dupla em peso de água com o uso de hélice de aço inoxidável e o pH

foi ajustado em 7,8. Quatro quantidades iguais de OSA (totalmente à base de 4% em peso de amido) foram adicionadas com um intervalo de 15 minutos e o pH foi mantido a 7,4 a 7,9 adicionando-se solução de NaOH a 1M gota a gota. Quando o pH ficou estável por pelo menos 15 minutos, a solução de amido foi centrifugada a 3.000*g por 10 minutos, lavada duas vezes com água e uma vez com ácido cítrico (pH 4,5) antes de o amido ser secado com ar à temperatura ambiente por pelo menos 48 horas.

A substituição de OSA foi determinada por um método de titulação. De modo resumido, 5 g (peso seco) de amido foram dispersadas em 50 ml de HCl a 0,1 M e agitadas por 30 minutos. A pasta aquosa foi centrifugada a 3.000*g por 10 minutos, lavada uma vez com 50 ml de etanol (90%) e duas vezes com água antes de o amido ser suspenso em 300 ml de água, cozido em um banho de água fervente por 10 minutos e resfriado a 25 °C. A solução de amido foi titulada com NaOH a 0,1 M a pH 8,3. Um material em branco foi simultaneamente titulado com amido nativo da mesma origem que o amido de OSA como uma amostra. A percentagem de grupos carboxila de OSA nos grânulos de amido foi calculada por:

$$\%OSA = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times N \times 210}{W} \times 100$$

onde V é o volume (ml) de NaOH necessário para a amostra e uma titulação em branco, M é a molaridade de NaOH (0,1 M), W é o peso seco (mg) do amido e 210 é o peso molecular do grupo octenil succinila.

Emulsificação

As emulsões foram preparadas em tubos de teste de vidro, combinando-se 6,65 ml de fase contínua, 0,35 ml de fase dispersada e amido em quantidades variadas (12,5 mg a 1.250 mg) e emulsificadas por mistura de alto cisalhamento em

um Ystrol (D- 79282, Ballrechten-Dottingen, Alemanha) a 22.000 rpm por 30 segundo. As amostras emulsificadas submetidas a tratamento de vórtice foram, então, fotografadas 1 dia e 1 semana após emulsificação e as imagens das amostras foram analisadas em ImageJ para determinar o volume da camada em creme/assentada. A capacidade de emulsificação do amido e a estabilidade das emulsões foram expressas como o volume de oclusão relativo, ROV.

$$ROV = \frac{V_{emuls}}{V_{oleo} + V_{amido}}$$

onde V_{emuls} é o volume da emulsão observada (isto é, a fração não límpida), V_{oleo} é o volume da fase oleosa e V_{amido} é o volume ocupado pelo amido adicionado. Em um sistema de fase completamente separada, $ROV = 1$, isto é, não há aumento na camada de emulsão além de suas fases constituintes.

15 Medições de tamanho de partícula de grânulos e emulsões de amido

As distribuições de tamanho de partícula foram medidas um dia e uma semana após emulsificação com o uso de difração a laser com modo óptico Mie (Coulter LS 130, Coulter Electronics Ltd, Luton Beds, Inglaterra) para amido e emulsões cobertas com amido, foi usado o índice de refração e 1,54. Um pequeno volume de amostra foi adicionado ao sistema de fluxo e bombeado através da câmara óptica para medições.

Microscopia

25 As emulsões foram diluídas 5 vezes com a fase contínua e, então, as amostras foram colocadas em um canal quadrado de 100 micras VitroCom (CMS Ltd., Ilkley, R.U.). As imagens de microscópio das emulsões foram obtidas usando-se uma câmera Olympus BX50 (Tokyo, Japão) e uma digital (DFK 30 41AF02, Imaging source, Alemanha).

Resultados

Os grânulos de amido absorvem e estabilizam a interface de óleo e água.

Observou-se que os grânulos de amido de Quinoa (diâmetro médio 1,34 μm) estabilizam a interface de óleo e água em uma camada rigorosamente embalada (consulte inserto na Figura 1-1) no que parece ser emulsões tipo Pickering. A distribuição de tamanho de (diâmetro médio de volume D_{43}) é plotada na figura 1-1 para os grânulos de amido (linha sólida) e as emulsões estabilizadas por amido (linhas tracejadas). A distribuição de tamanho de partícula medida dos grânulos de amido indicou alguma agregação que tem tamanhos na faixa de 4 a 10 μm . Infere-se que os mesmos estão agregados, visto que imagens SEM não mostram tal ampla faixa de tamanhos de grânulo individual. Na emulsão resultante, foi observado alguns agregados de amido no microscópio e os mesmos também foram percebidos na distribuição de tamanho de partícula da emulsão (linha tracejada na figura 1-1) como um ressalto menos no pico principal.

O tamanho de gotícula pode ser controlado pela quantidade de amido adicionado

O tamanho de gotícula de emulsão final foi diminuído visto que a quantidade de amido por ml de óleo aumentou. As emulsões com tamanhos de gotícula situando-se na faixa de 64 μm (com 36 mg de amido adicionado/ml de óleo) até 9,9 μm (3.600 mg de amido adicionado/ml de óleo) foram observadas. O efeito de concentração no tamanho tem um efeito de diminuição sobre as concentrações mais elevadas (consulte figura 1-2, notar escala logarítmica).

Para estimar o grau de possibilidade de nova execução, duas condições de emulsificação foram realizadas três vezes e uma em duplicata. As condições com 71 mg de amido por ml de óleo apresentaram um diâmetro médio de volume $D_{43} \pm$ erro padrão da média igual a $58,4 \pm 1,13$, $n=3$, condições

com 571 mg de amido por ml de óleo apresentaram $D_{43} \pm$ erro padrão da média igual a $26,9 \pm 3,26$, $n=3$, e condições com 1.714 mg de amido por ml de óleo apresentaram $D_{43} \pm$ erro padrão da média igual a $12,3 \pm 0,014$, $n=2$.

5 O tamanho de gotícula foi medido após 1 dia e após 7 dias e verificou-se que apresentava pouca mudança (em alguns casos, o tamanho de gotícula ainda diminuía, mas em um nível dentro da variabilidade entre réplicas), com a exceção de uma tendência por tamanhos de gotícula levemente maiores
10 após 7 dias nas duas concentrações de amido inferiores. (Consulte figura 1-2). Isso poderia ser esperado já que pode não haver amido suficiente para estabilizar a interface na concentração inferior permitindo coalescência mais fácil. Subsequentemente, observou-se que os mesmos permaneciam
15 inalterados mesmo após diversos meses de armazenamento à temperatura ambiente.

Não houve mudança significativa no tamanho de gotícula medido visto que a fração de óleo foi aumentada (a uma razão constante entre amido e óleo). Em 12,5% de óleo,
20 D_{43} era $36,6 \pm 1,98 \mu\text{m}$, 16,6% de óleo D_{43} era $36,9 \pm 0,240 \mu\text{m}$, 25,0% de óleo D_{43} era $35,9 \pm 0,156 \mu\text{m}$, e 33,3% de óleo D_{43} era $36,4 \pm 2,16 \mu\text{m}$. Isso está de acordo com as observações acima que o tamanho de gotícula é determinado pela quantidade de amido adicionado.

25 A densidade de gotícula pode ser controlada pela quantidade de amido adicionado

Devido a diferenças de densidade entre óleo de amido e água, a emulsão coberta com partícula de amido não vai formar creme em tal taxa alta visto que os efeitos de
30 flutuabilidade são significativamente reduzidos. A partir da análise geométrica, e densidades de fases conhecidas ($\rho_{\text{amido}} 1.550 \text{ kg/m}^3$, $\rho_{\text{óleo}} 945 \text{ kg/m}^3$) e volumes (V_{amido} , $V_{\text{óleo}}$, $V_{\text{gotículas}}$) presumem embalagem justa de amido na interface de

óleo e água e que o amido é pequeno comparado ao diâmetro de gotícula, pode-se calcular em qual tamanhos de gotícula as emulsões cobertas com grânulo de amido deveriam flutuar ou afundar.

$$\rho_{gota} = \frac{V_{amido} \cdot \rho_{amido} + V_{óleo} \cdot \rho_{óleo}}{V_{gota}}$$

5

Visto que a concentração de amido aumenta, o tamanho de gotícula diminui e a densidade eficaz de gotículas cobertas com amido aumenta até que as mesmas se tornem eventualmente mais densas que a fase contínua e comecem a afundar. Esse nível é mostrado como a linha vertical na figura 1-2 e corresponde as observações da presente invenção e fotografias figura 1-3 onde as gotículas de emulsão estão, na maioria, afundando a concentrações sobre 200 mg/ml de óleo. Já que foi aumentada a quantidade de amido adicionado (expressa como mg de amido por ml de óleo), o tamanho de gotícula diminuiu, a densidade aumenta devido ao fato de que há um volume relativo menor de óleo em relação à camada de amido que cobre isso. As emulsões neutras de flutuabilidade não são submetidas à formação de creme ou assentamento e, dessa forma, têm uma estabilidade maior.

10

15

20

Propriedades de fase de emulsão

25

30

As propriedades da emulsão variam com a razão entre amido e óleo, de um creme de baixa viscosidade a um gel de partícula carregada (possivelmente ligada por ponte de óleo) com gotícula fraca fraturada e facilmente dispersada que exibe um estresse de rendimento. O volume de oclusão relativo da fase de emulsão atravessa de um máximo de quase 9 a razões entre amido e óleo intermediárias, isto é, é possível formar um gel de óleo/partícula de carregamento de espaço a uma concentração de volume de 1,7% amido e 5,5% de óleo.

Propriedades de armazenamento

Nenhuma mudança foi observada durante armazenamento refrigerado de emulsões durante 1 ano.

Conclusões do Experimento 1

O Experimento 1 mostrou que grânulos de amido
5 intactos estabilizam de modo eficaz gotas de óleo que criam emulsões tipo Pickering. Verificou-se que o tamanho de gotícula era dependente da concentração de amido adicionado com mudanças marginais inferiores em concentrações de amido superiores. Nesse ponto, outros fatores, como nível de
10 tratamento mecânico, poderiam ser determinantes. Embora muitas das emulsões possam ser submetidas à formação de creme ou assentamento, as mesmas são estáveis contra coalescência que mostra pouca mudança na aparência e altura de camada de emulsão após formação de creme ou assentamento inicial. Foi
15 observado que as mesmas permanecem inalteradas mesmo após diversos meses de armazenamento à temperatura ambiente. Esse tipo de sistema de emulsão tipo Pickering de grânulo de amido pode ter aplicações além de alimentos, por exemplo, na cosmética, e para formulações de droga farmacêutica onde o
20 amido é um excipiente aprovado.

Experimento 2

No experimento 2, o efeito do tipo de tratamento hidrofóbico e o grau de capacidade hidrofóbica em propriedades de emulsão resultantes é ilustrado.

25 Materiais

Nesse experimento, foram usados grãos de amido isolado de quinoa (Biofood AB, Suécia, densidade 1.500 kg/m³). Os grânulos de amido isolado foram termotratados ou modificados por OSA com anidrido de n-octenil succinila (CAS:
30 26680-54-6 Ziyun Chemicals Co., Ltd, China). Nos estudos de emulsão, a fase dispersada foi o óleo triglicerídeo de cadeia média Miglyol 812 (Sasol, Alemanha, densidade 945 kg/m³) e a fase contínua foi um tampão de fosfato a 5 mM com pH 7 NaCl a

0,2M (densidade 1.009,6 kg/m³). Os outros produtos químicos usados no estudo foram de grau analítico. Pequeno amido granular foi isolado de grãos de quinoa conforme descrito no experimento 1. Antes do uso, os grânulos de amido foram
5 desagregados em um pó fino triturando com argamassa e pilão.

Osa-modificação de amido

O teor de água do pós de amido foi determinado com o uso de um IR-equilíbrio a 135 °C, a partir dessa massa de pós de amido, o equivalente a 50 g de peso seco foi medido. O
10 amido foi completamente suspenso na parte dupla em peso de água com o uso de uma hélice de aço inoxidável e o pH foi ajustado em 7,6. A OSA foi adicionada a 3% (ou 6%, 10%) com base no peso seco do amido, e adicionada em quatro porções com atraso de 15 minutos entre adições. O pH foi ajustado com
15 HCl a 25% e/ou NaOH a 1 M. Então, um equipamento de titulação automática com medidor de pH e NaOH a 1 M foram usados para manter o pH em 7,6. O processo foi interrompido quando o pH permaneceu estável por pelo menos 15 minutos, isto é, não foram necessários mais ajustes de pH para manter isso em 7,6.

20 A solução de amido-água-OSA foi centrifugada a 3.000 g por 10 minutos e a água foi despejada. O amido foi misturado com água destilada e foi centrifugado duas vezes. O amido foi misturado com ácido cítrico, pH 4,5 a 5, antes de ser centrifugado e enxaguado. O amido foi disperso em
25 bandejas de aço inoxidável e secado em uma temperatura ambiente por pelo menos 48 horas.

A determinação do grau de substituição de amido modificado por OSA foi realizada por um método de titulação conforme descrito no experimento 1. A determinação foi
30 realizada em duplicata para o amido modificado por OSA e o amido de controle, que tem o mesmo lote de origem que o amido modificado por OSA. O peso seco do amido foi determinado por um IR-equilíbrio a 135 °C. Para tal, uma quantidade de

amostra de aproximadamente 1 g foi usada em duplicata. Então, 2,5 g de amido com base em uma substância seca foram pesados e foram adicionados a um béquer de 50 ml. O amido foi molhado com algumas gotas de etanol antes de 25 ml de HCl a 0,1 M ser
 5 adicionado e, então, agitado com uma agitadora magnética por 30 minutos. A pasta aquosa foi centrifugada a 3.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O amido foi misturado com 25 ml de etanol antes da centrifugação a fim de lavar o amido. Então, o sobrenadante foi descartado. O amido
 10 foi lavado conforme anteriormente, mas duas vezes com água destilada. O amido foi adicionado a um béquer de 500 ml e misturado a 150 ml de água destilada. A mistura foi aquecida em um banho de água fervente a 95 °C por 10 minutos antes de ser resfriada a 25 °C. A mistura foi titulada com NaOH a 0,1
 15 M até que o pH fosse 8,3. O volume de NaOH usado foi observado. A percentagem de grupos carboxila de OSA (consulte tabela 1-1) nos grânulos foi calculada por:

$$\%OSA = \frac{(V_{amostra} - V_{controle}) \cdot M \cdot 210}{W} \cdot 100\%$$

Onde V é o volume (ml) de NaOH necessário para a amostra e a titulação de controle, M é a molaridade de NaOH
 20 (0,1 M), W é o peso seco (mg) do amido e 210 é o peso molecular do grupo octenil succinila.

TABELA 1-1: Verificação do grau de modificação por OSA expresso em %

% de OSA adicionado	V (ml)	% de grupos carbonila de OSA nos grânulos, isto é, o grau de modificação expresso em %
0	0,325	0
3	2,64	1,95
6	4,15	3,21
10	5,87	4,66

25

Modificação térmica de amido

O amido seco (10 g) foi colocado em uma placa de petri aberta em uma camada com 1 a 2 mm de espessura. As amostras foram aquecidas a 120 °C durante diferentes durações em uma fornalha (30, 60, 90, 120 e 150 minutos). As amostras termoaquecidas foram deixadas à temperatura ambiente por diversas horas antes de usá-las. Esse tratamento foi realizado a fim de modificar hidrofobicamente a superfície dos grânulos de amido e, dessa forma, alcançar uma afinidade maior em relação à interface de óleo e água.

10 Emulsificação

As emulsões foram preparadas com o volume total de 6 ml em tubos de teste de vidro. Todas as emulsões foram produzidas em triplicata. As emulsões continham Miglyol a 7 % (isto é, 0,4 g) como fase dispersada, quantidade de amido de 15 214 mg/ml de óleo (isto é, 0,089 g) e, como fase contínua, solução de tampão de fosfato a 5mM, pH7, com NaCl a 0,2 M (isto é, 5,63 g). Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente sem nenhum controle de temperatura. Amido, óleo e solução tampão foram pesados em colocados em 20 tubos de teste, e agitados com um misturador por vórtice (VM20, Chiltern Scientific Instrumentation Ltd, R.U.) por 5 segundos antes de ser misturado a 22.000 rpm por 30 segundos com um Ystral (D-79282, Ballrechten-Dottingen, Alemanha).

25 Caracterização de emulsões por dispersão de luz

Um analisador de tamanho de partícula por difração a laser (Mastersizer 2000 Versão 5.60, Malvern, Reino Unido) foi usado a fim de determinar a distribuição de tamanho de partícula das gotas de óleo. A emulsão foi adicionada ao sistema de fluxo contendo milliQ-water e foi bombeada através 30 da câmara óptica. A fim de reduzir a quantidade de gotas agregadas, a velocidade de bomba foi 2.000 rpm. O índice de refração (RI) da partícula foi definido em 1,54, que corresponde ao amido que cobre as gotículas. O índice de

refração da fase contínua foi definido em 1,33 que é o RI da água. A amostra foi adicionada até que o obscurecimento estivesse entre 10 e 20%. Os tamanhos médios de gotícula D_{43} e D_{32} bem como o modo das distribuições de tamanho de gota de emulsão foram determinados.

Conclusões como resultado do Experimento 2

Todos os tratamentos permitiram a produção de emulsões estabilizadas por grânulo de amido e, embora as gotas tenham tamanho variado e haja alguns grânulos livres de amido; uma vez formado, observações visuais indicaram que as mesmas permaneceram como gotas. No entanto, os grânulos não tratados apresentaram capacidade de emulsificação significativamente mais insatisfatórias e tiveram a maior dispersão na distribuição de tamanho de gotícula com um pico (modo) em 127 μm . A Tabela 1-2 lista os tamanhos de gotícula medidos. Parece ser um nível ideal de modificação por OSA ao redor de 3% ou um tratamento térmico de 30 a 90 minutos a 120 °C. Um nível muito baixo de modificação pode não proporcionar, aos grânulos, afinidade suficiente para adsorver na interface de óleo e água - onde um nível muito elevado de capacidade hidrofóbica pode resultar em gotículas agregadas. A modificação hidrofóbica de grânulos de amido intactos faz com que os mesmos funcionem de forma satisfatória como partículas para estabilizar emulsões tipo Pickering com muitas propriedades úteis é adicionalmente ilustrada nos exemplos a seguir.

TABELA 1-2: Medições de tamanho de partícula de emulsão produzida com grânulos de amido com diferentes modificações hidrofóbicas com o uso de 214 mg grânulos de amido /ml de óleo.

	D3,2 - diâmetro médio ponderado de	D4,3 - diâmetro médio ponderado de	Modo (pico) (μm)
--	---	---	----------------------------------

	área (μm) \pm stdev	área (μm) \pm stdev	
Amido Nativo	3,71 \pm 0,486	59,6 \pm 9,50	127
OSA a 1,95 %	9,96 \pm 0,335	43,3 \pm 1,79	50,9
OSA a 3,21 %	13,5 \pm 0,991	42,0 \pm 3,92	42,7
OSA a 4,66 %	19,4 \pm 1,97	54,6 \pm 1,79	54,9
30 minutos de calor (120 °C)	2,95 \pm 0,560	28,3 \pm 22,7	43,4
60 minutos de calor (120 °C)	3,58 \pm 1,08	46,1 \pm 26,7	43,4
90 minutos de calor (120 °C)	3,41 \pm 0,425	41,5 \pm 9,45	40,3
120 minutos de calor (120 °C)	5,11 \pm 3,01	65,8 \pm 35,7	88,4
150 minutos de calor (120 °C)	4,42 \pm 1,24	62,4 \pm 31,1	91,8

Experimento 3

No experimento 3, a capacidade de estabilização de 7 diferentes grânulos de amido intactos para gerar emulsões de óleo em água foi estudada.

5 Os amidos comerciais a seguir foram investigados nesse estudo de triagem: arroz, arroz ceroso, milho, milho ceroso, milho com alto teor de amilose (HylonVII) e cevada cerosa (todos da Lyckeby-Culinar AB, Suécia). O amido isolado de grãos de quinoa (Biofood, Suécia) por moagem molhada como
10 no experimento 1 também foi incluído no estudo. Os amidos foram estudados em sua forma nativa, termotratados e modificados por OSA. A modificação por OSA foi realizada como no experimento 1. A fase contínua foi um tampão de fosfato a 5mM com pH 7 com e sem NaCl a 0,2M, a fase dispersada foi o
15 óleo triglicérido de cadeia média Miglyol 812 (Sasol, Alemanha).

Tratamento térmico de amido

O amido seco foi colocado sobre placas de vidro e

termotratados em uma fornalha a 120 °C por 150 minutos a fim de modificar hidrofobicamente a proteínas de superfície dos grânulos de amido e, dessa forma, alcançar uma capacidade de ligação de óleo superior.

5 Medições de tamanho de partícula de grânulos de amido

As distribuições de tamanho de partícula do amido foram medidas com o uso de difração a laser (Coulter LS130, Beckman Coulter, R.U.) em uma célula de fluxo contínuo (conforme descrito no experimento 1).

10 Emulsificação

As emulsões foram preparadas em tubos de teste de vidro com 4 ml da fase contínua, 2 ml da fase oleosa e 100 a 400 mg de amido misturando-se a um Ystrol (D-79282, Ballrechten-Dottingen, Alemanha) a 11.000 rpm por 30 segundos.

15 Teste de Estabilidade de Corante

Aproximadamente 1 mg do corante solúvel em óleo Solvent Red 26 foi adicionado ao topo das emulsões após 24 horas e os tubos de teste foram suavemente girados 3 vezes. Após outras 2 horas, as emulsões foram agitadas com um misturador por vórtice por 5 segundos e armazenadas à temperatura ambiente por 6 dias. A mudança de cor da emulsão foi observada. A cor após vórtice é uma medição da estabilidade das gotas formadas. As gotas estáveis não têm uma troca com o corante lipofílico; por conseguinte, a fase de emulsão permanecerá branca. Uma fase de emulsão de cor vermelha aumentada indica que as gotas foram menos estabilizadas pelos grânulos de amido de absorção ou há uma fase oleosa livre no sistema. Consulte tabela 2-1.

25 Microscopia

Para microscopia das emulsões de microscópio Olympus BX50 (Japão) e câmera digital foi usada. As imagens

foram processadas em ImageJ (versão 1.42m).

Análise

A separação de fase da camada contínua e de emulsão foi monitorada da seguinte maneira: as emulsões foram armazenadas à temperatura ambiente por 6 dias. Os tubos de teste com as amostras emulsificadas foram fotografadas 6 dias após vortexação e as imagens das amostras foram analisadas em ImageJ. A capacidade de emulsificação dos amidos e a estabilidade das emulsões foram expressadas como o volume da camada de emulsão em creme em relação ao volume total da amostra. A fração de volume de emulsão (E) foi calculada como segue:

$$E = \frac{\text{Volume de emulsão}}{\text{Volume total de amostra}} \cdot 100 \%$$

A quantidade de material, geralmente amido remanescente, no fundo do tubo de teste, também foi calculada. Consulte tabela 2-1.

A distribuição de tamanho de gota das emulsões foi determinada a partir de imagens de microscópico. O diâmetro de pelo menos 250 gotas foi medido com ImageJ nas amostras que continham gotas que tinham um diâmetro menor que 1,4 mm. O diâmetro de gota médio superficial (D_{32}) e o diâmetro médio de volume (D_{43}) foram calculados com o uso das equações a seguir:

$$D_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n D_i^3}{\sum_{i=1}^n D_i^2} D_{43} = \frac{\sum_{i=1}^n D_i^4}{\sum_{i=1}^n D_i^3}$$

Onde D é o diâmetro medido de uma gota e n é o número total contado. O coeficiente de variação (CV) como percentual e o desvio padrão foram calculados de acordo com as equações abaixo para chegar à distribuição das gotas de emulsão em cada amostra.

$$CV = \frac{\sigma}{D_{32}} \times 100 \quad \text{onde } \sigma = \left[\sum_{i=1}^n \frac{(D_i - D_{32})^2}{n-1} \right]^{1/2}$$

Discussão como resultado do Experimento 3

Amidos

Os amidos selecionados para esse estudo tinham diferentes tamanhos de grânulo, com quinoa como o menor seguido por arroz, milho e cevada, e esses grânulos também tinham diferentes formatos. Os grânulos de amido de cevada eram esferas suavemente conformadas e esferoides achatados com um D_{32} médio de 17 μm , enquanto quinoa, arroz e milho tinham formatos poligonais mais irregulares. Os grânulos de quinoa tinham um D_{32} de aproximadamente 2 μm e tinham bordas lisas, enquanto arroz tinham grânulos com bordas afiadas com um D_{32} de 4,5 e 5,4 μm para arroz ceroso e normal, respectivamente. A milho cerosa e a normal tinham bordas lisas e afiadas de seus grânulos, enquanto a milho com teor elevado de amilose tinham bordas mais lisas e também tinha alguns grânulos com formato de haste. O tamanho médio dos grânulos de milho era de 9,3 μm para milho com alto teor de amilose e 15 μm para as outras duas variedades de milho. O formato dos grânulos foi similar para todos os três grânulos de quinoa: nativo, termotratado e modificado por OSA. No entanto, o tamanho foi aumentado para os grânulos que foram submetidos a um tratamento térmico ou modificação por OSA, que se deu, em parte, a um grau mais elevado de agregação ocasionada pela capacidade hidrofóbica aumentada. Os grânulos de amido de quinoa individuais tinham um tamanho entre 0,7 e 2,2 μm .

O amido tem uma variação natural na composição amilose/amilopectina e as variedades normais têm um teor de amilose de cerca de 20 a 30%. Os amidos cerosos têm um teor muito baixo de amilose e, no presente estudo, as variedades cerosas de arroz, cevada e milho foram usadas. Uma variedade

de mais com um teor elevado de amilose (HylonVII) com amilose a 70% também foi usada a fim de observar o comportamento de emulsificação em um espectro mais amplo do teor de amilose. Mostrou-se que ligação por OSA é não uniforme em escala
5 molecular e é afetada por diferenças na ramificação de moléculas de amido.

A Tabela 2-1 resume as condições de teste usadas e os principais resultados. A cor após vórtice é a medição da estabilidade das gotas formadas já que o corante foi
10 adicionado no topo das amostras após a emulsificação e antes que as amostras fossem misturadas em um vórtice. As gotas estáveis não tinham uma troca com nenhum óleo colorido; por conseguinte, a fase de emulsão permaneceu branca. Uma fase de emulsão com cor vermelha aumentada indicou que as gotas foram
15 menos estabilizadas pelos grânulos de amido de absorção.

O tamanho das gotas está correlacionado à cor e à estabilidade da emulsão. Os grânulos de amido que tinham a capacidade de estabilizar pequenas gotas, também criaram as gotas mais estáveis. Isso depende, principalmente, do tamanho
20 dos grânulos de estabilização, mas também se o formato dos grânulos tinha um impacto. Quinoa, que tinha o menor tamanho de grânulo, apresentou a capacidade mais satisfatória para estabilizar uma emulsão nas circunstâncias usadas nesse estudo. As emulsões foram produzidas independentemente do
25 tratamento e da concentração do amido de quinoa ou do sistema usado (amostra n° 1-10 na tabela 2-1).

A capacidade de emulsificação de quinoa foi definitivamente mais satisfatória, seguida por arroz, que tinha apenas tamanho de grânulo levemente maior, mas os
30 grânulos tinham formato mais irregular com bordas afiadas. A capacidade de emulsificação foi similar para as duas variedades de arroz (amostra n° 11 a 13 e 17 a 18, 20 na tabela 2-1). O mais ceroso e normal tinha grânulos

irregularmente conformados com, que pode ser uma razão para capacidade de estabilização levemente menor de mais comparada à cevada que tinha tamanho de grânulo maior, mas um formato mais liso. Um contato de superfície reduzido de partículas devido à aspereza de superfície ou bordas afiadas tem um impacto negativo no pó de emulsificação, visto que o potencial interfacial diminui. Outra razão foi provavelmente a distribuição de tamanho bimodal da cevada, onde os menores grânulos aumentaram potencialmente a estabilidade de gota e diminuíram o tamanho de gota. Quatro amostras foram produzidas duas vezes; n° 9 (quinoa), 20 (arroz), 31 (mais) e 42 (cevada cerosa) de acordo com a classificação na tabela 2-1. Todos com 200 mg de amido de OSA e tampão com sal como a fase contínua. Quinoa e cevada cerosa, que produziram emulsões estáveis, mostraram capacidade de reprodução satisfatória em relação ao tamanho de gota, fração de sedimento e fração de volume de emulsão, enquanto a capacidade de reprodução dos resultados para arroz e mais foi insatisfatória.

A capacidade de estabilização de mais ceroso e normal foi similar (amostra n° 22 a 24 e 28 a 29, 31 na tabela 2-1), mas o mais com um teor elevado de amilose (HylonVII) mostrou um padrão diferente. As três amostras (n° 33 a 35 na tabela 2-1) apresentaram apenas pequenas disparidades na fração de emulsão e tamanho de gota independente do tratamento dos grânulos de amido. Mostrou-se que os grânulos com formato de haste têm um grande impacto na capacidade de estabilidade e mostraram que partículas longas com uma razão entre aspecto maior que 4 são emulsificantes mais eficazes que partículas menores de molhabilidade similar.

Tratamentos

Todos os amidos nesse estudo foram usados em sua

forma nativa, termotratada e modificada por OSA, respectivamente. Supõe-se que os grânulos de amido nativo sejam ineficazes como estabilizadores de gota de óleo devido à capacidade hidrofóbica baixa, no entanto, quinoa nativa (e, em certa medida, HylonVII) tem a capacidade de estabilizar as gotas formadas. Todos os grânulos de amido têm proteínas ligadas à superfície e, para os pequenos grânulos de quinoa, a superfície grande total de todos os grânulos pode proporcionar capacidade hidrofóbica suficiente para estabilizar gotas, embora as gotas estabilizadas por amido de quinoa nativa sejam maiores que quando os amidos modificados foram usados.

Os amidos termotratados foram, de alguma forma, estabilizadores mais satisfatórios que os amidos nativos visto que a capacidade hidrofóbica das proteínas de superfície aumentou. Especialmente, as gotas estabilizadas por quinoa, arroz e cevada cerosa tiveram um tamanho de gota diminuído. A capacidade hidrofóbica dos grânulos de amido aparentemente aumentou, mas o suficiente para que os grânulos tivessem a capacidade de atuar como estabilizadores a menos quando o tamanho de grânulo foi tão pequeno quanto para quinoa.

Os amidos modificados por OSA tiveram, todos, a capacidade de estabilizar gotas de óleo, mas a utilização dos grânulos não foi completa já que o amido, em alguma medida, sedimentou. O teor de OSA era entre 2,6 e 3,6% para todos os amidos e a quinoa também foi modificada a um grau inferior de 1,8 %. Nenhuma diferença poderia ser observada entre as amostras de quinoa com os dois graus de OSA em relação ao tamanho de gota, fração de volume de emulsão ou estabilidade, que indicou que a ligação de OSA de 1,8% proporcionou capacidade hidrofóbica de superfície de grânulo suficiente para estabilizar uma emulsão. O amido modificado com OSA a 3%

está comercialmente disponível e aprovado como um aditivo alimentar.

Fase contínua

Dois tampões de fosfato diferentes, com e sem NaCl a 0,2M, foram usados como fase contínua e o pH foi 7 em ambos os tampões. A diferença no padrão de formação de gota foi considerável entre tampões com ou sem sal. A diferença estava aparente tanto em nível macro- quanto microscópico para os grânulos de amido hidrofobicamente modificados, mas não para os grânulos nativos.

Quando uma fase contínua sem sal foi usada, as emulsões apresentaram formatos cônicos distintos formados pela ponta de tubos de teste, indicando uma camada de emulsão reticulada com um estresse de rendimento, no entanto, esse formato era menos óbvio na presença de sal. Além disso, a fração de volume da emulsão era maior e o sedimento de amido era menor nos sistemas sem sal. A distribuição de tamanho de gota também apresentou natureza diferente onde as emulsões sem sal apresentaram distribuições de tamanho de gota bimodal com um CV grande (74 a 85%) e as gotas nas emulsões contendo sal apresentam uma distribuição mais unimodal com um CV de aproximadamente 40%. Essas observações pode, em uma grande medida, ser explicadas pelo comportamento de formação de gota. Na ausência de sal, as gotas de emulsão formaram uma rede aberta mais rígida de agrupamentos de gotas e grânulo. Enquanto nos sistemas com sal, as gotas eram estabilizadas de modo menos eficaz e coalescidas em um tamanho maior uniforme sem agregação significativa. As emulsões estabilizadas por amido nativo não foram afetadas pela presença d sal.

Concentração de amido

O efeito de concentração de amido em emulsificação foi estudado em quatro variedades e amido: quinoa, arroz, mais e cevada cerosa, todos os quais foram modificados por

OSA e em um tampão de fosfato de NaCl a 0,2 M. Essas condições foram usadas já que os mesmos apresentavam o resultado de emulsificação mais satisfatório em estudos de varredura inicial, e as emulsões com sal apresentaram 5 distribuição mais uniforme de tamanhos de gotícula e não foram gelatinizadas. A massa do amido adicionado era 100, 200 e 400 mg, que corresponde a aproximadamente 3,2, 6,2, e 11,8 % em volume do óleo (ou 1,1 , 2,2 e 3,9 % em volume do sistema total), respectivamente. O tamanho de gota foi 10 diminuído e a fração de volume da fase de emulsão foi aumentada enquanto a concentração dos grânulos de amido foi aumentada conforme pode ser observado para a amostra n° 8 a 10 (quinoa), 19 a 21 (arroz), 30 a 32 (maís) e 41 a 43 (cevada cerosa) na tabela 2-1.

15 Foi anteriormente mostrado que o tamanho médio de gota de emulsões estabilizadas por partículas sólidas diminui com a crescente concentração de partícula já que mais partículas estão disponíveis para estabilizar gotas menores. No entanto, cada sistema te, provavelmente, um tamanho de 20 gota limitador, que depende das propriedades físicas e mecânicas do sistema (isto é, o tamanho das partículas e o método de emulsificação) e, quando esse tamanho de gota é alcançado, todo excesso de partículas estará na fase contínua. No estudo atual, as amostras com a quantidade de 25 amido mais elevada produziram emulsões com uma densidade superior à fase contínua. O tamanho de gota diminuiu e a quantidade de amido ficada à superfície das gotas aumentou conforme a concentração de amido foi aumentada, que resultou em emulsão mais estável. Outro efeito da alta concentração de 30 amido foi que a quantidade de grânulos de amido entre as gotas aumentou. Isso resultou em um aumento da densidade total das gotas e da fase de emulsão.

É interessante observar que mesmo em baixas (100

mg) concentrações de amido, houve sedimento de grânulos no fundo dos tubos de teste. Na realidade, a fração de sedimento de amido diminuiu quando a quantidade de amido foi aumentada de 100 a 200 mg. As gotas formadas em uma concentração inferior de grânulos de amido foram menos cobertas pelos grânulos e mais submetidas à coalescência, que grânulos dessorvidos da superfície das gotas maiores. No entanto, mostrou-se que emulsões Pickering eram estabilizadas consideravelmente mesmo quando sílica (0,5 a 0,8 μm) ou partículas de esporo ($\sim 25 \mu\text{m}$) eram distribuídas de modo altamente desigual na superfície das gotas. A emulsão também era menos densa em uma concentração de grânulo de amido baixa, o que significa que a mobilidade das gotas e dos grânulos promoveu a sedimentação dos grânulos não dessorvidos na fase contínua.

Tamanho de grânulo de amido

Para quantificar os efeitos da quantidade de amido adicionado e do tamanho de grânulo, estimou-se a cobertura de superfície máxima possível para concentração de amido com um dado tamanho de partícula. As suposições realizadas foram que todas as gotas teriam tamanho idêntico e todas as partículas de amido são idênticas, esféricas e estão fixadas à interface de óleo e água a um ângulo de contato de 90° com uma fração de embalagem interfacial $\varphi = 0,907$ isto é, embalagem hexagonal. A cobertura máxima teórica, T_M , é estimada com o uso da equação a seguir:

$$\Gamma_M = \rho_{sg} \frac{2}{3} d_{sg} \varphi \cdot 10^6$$

onde d_{sg} é o diâmetro médio de superfície do grânulo de amido, ρ_{sg} é a densidade de amido (1.550 kg/m^3) e φ é a densidade de embalagem. Estimativas da cobertura de superfície máxima, bem como os tamanhos médios de grânulo de

amido para os vários amidos são fornecidos na Tabela 2-2. Visto que a cobertura de superfície (mg/m^2) aumenta com o tamanho de grânulo de amido, não é surpreendente que o diâmetro de gota gerado na figura 2-1 diminua com o

5 decrescente tamanho de grânulo já que mais área é coberta por massa de unidade com grânulos menores.

A área de superfície específica de uma emulsão, por volume de fase dispersada é definida por:

$$S \equiv \frac{\epsilon}{d_{32}}$$

10 e onde ϵ é o diâmetro médio de superfície d_{32} medido pela dispersão de luz. Com base na quantidade de amido adicionado, C_{sg} (como mg por ml) e a cobertura máxima teórica, Γ_M , do dado tamanho de grânulos de amido, pode ser calculada uma área de superfície teórica que poderia ser

15 gerada por volume de rama dispersada, isto é:

$$S \equiv \frac{\epsilon}{d_{32}} \approx \frac{C_{sg}}{\Gamma_M}$$

Uma comparação das áreas de superfície de gota calculadas e medidas é mapeada na Figura 2-2 e ilustra acordo muito bom entre essas estimativas e as amido medido

20 estabiliza as gotas apesar das suposições bastante grosseiras nos cálculos. Amidos acima da linha na Figura 2-2 têm uma área de gota maior que o previsto e aqueles abaixo da linha têm uma menor. Uma explicação física das áreas de gota maiores é que a suposição de pacote fechado hexagonal

25 superestima a quantidade de amido na superfície e que é possível ter menos amido por área de unidade e ainda alcança estabilização das gotas.

Poderia ser argumentado por análise geométrica que conforme a razão de tamanho de grânulo de amido para formar o

30 tamanho de gota aumenta, a cobertura de superfície mínima

exigida para estabilizar as gotas diminui, uma vez que espaços maiores entre os grânulos na superfície são possíveis enquanto mantém o suficiente de um estérico, dificulta impedir a coalescência. Por essa razão, os grânulos de amido maiores, tais como cevada e milho, têm uma área de superfície maior que o previsto e a tendência aumenta com a área crescente (isto é, tamanhos de gota menores). Observações microscópicas confirmam isso, mostrando espaços maiores e vãos na superfície de gotas entre amido adsorvido. No caso de arroz, o mesmo tem uma área gerada menor que o que é previsto (pontos de dados estão abaixo da linha na Figura 2-2). Nas imagens microscópicas das emulsões de arroz, apareceram mais grânulos de amido livres na fase contínua e um aumento notável na quantidade de sedimento.

15 Conclusões em vista do Experimento 3

Esse experimento de triagem, na capacidade emulsificante de um espectro amplo de amidos em sua forma granular, revelou que grânulos de amido intactos de modo eficaz pode estabilizar gotas de óleo em uma emulsão. Dentre os amidos diferentes que foram examinados, o amido de quinoa teve a melhor capacidade proeminente para agir como um estabilizador, provavelmente por causa do tamanho de grânulo pequeno. Amido de quinoa foi capaz de estabilizar as gotas mesmo em seu estado nativo, embora os grânulos termotratados e, acima de tudo, os modificados por OSA foram mais eficientes, que foi demonstrado pelo tamanho de gota menor e estabilidade de gota aumentada. Todos os amidos modificados por OSA usados nesse estudo poderiam estabilizar as gotas e o diâmetro de gota diminuído com o tamanho dos grânulos. O tamanho de gota também foi diminuído aumentando-se a concentração dos grânulos de amido. O impacto de concentração de sal na capacidade emulsificante foi estudado no intuito de simular as condições de sistemas de alimento diferentes e

outros produtos com base em emulsões. Sistemas sem sal produziram emulsões rígidas muito estáveis com gotas agregadas com uma distribuição de tamanho de gota bimodal.

Embora o tamanho dos grânulos de amido estabilizados com gotas de emulsão foi relativamente grande, as gotas podem ser adequadas para encapsulação de ingredientes valiosos em produtos farmacêuticos e alimentares.

10 Tabela 2-1. Resumo dos resultados e condições experimentais

Amostr a n°	Origem de amido	Tratamen to do amido	Fase cont ínua	Amid o adic iona do (mg)	Cor apó s vór tice (0 a 4) ^a	Fraç ão de volu me de emul são 6 dias após vórt ice	Sedi ment o (mm ³ / mg) ^b	Tamanho de gota 6 dias após vórtice		
								Conc. de sal	D ₍₃₂₎ (µm)	D ₍₄₃₎ (µm)
1	Quinoa	Nativo	Sem sal	200	1	0,67	0,46	140	150	45
2	Quinoa	Aquecido	Sem sal	200	1	0,82	0,075	100	120	85
3	Quinoa	OSA 1,8%	Sem sal	200	0	0,87	0	74	81	74
4	Quinoa	OSA 2,9%	0,2 M de NaCl	200	0	0,94	0	74	87	77
5	Quinoa	Nativo	0,2 M de NaCl	200	1	0,60	0,35	320	370	46
6	Quinoa	Aquecido	0,2 M de NaCl	200	1	0,68	0,31	160	170	41
7	Quin	OSA 1,8%	0,2 M de	200	0	0,78	0,015	76	79	40

	oa		NaCl							
8	Quinoa	OSA 2,9%	0,2 M de NaCl	100	1	0,58	0,32	270	290	32
9	Quinoa	OSA 2,9%	0,2 M de NaCl	200	1	0,77 /0,7 4 ^c	0,03 /0,0 2 ^c	100/ 110 ^c	110/ 120 ^c	37 /3 7 ^c
10	Quinoa	OSA 2,9%	0,2 M de NaCl	400	0	1,00	n.v.	52	55	42
11	Arroz Wx	Nativo	0,2 M de NaCl	200	4	0,40	2,3	>1 mm	>1 mm	-
12	Arroz Wx	Aquecido	0,2 M de NaCl	200	4	0,44	2,0	>1 mm	>1 mm	-
13	Arroz Wx	OSA 3,8%	0,2 M de NaCl	200	2	0,59	0,55	440	500	42
14	Arroz	Nativo	Sem sal	200	4	0,45	2,1	>1 mm	>1 mm	-
15	Arroz	Aquecido	Sem sal	200	2	0,50	1,2	150	200	79
16	Arroz	OSA 2,8%	Sem sal	200	1	0,75	0,12	100	170	70
17	Arroz	Nativo	0,2 M de NaCl	200	4	0,42	1,7	>1 mm	>1 mm	-
18	Arroz	Aquecido	0,2 M de NaCl	200	3	0,46	1,7	530	590	71
19	Arroz	OSA 2,8%	0,2 M de NaCl	100	3	0,55	1,3	550	630	41
20	Arroz	OSA 2,8%	0,2 M de NaCl	200	2	0,55 /0,6 2 ^c	0,70 /0,3 3 ^c	530/ 350 ^c	560/ 440 ^c	75 /6 3 ^c
21	Arroz	OSA 2,8%	0,2 M de NaCl	400	2	0,85	n.v.	200	310	71
22	Maís	Nativo	0,2 M de	200	4	0,38	1,5	Sem gota	Sem gota	-

	Wx		NaCl					s	s	
23	Ma ís Wx	Aque cido	0,2 M de NaCl	200	4	0,39	1,9	Sem gota s	Sem gota s	-
24	Ma ís Wx	OSA 3,3%	0,2 M de NaCl	200	3	0,64	0,15	500	540	38
25	Ma ís	Nati vo	Sem sal	200	4	0,34	1,5	Sem gota s	Sem gota s	-
26	Ma ís	Aque cido	Sem sal	200	4	0,29	3,7	Sem gota s	Sem gota s	-
27	Ma ís	OSA 2,6%	Sem sal	200	2	0,69	1,0	420	470	57
28	Ma ís	Nati vo	0,2 M de NaCl	200	4	0,38	1,2	Sem gota s	Sem gota s	-
29	Ma ís	Aque cido	0,2 M de NaCl	200	4	0,38	1,5	Sem gota s	Sem gota s	-
30	Ma ís	OSA 2,6%	0,2 M de NaCl	100	3	0,53	0,27	1.30 0	1.40 0	26
31	Ma ís	OSA 2,6%	0,2 M de NaCl	200	3	0,50 /0,5 9 ^c	0,65 /0,1 4 ^c	1.30 0/72 0 ^c	1.40 0/75 0 ^c	30 /2 9 ^c
32	Ma ís	OSA 2,6%	0,2 M de NaCl	400	2	0,81	n.v.	290	300	34
33	Ma ís de AM alto	Nati vo	0,2 M de NaCl	200	3	0,48	1,2	980	>1 mm	51
34	Ma ís de AM alto	Aque cido	0,2 M de NaCl	200	3	0,52	1,1	830	880	40
35	Ma ís de AM alto	OSA 3,1%	0,2 M de NaCl	200	3	0,54	0,90	710	750	27

36	Ce va da Wx	Nati vo	Sem sal	200	4	0,42	1,3	>1 mm	>1 mm	-
37	Ce va da Wx	Aque cido	Sem sal	200	3	0,51	1,2	>1 mm	>1 mm	-
38	Ce va da Wx	OSA 3,6%	Sem sal	200	2	0,76	0,04 0	370	460	65
39	Ce va da Wx	Nati vo	0,2 M de NaCl	200	4	0,38	1,3	>1 mm	>1 mm	-
40	Ce va da Wx	Aque cido	0,2 M de NaCl	200	3	0,50	0,90	890	930	41
41	Ce va da Wx	OSA 3,6%	0,2 M de NaCl	100	3	0,54	0,65	1.20 0	1.40 0	32
42	Ce va da Wx	OSA 3,6%	0,2 M de NaCl	200	2	0,58 /0,6 0 ^c	0,27 /0,2 2 ^c	690/ 670 ^c	720/ 700 ^c	27 /2 7 ^c
43	Ce va da Wx	OSA 3,6%	0,2 M de NaCl	400	2	0,80	n.v.	270	300	34

^a 0 = fase de emulsão branca que não foi colorida por Solvente Vermelho, 4 = emulsão vermelha ou fase oleosa que foi completamente colorida por Solvente Vermelho, 1 a 3 = grau crescente de fase de emulsão colorida de vermelho.

5 ^b Razão de volume de sedimento para amido adicionado.

^c Resultados replicáveis de duas amostras diferentes.

10 n.v. Não visível. A fase de emulsão cobre o fundo do tubo de teste e qualquer sedimento remanescente no fundo não é visível.

Tabela 2-2. Tamanhos de partícula e cobertura de superfície máxima para grânulos de amido.

Amido	D ₁₀ [µm]	D ₃₂ [µm]	D ₄₃ [µm]	r _M [mg m ⁻²] ^a
Quinoa nativa	1,14	1,7	2,51	1.590
Quinoa aquecida	1,33	2,23	3,38	2.090
Quinoa de OSA	1,34	2,27	3,45	2.130
Arroz de OSA	3,45	4,46	5,25	4.180
Arroz Ceroso de OSA	3,57	5,38	7,46	5.040
Hylon VII de OSA	7,07	9,32	11,1	8.740
Mais cerosa de OSA	9,54	14,7	18,0	13.800
Mais de OSA	11,3	14,9	17,1	14.000
Cevada Cerosa de OSA	7,49	17,5	24,2	16.400

Experimento 4

No experimento 4, emulsões com o uso de uma variedade de óleos e gorduras foram feitas, como as propriedades físicas da fase dispersada variam dependente do tipo de óleo. Óleos que foram usados como a fase dispersada incluem: Miglyol 812, óleo de soja (natural e purificado com AI203), óleo de colza, óleo de parafina, manteiga de castanha (sólida em temperatura ambiente), óleo de castanha, Bassol C, tributirato de glicerila e hexadecano. Amido granular pequeno modificado por OSA, como descrito no experimento 1, foi usado como partículas de estabilização de gota. As emulsões foram preparadas como descrito no experimento 1 com a exceção de gorduras sólidas que foram derretidas antes da homogeneização de alto cisalhamento.

Efeito de fase dispersada

Emulsões foram criadas com sucesso com todos os

óleos diferentes usados. No entanto, a superfície das gotas de óleo de tributirato foi esparsamente ocupada pelos grânulos de amido. Isso é provavelmente devido à alta solubilidade do tributirato em água.

5 Conclusões em vista do Experimento 4

A estabilização de gotas de óleo com grânulos de amido é eficaz ao longo de uma faixa ampla de óleos. Isso é de impacto prático como a mesma indicou um sistema robusto que não é particularmente sensível ao tipo de óleo usado, sendo aplicável, assim, em uma faixa ampla produtos técnicos, farmacêuticos, alimentícios e cosméticos.

10 Experimento 5

No experimento 5, emulsões com o uso de técnicas de processamento diferentes foram feitas, sendo que o propósito foi para demonstrar que as emulsões estabilizadas por grânulo de amido podem ser feitas com o uso de uma variedade de métodos.

A fase oleosa nesse experimento era de Bassol C (AAK, Suécia), os grânulos de amido foram isolados de quinoa e feitos mais hidrofóbicos por modificação de OSA em 2,9% (como descrito no experimento 2), e a fase contínua era de 5 mM de tampão de Fosfato em pH 7 e 0,2 M de NaCl. Quatro amostras foram pesadas como se segue: 3,50 g de grânulos de amido foram adicionados a 59,5 g tampão de fosfato e, então, 7,00 g de Bassol C foram adicionados e agitados antes da homogeneização. Cada amostra foi feita por um método de homogeneização diferente. A amostra 1 foi feita com o uso de um Misturador Sorvall Omni de 3.200 rpm (nível 2) por 5 minutos. A amostra 2 foi feita com o uso de um Misturador Sorvall Omni de 12.800 rpm (nível 8) por 5 minutos. A amostra 3 foi feita em um homogeneizador de pressão alta de escala laboratorial (HPH) de 40 bar e todo o volume foi passado através do HPH 10 vezes. A amostra 4 foi feita em uma bomba

peristáltica Masterflex operada em 350 ml/min e todo o volume passado através da bomba no laço de circulação por um total de 300 vezes.

As emulsões foram diluídas aproximadamente 5 vezes com a mesma solução de tampão como na fase contínua antes que as mesmas foram analisadas. Distribuições de Tamanho de Gotícula das emulsões foram determinadas pelo uso de um analisador de partícula de difração a laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments). A dispersão foi diluída no instrumento para alcançar uma ofuscação de 8 a 12%. A distribuição de tamanho foi calculada a partir da teoria de Mie com o uso de um índice refratário de amido de 1,54. As emulsões também foram investigadas com o uso de um microscópio óptico (Olympus BX50, Japão) equipado com uma câmara de vídeo digital.

Resultados do Experimento 5

Emulsões poderiam ser criadas com o uso de todos os quatro métodos de emulsificação. Com base na quantidade de amido adicionada (500 mg/mg de óleo), um intervalo de tamanho de gotícula de 26 a 33 μm (D_{43}) foi esperado. Isso foi observado nas amostras misturadas de sorvall e naquela preparada na bomba peristáltica. A amostra preparada no homogeneizador de pressão alta foi submetida a um tratamento mecânico muito maior e, por essa razão, as gotículas foram muito menores, mas também foram floculadas em estruturas de cerca de 100 μm em tamanho. Isso pode ser devido a que não houve amido suficiente para cobrir a área de superfície alta de óleo gerado no homogeneizador e as gotículas de óleo compartilharam partículas de amido, gerando a microestrutura observada. Média de tamanhos de gota medida, micrográficos de gotas, e imagens de aparência de emulsão em geral são encontradas na tabela 3-1.

Tabela 3-1 - resume as condições para a Figura 3-1.

<p>A Figura 3-1 mais superior</p> <p>S sorvall nível 2 com 10% Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9% 300 (ampliação de 100X)</p> <p>$D_{32} = 7,873 \mu\text{m}$ $D_{43} = 26,07 \mu\text{m}$ Modo = 19,27 μm</p> <p>Emulsão de preenchimento de espaço liso</p>	<p>A segunda Figura 3-1 mais superior</p> <p>S sorvall nível 8 com 10% Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9% 300 (ampliação de 100X)</p> <p>$D_{32} = 10,08 \mu\text{m}$ $D_{43} = 27,18 \mu\text{m}$ Modo = 26,58 μm</p> <p>Devido a rpms maiores, mais ar foi engolfado, por isso a emulsão boiou. Tamanho de gotícula medido similar ao nível 2.</p>
<p>A segunda Figura 3-1 mais inferior</p> <p>HPH com 10% Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9% (ampliação de 100X)</p> <p>$D_{32} = 79,08 \mu\text{m}$ $D_{43} = 102,8 \mu\text{m}$ Modo = 96,15 μm</p> <p>Intensidade maior de HPH cria gotas menores que existem como flocos vistos na imagem a direita, que medem cerca de 100 μm em tamanho em dispersão de luz</p>	<p>A Figura 3-1 mais inferior</p> <p>Bomba com 10% Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9% (ampliação de 100X)</p> <p>$D_{32} = 5,959 \mu\text{m}$ $D_{43} = 31,104 \mu\text{m}$ Modo = 53,93 μm</p> <p>Intensidade menor proporciona gotículas maiores, mas aparência mais lisa. Também foi observado mais amido livre.</p>

Conclusões em vista do Experimento 5

Esse experimento mostrou que é possível usar uma variedade de métodos de emulsificação mecânica para gerar emulsões estabilizadas por grânulo de amido. Isso indica um sistema robusto que poderia ser aplicado em uma variedade de produtos e processos diferentes em uma faixa de aplicações que foi fornecida (Figura 3).

Experimento 6

Alimentos e outros sistemas de emulsão têm uma grande variedade em pH e concentração de sal. Portanto, emulsificação com fases contínuas com pH de 4 a 7 e

concentrações de sal de 0,1 a 2 M de NaCl e 0,2 M de CaCl₂ foi estudada.

A fase dispersada era de Miglyol 812, grânulos de amido granulares pequenos, como descrito no experimento 1, foram usados como partículas de estabilização de gota e a fase contínua era de 5 mM de tampão de fosfato ou água milliQ em pH variante e quantidades de sais adicionados. As emulsões foram preparadas como no experimento 1.

Efeito de fase contínua

A concentração de sal foi variada em pH 7 e o pH foi variado em uma concentração de sal de 0,1 M de NaCl. Em outra amostra, 0,1 M de CaCl₂ em água MilliQ foi usado como fase contínua. Ambos o pH e a concentração de sal não tiveram qualquer efeito significativo na fração de volume ou na média de tamanho de gota da emulsão. No entanto, os resultados do experimento 3 mostraram que há uma diferença na rede de emulsão entre os sistemas com e sem sal.

Conclusões em vista do Experimento 6

Uma estabilização de gotas de óleo com grânulos de amido é eficiente independente do pH e da concentração de sal da fase contínua. Isso indica um sistema muito robusto que irá ter aplicações em uma variedade ampla de produtos.

Experimento 7

Nesse experimento, emulsões com teores de fase oleosa diferente foram preparadas para testar sua estabilidade durante armazenamento e propriedades reológicas, duas propriedades que são importantes em uma variedade de aplicações de emulsão. Para determinar a estabilidade das emulsões, emulsões neutras de flutuabilidade, isto é, as gotas de óleo cobertas com amido tiveram aproximadamente a mesma densidade que a fase contínua, foram preparadas. As frações de volume de óleo foram de 12,5, 16,6, 25,0 e 33,3%, a razão de amido para óleo foi constante em 214 mg de

amido/ml de óleo e o volume total das amostras era de 7 ml. Amido granular pequeno isolado e modificado por OSA para 1,8% como descrito no experimento 2.

5 A fase contínua das emulsões era de um 5 mM de tampão de fosfato com pH 7 e 0,2 M de NaCl (densidade de 1.009,6 kg/m³ em 20 °C), a fase dispersada era de Miglyol 812 (densidade de 945 kg/m³ em 20 °C, Sasol GmbH, Alemanha). As emulsões foram feitas por mistura de alto cisalhamento em um misturador de Ystral X10 com ferramenta de dispersão de 6 mm
10 (Ystral GmbH, Alemanha) em 22.000 rpm por 30 s.

Estabilidade de Armazenamento

As amostras foram armazenadas em tubos de teste vedados em 5 °C por 1 dia, 1, 2, 4 e 8 semanas antes das medições de tamanho de gota (com o uso de difração a laser
15 Coulter LS 130, descrito no experimento de método 2) e a determinação de frações de volume de fotografias (experimento de método 2).

Medições de reologia

O módulo elástico e o ângulo de fase das amostras armazenadas por 8 semanas foram medidos com o uso de uma varredura de estresse de oscilação, 20 s em cada amplitude
20 (Kinexus, Malvern, Reino Unido). A frequência era de 1 Hz. Um sistema de cone e placa com um diâmetro de 40 mm e um ângulo de cone de 4 graus foi usado.

Resultados de Estabilidade de armazenamento

O tamanho de gota foi determinado e o índice de emulsão foi calculado em intervalos de 5 momentos entre 1 dia e 8 semanas de armazenamento. O tamanho de gota mostrou nenhuma diferença significativa, a concentração de óleo e o
30 tempo de armazenamento também não mostraram diferença significativa. O tamanho de gota (D₄₃) era de entre 34 e 39 µm para todas as amostras. Dessa forma, as gotas estavam estáveis ao longo do tempo e não foram suscetíveis a

coalescência, floculação irreversível ou maturação de Ostwald; sendo que o último é improvável nesse sistema devido aos tamanhos de gota relativamente grandes e solubilidade baixa de Miglyol em água.

5 O índice de emulsão (EI, como definido no experimento 2) aumentou, como esperado, com a concentração de óleo (Figura 4-1). O EI era próximo de 1 para as amostras com 33,3% de óleo, isto é, a fase de emulsão ocupou quase toda a amostra. O EI teve uma tendência a aumentar com o tempo de
10 armazenamento, pelo menos para as primeiras quatro semanas, devido às densidades correspondentes para as gotas e a fase contínua. Durante as 8 semanas de armazenamento, as gotas de emulsão estavam estáveis para coalescência e o volume ocluído pela fase de emulsão não foi afetado ou até mesmo aumento.
15 Nenhuma diferença significativa na média de diâmetro de gota ao longo do tempo ou dentre as concentrações, mesmo após armazenamento de 8 semanas em 5 °C.

Resultados de Reologia

As medições de reologia confirmaram as diferenças
20 observadas na estrutura das emulsões devido à variação das frações de volume de fase dispersada. Na Figura 4-2 o módulo elástico é mapeado como uma função de estresse de cisalhamento complexo. Há uma região elástica linear curta seguida por uma diminuição rápida em estresses de ~1 Pa ou
25 menos, o que indica que as amostras têm uma estrutura de gel fraca. O módulo elástico G' é uma medida da quantidade de energia do estresse por cisalhamento de oscilação que pode ser armazenada na estrutura de amostras, e é uma função da força e do número de interações entre os componentes das
30 emulsões. Como poderia ser esperado, quanto maior a concentração de óleo, maior o módulo elástico, como houve mais material de interação.

Conforme o estresse por cisalhamento foi aumentado,

a estrutura eventualmente se quebrou, que foi mostrado pela alteração no ângulo de fase. Em estresses por cisalhamento baixos, as amostras tiveram ângulos de fase menores que 45° , isto é, as amostras exibiram comportamento mais elástico.

5 Conforme o estresse por cisalhamento foi aumentado ao ponto de que os géis fracos começaram a fluir, o ângulo de fase aumentado para maior que 45° indicaram um comportamento mais semelhante a líquido nas amostras. A Tabela 4-2 mostra que quanto maior a concentração de óleo, mais o estresse por
10 cisalhamento poderia ser aumentado antes que a estrutura de gel nas emulsões fosse reduzida a um comportamento semelhante a líquido.

Conclusões em vista do Experimento 7

Foi verificado que as emulsões resultantes estão
15 estáveis durante o armazenamento (pelo menos 8 semanas), apesar de seu tamanho de gota grande. As medições reológicas mostraram uma estrutura de gel fraca. Isso é importante em muitas aplicações em que um indivíduo quer ser capaz de escolher uma consistência final com base na receita de
20 emulsão. Adicionalmente, devido à molhabilidade dupla parcial de partículas adequada para estabilizar emulsões, a gotícula estabilizada de partícula e os grânulos de amido livres tendem a formar agregados fracos que proporcionam aos mesmos uma consistência mais semelhante a gel. Isso é importante em
25 muitas aplicações em que produtos mais espessos, tais como cremes, são desejáveis; e no presente caso, nenhum modificador de viscosidade adicional é exigido para alcançar uma consistência semelhante a gel.

Tabela 4-1: Média de diâmetro de gotícula de
30 emulsões estabilizadas por grânulo de amido antes e após o armazenamento.

Média de diâmetro de gotícula D_{43} [μm]

<u>Teor de óleo</u>	<u>1 dia</u>	<u>8 semanas de armazenamento a 5 °C</u>
12,5%	36,6±1,98	37,2±0,735
16,6%	36,9±0,240	37,1±0,219
25,0%	35,9±0,156	34,6±0,014
33,3%	36,4±2,16	35,2±0,502

Tabela 4-2. Valores de estresse por cisalhamento na alteração de fase de gel para líquido (ângulo de fase 45°).

<u>Concentração de óleo</u>	<u>Estresse por cisalhamento em 45 graus (Pa)</u>
12,5%	0,287
16,6%	0,334
25,0%	0,480
33,3%	1,10

Experimento 8

O objetivo era estudar a inversão de fase de emulsões estabilizadas por grânulo de amido e para identificar condições relevantes para formulação de cremes tópicos.

Métodos

Emulsões foram produzidas com o uso de Miglyol 812, 5 mM de tampão de fosfato pH 7 e 0,2 M de NaCl, Quinoa, OSA 1,8%. Amostras foram misturadas em 22.000 rpm por 60 s. O volume total era de 7 ml e cada experimento foi realizado em triplicatas. A concentração de óleo e as concentrações de amido foram variadas como descrito na tabela 6-1. As amostras L a M também foram centrifugadas no intuito de avaliar a estabilidade e para simular 8 semanas de armazenamento. A centrifugação foi realizada em 1.000 g por 81 min em temperatura ambiente (21 °C).

Adicionalmente a esses experimentos, dois outros óleos, parafina e óleo de carité, foram usados para produzir emulsões em condições que correspondem à amostra M. Em um teste de classificação sensorial cego, 9 voluntários

avaliaram os parâmetros de consistência e aplicabilidade dessas emulsões e dois produtos comerciais (Vaselina e uma loção para a pele).

Inversão de fase

5 As amostras contendo 70% de óleo eram emulsões de água em óleo em todas as concentrações de amido, enquanto que em concentrações de óleo menores, as emulsões de óleo em água foram formadas (tabela 5-1).

Condições relevantes para formulação de cremes

10 Em concentrações de óleo de 56% ou 41%, a consistência em termos de espessura e homogeneidade do sistema foi bem adequada para aplicações de creme tópico. Após a centrifugação, as amostras M e N tiveram uma separação de fase desprezível, em quanto que a amostra L era levemente
15 separada. O tamanho de gotícula de emulsão aumentou de 52,0 para 62,2 μm para a amostra L e de 33,0 para 37,3 μm para a amostra N, e não foi afetado para a amostra M (40,8 antes e 40,5 μm após a centrifugação). Quando óleos diferentes foram testados, o óleo de carité que teve propriedades semelhantes
20 a sólido em temperatura ambiente produziram uma emulsão com consistência bem espessa, enquanto que Miglyol e parafina produziram emulsões que eram mais escorregadias e levemente aguadas. A parafina contendo emulsão (maior classificação por 1 pessoa de teste) foi mais bem aceita que a emulsão de
25 Miglyol, e a emulsão de óleo de carité foi classificada como a melhor por 2 voluntários. Os produtos comerciais foram classificados como melhor por 2 (Vaselina) e 4 (loção para a pele) voluntários, respectivamente. Isso certamente não é surpreendente como os mesmos contêm outros ingredientes
30 agradáveis, tal como perfume.

Conclusões em vista do Experimento 8

As amostras contendo 70% de óleo ou mais eram emulsões de água em óleo em todas as concentrações de amido,

enquanto que, em menos concentrações de óleo, emulsões de óleo em água foram formadas (tabela 5-1). Em concentrações de óleo de 56%, a consistência em termos de espessura e homogeneidade do sistema foi considerada como bem adequada para aplicações de creme tópico. Nessas condições, a estabilidade para condições de armazenamento forçado e cisalhamento durante centrifugação foi desprezível. Dentro os óleos usados em 56% e concentração de amido de 214 mg/ml de óleo, todos produziram cremes muito bem aceitados. As emulsões contendo Miglyol ou parafina foram bem similares, embora parafina tenha sido mais bem aceita que Miglyol como fase oleosa. A emulsão de óleo de carité foi mais semelhante a sólido e classificada maior que os produtos comerciais por algumas pessoas de teste.

15 Tabela 5-1. Composições de tamanho de gotícula de emulsão e amostras

Amostra	Amido [mg]	Óleo [mg]	Tampão [mg]	Óleo [%]	Amido [mg/ml de óleo]	Fase contínua	Tamanho de gotícula D ₄₃ [µm]
A	400	1.890	4.710	27	200,0	Água	35,7
B	400	2.890	3.710	41	130,8	Água	51,7
C	400	3.890	2.710	56	97,2	Água	61,1
D	400	4.890	1.710	70	77,3	Óleo	64,1
E	400	5.890	710	84	64,2	Óleo	54,5*
F	200	2.890	3.910	41	65,4	Água	64,6
G	200	3.890	2.910	56	48,6	Água	73,9
H	200	4.890	1.910	70	38,7	Óleo	55,5
I	600	2.890	3.510	41	196,2	Água	31,7
J	600	3.890	2.510	56	145,8	Água	43,5
K	600	4.890	1.510	70	116,0	Óleo	58,9
L	400	3.890	2.710	56	97,2	Água	52,0
M	856	3.890	2.254	56	214	Água	40,8
N	642	2.890	3.468	41	214	Água	33,0

*Medido por micrográficos (todas as outras amostras foram medidas com o uso de Coulter LS130)

Experimento 9

20 No experimento 9, a permeabilidade aprimorada de um

produto químico lipofílico na pele pelo uso de emulsões estabilizadas por grânulo de amido foi estudada.

Métodos

Emulsões foram produzidas com o uso de 5 mM de tampão de fosfato pH 7 e 0,2 M de NaCl, Quinoa, OSA 1,8% e Miglyol 812, parafina ou óleo de carité. Amostras foram misturadas em 22.000 rpm por 60 s. As emulsões continham 56% de óleo e 214 mg de amido/ml de óleo (correspondente à amostra M no experimento 8). O volume total era de 7 ml e cada experimento foi realizado em triplicatas. Salicilato de metila, dissolvido na fase oleosa, foi usado como substância de controle para estudar a permeabilidade na pele.

A medição de difusão de pele foi realizada em uma célula de fluxo monitorando-se o transporte de salicilato de metila das três formulações tópicas diferentes através de membrana de pele de porco e membrana de silicone sob um fluxo de tampão de fosfato com pH 6,8. Os experimentos de difusão foram realizados em células de difusão de sete câmaras em 32 °C e a fase de doador e de receptor foram separadas por uma membrana com uma área de difusão de 0,64 cm² (9 mm Ø). Cerca de 1 g das emulsões (fase de doador) foi espalhada de modo uniforme nas membranas. As células foram cobertas com parafilme para evitar evaporação. O tampão fluiu através da bomba (IsmatecIPN-16, L852) com um fluxo de 2 ml/h. Amostras foram coletadas a cada duas horas durante 12 horas e foram analisadas com o uso de um espectrofotômetro (Varian Carry 50Bio) no comprimento de onda de detecção para salicilato de metila (302 nm).

Penetração de pele *in vitro*

Durante a penetração de pele *in vitro*, o fluxo de estado estável era de cerca de 8 µg/(cm²*h) para todas as três formulações. Esse fluxo é quase duas vezes maior que o que foi anteriormente observado em uma configuração

experimental similar com o uso de soluções de tampão da mesma concentração de salicilato de metila. Isso indica que foi a presença do sistema de emulsão que aumento a penetração através da pele. Inicialmente, o fluxo de penetração diminuiu com o tempo (Figura 5-1), que poderia ser devido ao esgotamento das gotículas de óleo mais próximas à pele. Em sistemas de viscosidade alta como o usado, a difusão das gotículas de óleo é dificultada e, assim, haverá um gradiente de concentração e uma região de estado estável formados.

10 Conclusões em vista do Experimento 9

Não houve diferenças na penetração de pele *in vitro* entre os três óleos usados, o que indica que o sistema, como tal, forneceu a penetração bem alta de $8 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$. Portanto, similaridades em termos de, por exemplo, tamanho de gotícula de óleo e as partículas usadas ara estabilização foram mais importantes que as propriedades reológicas e as propriedades individuais desses óleos bastante desiguais (ver experimento 8) para o uso de emulsões Pickering de amido como um sistema de entrega de fármaco tópico.

20 Experimento 10

No experimento 10, o controle das propriedades de fluxo e de reologia das emulsões estabilizadas por grânulo de amido alterando-se a razão de amido para óleo é mostrado. Amido foi isolado de Quinoa (Biofood, Suécia) por um processo de moagem úmida e modificado por OSA para 2,9% (como descrito no experimento 1). A fase contínua das emulsões era de 5 mM de tampão de fosfato com pH 7 com 0,2 M de NaCl, e a fase dispersada era de Miglyol 812. Emulsões foram preparadas com o uso de um misturador de alto cisalhamento Ystral em 22.000 rpm por 30 s. Distribuições de tamanho de gotículas foram determinadas com o uso de difração a laser, como descrito no experimento 1, e são mostradas na tabela 6-1 como média D_{32} de superfície e modo da distribuição.

Amostras de emulsão para caracterização reológica foram preparadas para conter a mesma quantidade total de fases dispersadas (óleo e amido em conjunto representam 40% da emulsão) em razões de três amidos para óleo: 143 mg/ml de
5 óleo (366 mg de amido e 2,56 ml de óleo), 214 mg/ml de óleo (526 mg de amido e 2,46 ml de óleo) e 1.143mg/ml de óleo (1.841 mg de amido e 1,61 ml de óleo), toda a emulsão teve 4,2 ml de tampão, fazendo total de 7 ml. Essa quantidade foi escolhida para ser preencher completamente o espaço. Todas as
10 amostras foram preparadas e medidas em duplicatas.

Medições Reológicas

Medições reológicas foram realizadas em um reômetro (Malvern Kinexus, Inglaterra) 24 h após a preparação. As características de emulsões foram analisadas na temperatura
15 de $25 \pm 0,1$ °C com o uso de uma geometria de placa a placa serrada (placa superior de 40 mm de diâmetro, placa inferior de 65 mm de diâmetro , altura de vão de 1,0 mm). Todos os experimentos foram realizados em amostras duplicadas. Medições oscilatórias foram realizadas no intuito de
20 determinar a região viscoelástica linear da amostra (varredura de amplitude). Os ângulos de fase, a viscosidade de cisalhamento (η , Pa s), os módulos de armazenamento (G' , Pa) e de perda (G'' , Pa) foram investigados. Testes oscilatórios foram realizados na faixa de estresse por
25 cisalhamento de 0,001 a 1.000 Pa em uma frequência de 1 Hz.

Resultados de reologia

Todas as três amostras exibiram um comportamento viscoelástico que tem uma região elástica linear curta ao longo de uma faixa de resistência de 0,0001 a 0,002 seguido
30 por uma rápida diminuição conforme a estrutura foi dividida. A dependência de cisalhamento do módulo elástico das três emulsões testadas é mostrada na Figura 6-1. Essas razões de amido para óleo particulares foram escolhidas conforme estão

abaixo, na concentração de amido neutro de fluutuabilidade de 214 mg/ml de óleo e bem acima da mesma (conforme discutido no Experimento 1). As propriedades reológicas na região linear e o estresse de cisalhamento no ângulo de fase de 45° (o ponto no qual a estrutura se divide) foi medido e é mostrado na Tabela 6-1 para as 3 condições testadas. O módulo elástico G' é uma medida da quantidade de energia a partir do estresse de cisalhamento de oscilação que pode ser armazenado na estrutura das amostras e é uma função da força e o número de interações entre os componentes das emulsões. Conforme deveria se esperar, a emulsão com a razão de amido para óleo mais alta também tem o módulo elástico maior já que houve mais superfície de interação na emulsão bem como há tanto um tamanho de gotícula pequeno quanto amido em excesso. No entanto, pode haver várias contribuições para o módulo mais alto da emulsão de gotícula menor. Com superfície total crescente da fase dispersada, as interações atrativas vistas na agregação dos grânulos de amido seriam mais proeminentes. A pressão de Laplace mais alta de gotículas menores leva à menor deformabilidade das gotículas e, assim, a um módulo mais alto. Além do mais, conforme os módulos em soma constante dos volumes de fase dispersada de óleo e amido são comparados, o sistema se torna mais rígido com o compartilhamento crescente dos grânulos de amido completamente não deformados.

Conclusões em vista do Experimento 10

As emulsões produzidas por homogeneização de alto cisalhamento tiveram o tamanho de gotículas 9 a 70 μm dependendo da razão de amido para óleo. A caracterização reológica indicou uma estrutura de gel com um módulo elástico na faixa de 200 a 2.000 Pa dependendo do tamanho de gotícula. Isso é um atributo útil que permite o ajuste das propriedades de fluxo sem a adição de modificadores de viscosidade.

Tabela 6-1: Propriedades reológicas de emulsões estabilizadas por amido em várias razões de amido para óleo

	143 mg de amido/ml de óleo	214 mg de amido/ml de óleo	1143 mg de amido/ml de óleo
G'_0 (Pa) em região linear	223 ± 58,6	423 ± 12,7	2570 ± 69,4
G''_0 (Pa) em região linear	9,81 ± 3,24	20,4 ± 1,92	352 ± 38,6
η_{sp}/c (Pa s) em região linear	35,6 ± 9,32	67,4 ± 2,04	415 ± 14,5
Y^* (resistência) no ângulo de fase de 45°	4,47 ± 1,01	2,55 ± 0,0667	0,761 ± 0,0263
G' (Pa) no ângulo de fase de 45°	26,5 ± 0,756	81,1 ± 4,40	220 ± 26,7
d_{32} (µm)	13,8 ± 0,831	10,2 ± 0,591	5,73 ± 0,919
Modo (µm)	33,7	25,9	9,65

média ± desvio padrão, n=2.

Experimento 11

5 No Experimento 11, a capacidade de grânulos de amido de estabilizar a fase externa de emulsões duplas (W/O/W) foi estudada e a eficiência de encapsulação de tais emulsões duplas foi demonstrada.

10 Uma emulsão contínua interna de óleo Ei foi produzida através de emulsificação de uma fase aquosa que consiste em 1,4 ml 0,1 M de solução de NaCl com 1,4 µL de corante vermelho alimentício doméstico (Ekstroms/Procordia, Eslov, Suécia), em uma fase oleosa que consiste em 5,6 ml de Miglyol e 0,28 g de tensoativo de poliglicerol
15 poliricinoleato (Grindstedt PGPR90, Danisco, Copenhagen Dinamarca) com uso de Misturador Ystral X10 com 6 mm de ferramenta dispersante a 24.000 rpm por 10 minutos. A emulsão Ei resultante teve o tamanho de gotícula de 1,17±0,13 µm (D₄₃±desvio padrão), conforme medido por Malvern Mastersizer
20 2000S.

As emulsões duplas Pickering foram preparadas com 20% de emulsão Ei interna e 80% de uma fase contínua (5 mM de tampão de fosfato com pH 7,0 0,2 M de NaCl) contendo 214 mg/ml de óleo de 1,8% de amido de quinoa modificado por OSA

no misturador Ystral X10 a 22.000 rpm por 30 segundos.

A emulsão dupla resultante teve o tamanho de gotícula de $48 \pm 10 \mu\text{m}$ ($D_{43} \pm$ desvio padrão).

A encapsulação estabilidade da emulsão dupla durante armazenamento foi avaliada espectrofotometricamente a 520 nm do vazamento do corante na fase aquosa externa após diferentes tempos conforme mostrado na Tabela 7-1.

Tabela 7-1: Vazamento de corante na fase aquosa externa (5) após diferentes tempos de armazenamento. (% em vazamento e desvio padrão)

Tempo de armazenamento (dias)	Vazamento (%)	SD
0	0,14	0,20
7	0,21	0,19
14	0,37	0,16
21	0,49	0,17
30	1,00	0,23

Conclusões em vista do Experimento 11

O uso bem-sucedido de grânulos de amido para estabilizar as emulsões duplas foi demonstrado. A eficiência de encapsulação das emulsões foi estudada e permaneceu excelente durante armazenamento. Tais emulsões duplas poderiam ser adequadas para encapsulação de substâncias solúveis em água em alimentos e formulações farmacêuticas.

Experimento 12

No Experimento 12, a estabilidade excelente das emulsões estabilizadas por amido e emulsões duplas para congelamento e descongelamento foi estudada.

Experimental

O amido granular pequeno modificado por OSA preparado como no Experimento 1 foi usado. A fase contínua foi um tampão de fosfato de 5 mM com pH 7 com 0,2 M de NaCl, as fases dispersadas foram o óleo de triglicerídeo de cadeia média Miglyol 812 (Sasol, Alemanha) ou manteiga de castanha

(sólida a temperatura ambiente). As emulsões foram preparadas em tubos de vidro com volume total de 6 ml com base em 2 receitas diferentes (7% e 33% de óleo) e 214 mg de amido por ml de óleo. Após a adição de amido ao tampão de tubos foi
5 adicionada e misturada por aproximadamente 5 segundos com uso de misturador por vórtice (VM20, Chiltern Scientific Instrumentation Ltd, RU). Portanto, o óleo foi adicionado e misturado com misturador Ystrol (D-79282, Ballrechten-Dottingen, Alemanha) a 11.000 rpm por 30 segundos. Manteiga
10 de castanha foi derretida em um banho de água antes da emulsificação. Algumas das emulsões foram em seguida termotratadas a 70 °C por 1 minuto em um banho de água. As emulsões foram armazenadas a temperatura ambiente por 24 horas antes de experimentos adicionais. As amostras de
15 emulsão foram congeladas em bandejas de alumínio através de grampeamento das bandejas em nitrogênio líquido antes do armazenamento em congelador. As amostras foram produzidas em duplicatas para estudar a reprodutibilidade. As amostras foram descongeladas no dia seguinte para análise de tamanho
20 de partícula e análise de formato adicionais (microscopia) conforme descrito no Experimento 1. Para emulsões não aquecidas com amostras de 7% de Miglyol, um segundo método de congelamento foi avaliado com uso de um congelador rápido de laboratório (Frigoscandia, Suécia).

25 A distribuição de tamanho de partícula de emulsões antes do congelamento e após o descongelamento foi analisada conforme descrito no Experimento 2 e através do uso de imageamento de microestrutura conforme descrito no Experimento 1.

30 As emulsões duplas foram preparadas conforme descrito no Experimento 11 com a diferença de que o óleo Miglyol foi substituído por manteiga de castanha. A estabilidade de congelamento/descongelamento de emulsões

duplas foi analisada conforme descrito acima com uso do método de congelamento por nitrogênio líquido.

Resultados

As emulsões eram estáveis para congelamento e descongelamento, D_{43} antes do congelamento de emulsões estabilizadas por amido com 7 % de Miglyol foi 50,5 μm , após congelamento rápido e descongelamento D_{43} foi 49,8 e após congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento, 56,9 μm . O formato de gota preservado foi claramente visto sob o microscópio (consulte a Figura 7-1). O tratamento térmico causou um leve aumento em tamanho de gota devido ao intumescimento de amido e gelatinização parcial e também agregação de gota aumentada.

As emulsões duplas não termotratadas também mostraram estabilidade excelente para congelamento e descongelamento (Figura 7-2), embora a agregação de gota fosse aumentada conforme visto a partir das curvas de distribuição de tamanho de partícula (Figura 7-3). Para emulsões duplas termotratadas, a distribuição de tamanho de gota sem dúvida não foi afetada por congelamento e descongelamento embora indicasse um colapso das gotículas maiores (Figura 7-3).

A estabilidade de congelamento/descongelamento é importante para qualidade de produto visto que os produtos são expostos a uma faixa de temperaturas etc.

Conclusões em vista do Experimento 12

Emulsões e emulsões duplas estabilizadas por amido poderiam ser congeladas e descongeladas com estrutura preservada de gotas de emulsão. O uso de diferentes fases de óleo, emulsões termotratadas ou não aquecidas ou diferentes métodos de congelamento, todos produziram emulsões com estabilidade de congelamento/descongelamento altamente aceitável.

Experimento 13

No Experimento 13, as emulsões foram secadas, produzindo um pó carregado de óleo.

Experimental

5 Secagem por congelamento: As emulsões foram preparadas e congeladas conforme descrito no Experimento 12. As bandejas de amostra foram cobertas com papel-alumínio perfurado. As emulsões usadas continham óleo Miglyol ou manteiga de castanha como fase dispersada a concentrações de
10 7% (não termotratadas ou termotratadas) ou 33 % de não termotratadas. As amostras congeladas foram transferidas para uma secadora por congelamento de laboratório (Secadora por Congelamento Labconco, Ninolab EUA). A secadora por congelamento foi pré-resfriada pra -50 °C e as amostras foram
15 secadas por 52 h.

 Secagem por aspensão: As emulsões foram preparadas através da mistura de amido granular pequeno e tampão como no Experimento 1 com manteiga de castanha temperada com uso de um Misturador Sorval a 1.800 rpm por 5min. As proporções
20 usadas foram 7 % de óleo e 600 mg de amido/g de óleo. As emulsões foram termotratadas a 70 °C por 1 minuto. A temperatura de entrada da secadora por aspensão foi de 130 °C e a velocidade de bomba estabelecida em 50.

 A distribuição de tamanho de partícula de emulsões
25 antes do congelamento e após a secagem foi analisada conforme descrito no Experimento 2 e através do uso de imageamento de microestrutura conforme descrito no Experimento 1. O pó seco foi analisado após reidratação em tampão. Os pós secos foram revestidos por sublimação catódica com ouro e as imagens
30 registradas em uma microscopia de elétrons de varredura (SEM, FegSEM, modelo JEOL JSM-6700F, Japão) operada a 5 kV e uma distância de trabalho 127 em 8 mm.

Resultados

As emulsões secas, isto é pós, foram obtidas por secagem por congelamento e secagem por aspersão. O tratamento térmico antes da secagem resultou na formação de uma camada coesiva altamente estável de amido parcialmente gelatinizado, que aumentou a estabilidade das gotas durante o armazenamento e processamento. Essa camada foi mais importante no caso da fase líquida dispersada, visto que o estado físico da fase dispersada (líquido/sólido) afetou a estabilidade das emulsões através da secagem. As gotas de emulsão menores estavam mais bem preservadas após a secagem e a reidratação ao passo que as gotas maiores eram geralmente mais suscetíveis à desestabilização. As gotas de emulsão secadas mostraram um aumento em distribuição de tamanho geral devido à agregação parcial.

As gotas intactas de emulsões termotratadas contendo óleo líquido (Miglyol) foram obtidas após a secagem (consulte a Figura 8-1). Uma camada de amido coesiva foi obtida pelo tratamento térmico que protege as gotículas de óleo durante a secagem por congelamento. As gotas colapsadas parciais deixaram bolsos vazios de camada de amido. Houve uma grande variação de tamanho de gota e alguma agregação. As emulsões não termotratadas contendo óleo líquido colapsaram durante a secagem. As gotas intactas de emulsões termotratadas contendo óleo sólido (manteiga de castanha) foram obtidas conforme visto na Figura 8-2 (emulsão não aquecida) e na Figura 8-3 (termotratadas antes da secagem). Após a secagem por congelamento de emulsões não termotratadas, gotas secas foram obtidas bem como óleo livre. Grânulos de amido foram vistos na superfície das gotas. O tratamento térmico antes da secagem por congelamento resultou em mais gotas intactas após a secagem. As gotas intactas foram também obtidas por secagem por aspersão conforme visto Figura 8-4. As esferas cobertas de amido carregado de óleo

permaneceram intactas após a secagem por aspersão embora haja também amido livre presente já que amido foi adicionado em excesso a 600 mg/g de óleo.

5 A agregação de gotas, especialmente após a reidratação de emulsões termotratadas secadas antes da secagem foi confirmada pelas curvas de distribuição de tamanho de partícula (consulte a Figura 8-5). As curvas de distribuição de tamanho de partícula mostraram resultados similares para emulsões secadas por congelamento e emulsões 10 duplas secadas por congelamento (Figura 8-5) com manteiga de castanha como fase oleosa (as emulsões foram termotratadas antes da secagem).

Conclusões em vista do Experimento 13

15 As emulsões estabilizadas por amido poderiam ser secadas tanto por secagem por congelamento quanto secagem por aspersão. As emulsões foram mais estáveis para secagem quando termotratadas após a emulsificação causando amido de gelatinização parcial. Isso foi especificamente importante durante a secagem de óleo líquido. Os pós carregados de óleo 20 resultantes apresentaram muitas propriedades atraentes inclusive a capacidade de ser facilmente esfregado na pele conferindo uma sensação suave sem resíduo visível. Esse aspecto pode ser considerado útil em muitos produtos como cosméticos e sistemas de entrega tópica.

25 Experimento 14

Nesse experimento, a barreira de amido foi variada por intumescimento e gelatinização de grânulos de amido após a emulsificação. O método de pH-stat foi usado como um modo de monitorar a taxa de lipólise com o propósito de usá-la 30 como um meio de comparar as propriedades de barreira relativas entre as emulsões estudadas. O intumescimento e a gelatinização de amido ocorreram durante o aquecimento na presença de água.

A digestão de lipídeos é um processo interfacial que envolve a interação da enzima lipase e seus cofatores com a superfície das gotículas de modo que a enzima possa entrar em contato próximo com seu substrato. Por essa razão, a área interfacial, isto é, a área de superfície da emulsão
5 específica é de importância e é dada por:

$$S = \frac{6\Phi}{D_{32}}$$

em que S é a área de superfície por unidade de volume de emulsão (m²), Φ é a fração de volume de óleo e D₃₂ é o diâmetro médio de Sauter. S é usado para escalonar os
10 resultados de atividade geral para considera a diferente quantidade de área de superfície nas várias amostras. O método de pH-stat para monitorar a liberação de ácidos graxos livres (FFAs) para descrever a taxa de digestão é um método
15 fisiológico *in vitro* bem conhecido para triar os efeitos de composições e estrutura de produtos alimentícios e farmacêuticos na taxa e extensão de digestão lipídica. A geração de FFAs é monitorada em pH-stat através da medição o consumo de NaOH necessária para manter um dado pH (nesse
20 caso, 7,0), a taxa de liberação (escalonada pela área de superfície do óleo) é a atividade de enzima. A quantificação das propriedades de barreira da camada de amido, uma interface de óleo facilmente acessível (sem barreira), é medida estabelecendo a atividade de lipase em 100%. Em
25 seguida compara-se a diminuição relativa em atividade nas emulsões estabilizadas por grânulo de amido com a condição de que a taxa de consumo de NaOH seja proporcional à taxa de liberação de FFA se escalonada pela área interfacial S, da emulsão testada. Quanto mais baixa a taxa de lipólise, mais
30 bem protegido o óleo está pela camada de amido parcialmente gelatinizado e melhores são as propriedades de barreira.

Métodos

O amido granular pequeno foi isolado e modificado por OSA conforme descrito no Experimento 1. A fase contínua foi um tampão de fosfato com pH 7 com 0,2 M de NaCl, a fase
5 dispersada foi o óleo de triglicerídeo de cadeia média Miglyol 812 (Sasol, Alemanha).

O ensaio usado na lipólise foi um tampão com 4 mM de NaTDC (sal de bile), 1 mM Tris-Maleat, 1 mM de CaCl₂ e 150 mM de NaCl. A lipase e colipase foram usadas como enzimas
10 para a digestão da fase oleosa.

Emulsificação

As emulsões foram preparadas em tubos de teste de vidro com 2,7 ml da fase contínua, 0,3 ml da fase oleosa e 22,5 a 180 mg de amido através da mistura com um Ystrol (D-
15 79282, Ballrechten-Dottingen, Alemanha) a 22.000 rpm por 30 segundos. Um segundo conjunto de emulsões foi preparada do mesmo modo com uso de 7 % de fase oleosa e 214 mg de amido por ml de óleo para aquecimento a diferentes temperaturas.

Tratamentos térmicos de emulsões

O primeiro conjunto de emulsões foi termotratado em
20 um banho de água a 73 °C. As amostras foram mantidas acima de 70 °C por 1 minuto e o tempo de amornamento total foi de aproximadamente 3 minutos. Após as amostras terem resfriado para 40 °C, as emulsões foram agitadas em um misturador por
25 vórtice por 5 segundos. O segundo conjunto de emulsões foi termotratado conforme descrito a temperaturas que variam de 45 a 100 °C.

Medições de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partículas de
30 partículas de amido e gotículas de emulsão foi medida conforme descrito no Experimento 1 para concentrações de amido variadas e como no Experimento 2 para temperaturas variadas. O tamanho de gota foi medido tanto antes quanto

após a lipólise.

Métodos de pH-stat

A atividade de lipase e colipase foi determinada por titulação de pH-stat com uso de um Radiômetro modelo
5 TIM854 (Analytical SAS, Cedex, França). A amostra, emulsão ou controle foi misturada com 15 ml tampão de ensaio e 3 μ l de cada uma das soluções contendo lipase (1 mg/ml) e colipase (1 mg/ml). O pH foi mantido em 7,0 por titulação de 0,1 M de NaOH e o consumo (μ mol/minutos) em 18 minutos foi tomado como
10 a atividade de lipase e colipase. A atividade de lipase foi determinada como a quantidade de NaOH adicionada para manter o pH em 7 durante a lipólise visto que os FFAs liberados por lipase abaixaram o pH. A liberação média de FFAs por minuto entre 15 e 18 minutos após a adição das enzimas foi usado
15 como a taxa de lipólise.

Preparação de Controles

A atividade do óleo sem a presença de amido foi controlada com uso de emulsões estabilizadas por Tween 20. Uma quantidade apropriada de Tween 20 foi usada para produzir
20 gotas de óleo na faixa de tamanho como as gotas estabilizadas de amido, isto é, 10 a 20 μ m. O efeito do tratamento térmico das emulsões foi controlado com uso de uma emulsão não aquecida com a mesma composição que as emulsões aquecidas correspondentes. Além disso, um controle com tampão e amido
25 de fase contínua, aquecido como as emulsões, foi usado para verificar a atividade do amido.

Microscopia

A inspeção e imageamento da microestrutura das emulsões foram feitos antes e após a microscopia de
30 tratamento térmico conforme descrito no Experimento 1, com a modificação de que a luz foi também transmitido com uso de um filtro de polarização (U-ANT, Olympus) e de que as amostras foram colocadas em uma lâmina microscópica e estudadas

imediatamente sem vidro de cobertura. As imagens foram processadas com uso do programa de processamento de imagem Java ImageJ (versão 1.42m).

Resultados em vista do Experimento 14

5 O tamanho de gota diminuída com uma quantidade aumentada de amido adicionado (consulte a tabela 8-1) e o tamanho de gota não foi afetado pela lipólise após 30 minutos.

10 Tabela 8-1. Tamanho de gota e atividade de lipase para emulsões termotratadas

Amido (mg/ml de óleo)	D32 (µm)	Área de superfície específica	Atividade (µmol/minuto)	Atividade/S	Atividade/S (% de máx.)
75	47,54	6,33E-03	5,31 E-05	8,39E-03	68%
150	39,00	7,69E-03	4,04E-05	5,25E-03	43%
225	33,49	8,96E-03	4,65E-05	5,19E-03	42%
300	28,15	1,07E-02	4,86E-05	4,56E-03	37%
600	22,21	1,35E-02	5,73E-05	4,24E-03	34%

A emulsão não aquecida não teve efeito algum sobre a lipólise em comparação à emulsão com Tween20 como emulsificante e estabilizante de gota. A atividade de lipase diminuída somente nas emulsões aquecidas devido à
 15 gelatinização parcial dos grânulos de amido conforme pode ser visto na Figura 9-1. Os grânulos gelatinizados criaram mais uma camada impermeável em torno das gotas que diferem dos grânulos distintos na superfície de gota nas emulsões não aquecidas. No entanto, os grânulos não foram completamente
 20 gelatinizados durante o tratamento térmico, que é mostrado pelo padrão polarizado do amido mais próximo da interface de gota na Figura 9-1 (Figura inferior). Embora o limiar entre os grânulos individuais se torne difuso, ainda permanece um certo grau de partícula intacta na interface de óleo. Isso
 25 poderia resultar em um mecanismo de estabilização de partícula mantida ao mesmo tempo em que alcança uma camada externa coesiva densa na fase aquosa que confere elevação das propriedades de barreira intensificadas observadas nas emulsões termotratadas estabilizadas por amido. Essa

intensificação da barreira aumentada com a faixa de temperatura estudada conforme visto por uma atividade de lipase diminuída (consulte a Figura 9-2).

Conclusões em vista do Experimento 14

5 A barreira de grânulos de amido na interface de gota pode ser intensificada por aquecimento da emulsão e desse modo gelatinizar parcialmente os grânulos. Essa barreira intensificada impede que a lipase atinja e digira o óleo. A atividade da lipase diminui em pelo menos 60%
10 comparada à atividade em uma emulsão não aquecida, indicando que o aquecimento pode alcançar uma camada de amido coesiva que é útil para a intensificação ou o ajuste das propriedades de barreira para aplicações de encapsulação.

Experimento 15

15 No Experimento 15, a encapsulação de diferentes substâncias em emulsões estabilizadas por amido e emulsões duplas é demonstrada.

Experimental

20 O amido granular pequeno modificado por OSA preparado como no Experimento 1 foi usado. A fase contínua foi um tampão de fosfato de 5 mM com pH 7 com 0,2 M NaCl. A fase oleosa e o método de emulsificação são descritos para cada substância encapsulada abaixo.

Salicilato de metila (encapsulação na fase oleosa)

25 O salicilato de metila é usado em produtos farmacêuticos como um analgésico, mas é também usado em alimentos como um agente flavorizante visto que tem um gosto e cheiro de menta. No entanto, é bem tóxico, LD50=500 mg/kg para seres humanos adultos e é, portanto usado em
30 concentrações muito baixas. A natureza aromática da substância torna possível detectar por fotoespectroscopia a um comprimento de onda de 302 nm.

O salicilato de metila (CAS n° 1 19-36-8) foi

dissolvido em manteiga de castanha durante revolução a 50 °C com uso da concentração de 50 L/g de óleo. O amido (500 mg/g de óleo), o tampão e a manteiga de castanha derretida (33 %) com salicilato de metila foi em seguida emulsificada em lotes de 50 g com uso de um misturador Sorvall (nível 8, 2 minutos) em um banho de água a 40 °C. As emulsões adicionais foram secadas por congelamento conforme descrito no Experimento 13. O salicilato de metila foi também encapsulado na fase oleosa com uso de três diferentes óleos e emulsificada conforme descrito no Experimento 9. A substância encapsulada não alterou a distribuição de tamanho de gota ou aparência visual das gotas.

Sabor (encapsulação na fase oleosa)

O amido (500 mg/g), o tampão e a manteiga de castanha (56 %) com algumas poucas gotas de um agente flavorizante de amêndoas comum para uso alimentício foram emulsificados com uso de um misturador Sorvall conforme descrito acima. A emulsão resultante teve propriedades de creme conforme descrito no Exemplo 8 e teve um aroma de amêndoa que ficou mais aparente quando o creme foi aplicado à pele. Após 1 semana de armazenamento, o aroma de amêndoa foi ainda detectável embora com intensidade diminuída.

Penicilina (encapsulação na fase aquosa interna de uma emulsão dupla)

O ingrediente ativo em Kâvepenin, fenoximetilpenicilina (penicilina V), é uma penicilina (droga antibacteriana) que impede que bactérias construam uma parede de célula normal. As emulsões duplas foram preparadas conforme descrito no Experimento 11 com a modificação de que a concentração de amido foi de 500 mg/ml de óleo e de que Kâvepenin foi adicionado à fase aquosa interna a uma concentração de 62,5 mg/ml. As emulsões foram em seguida centrifugadas a 1.000 g por 5 minutos (Beckman Coulter,

Allegra (R) X-15R, L 284, Inglaterra, a fase aquosa foi removida e a emulsão lavada com 5 ml de tampão. Esse procedimento foi repetido 5 vezes. Conforme demonstrado mais cedo no Experimento 11, é possível para produzir emulsões duplas com um alto grau de eficiência de encapsulação e baixo vazamento. Por essa razão, a lavagem de emulsões é útil para remover a pequena quantidade de fase aquosa interna que possa ter vazado durante a etapa de emulsão inicial que causam sabores ou odores desagradáveis. Isso é particularmente útil para antibióticos orais de sabor amargo, especialmente em formulações líquidos para crianças em que anuência é um grande problema. Esse aspecto é demonstrado adicionalmente no Experimento 16. O tamanho de gota não foi alterado pelo procedimento de lavagem (D_{43} foi inicialmente 30,4 μm , após a lavagem 1: 30,4, lavagem 2: 42,5, lavagem 3: 34,7, lavagem 4: 42,9 e lavagem 5: 41,6 μm).

Os colorantes (encapsulação na fase aquosa interna de uma emulsão dupla) Diferentes colorantes foram encapsulados na fase aquosa interna de emulsões duplas. Um colorante alimentício foi encapsulado conforme descrito no Experimento 11 que mostra eficiência de encapsulação e armazenamento estabilidade excelente. Essas emulsões foram congeladas adicionalmente em nitrogênio líquido e descongeladas conforme descrito no Experimento 12 ou secadas por congelamento conforme descrito no Experimento 13 com um grau de encapsulação aceitável mantido. Azul de Coomassie foi encapsulado com uso do mesmo método, mas com uma concentração de amido de 500 mg/ml de óleo. A substância encapsulada não alterou a distribuição de tamanho de gota ou a aparência visual de gotas de emulsão dupla.

A vitamina B12 também foi encapsulada com uso do método descrito para azul de Coomassie.

Conclusões em vista do Experimento 15

As substâncias poderiam ser encapsuladas de modo eficaz na fase oleosa de emulsões com boa estabilidade. As substâncias solúveis em água poderiam ser encapsuladas em emulsões duplas com partículas de amido que estabilizam a emulsão externa. Esses experimentos mostram a adequabilidade de gotas de emulsão estabilizadas por grânulos de amido para encapsulação de ingredientes ou substâncias ativas em alimentos e produtos farmacêuticos.

Experimento 16

No Experimento 16, um método para alcançar uma supressão de sabor estranho foi estudado em emulsões duplas com penicilina encapsulada e em emulsões aquecidas e não aquecidas com uso de óleo de peixe como a fase dispersada. O óleo de peixe contém ácidos graxos ômega 3 e é geralmente considerado como tendo benefícios à saúde embora altamente suscetíveis à oxidação que causa um sabor estranho. A penicilina também é conhecida por causar sabor estranho como um gosto amargo altamente detectável.

Experimental

Penicilina

As emulsões duplas estabilizadas por amido com Penicilina (Kâvepenin) foram preparadas e lavadas conforme descrito no Experimento 15. Uma análise sensorial foi realizada antes e após lavagem. Os parâmetros sensoriais foram avaliados por uma pequena quantidade da emulsão dupla aplicada sobre a língua e em seguida engolida. Uma curva padrão sensorial foi produzida somente com tampão e Kâvepenin em diferentes concentrações para detecção o limite sensorial do avaliador.

Óleo de peixe

O amido granular pequeno modificado por OSA preparado com no Experimento 1 foi usado. A fase contínua foi um tampão de fosfato de 5 mM com pH 7 com 0,2 M de NaCl. A

fase oleosa foi um óleo de peixe comercial (Eskimo-3 Pure, Green Medicine AM, Malmo, Suécia). A emulsificação com uso de 500 mg de amido/ml de óleo e 10 % de fase oleosa foi realizada conforme descrito no Experimento 1. Algumas das emulsões foram subsequentemente termotratadas em um banho de água a 70 °C por 1 minuto. As emulsões foram vedadas e armazenadas a 5 °C por 1 semana. A estabilidade da emulsão foi observada imediatamente após a preparação da amostra e uma semana mais tarde. A análise de distribuição de tamanho de partícula e microscopia foi realizada conforme descrito no Experimento 2. Uma análise sensorial foi realizada por uma pessoa. Os parâmetros sensoriais foram avaliados a partir de uma pequena quantidade da emulsão aplicada sobre a língua e em seguida engolida.

15 Resultados de Penicilina

O limite de detecção voluntária de Kâvepenin em tampão foi abaixo de 10 mg/ml de acordo com a curva padrão. Nenhum sabor a partir de Kâvepenin foi detectado a partir de emulsões duplas contendo aproximadamente 6 vezes essa concentração. A lavagem não resultou em diferença alguma no gosto da emulsão dupla.

Óleo de peixe

As emulsões estabilizadas por amido foram formadas (consulte a Figura 10-1) e as gotas de emulsão foram estáveis para o tratamento térmico e para o armazenamento. As emulsões não termotratadas eram brancas, ao passo que as emulsões termotratadas tinham uma cor levemente amarela antes e após o armazenamento. O armazenamento por 1 semana não alterou a distribuição de tamanho de partícula. A emulsão não aquecida tinha um gosto muito forte do óleo de peixe. A emulsão aquecida tinha um gosto moderado concernente ao óleo de peixe.

Conclusões em vista do Experimento 16

A supressão de sabor estranho foi demonstrada e altamente eficaz quando a penicilina foi encapsulada. As emulsões estabilizadas por amido poderiam ser produzidas também com óleo de peixe. O óleo de peixe não afetou
5 negativamente a estabilidade de emulsões. As emulsões estabilizadas por amido podem ser adequadas para encapsulação de ingredientes ou substâncias com gosto indesejado em alimentos e produtos farmacêuticos.

Experimento 17

10 No Experimento 17, os grânulos de amido para estabilizar espuma foram usados. A fase oleosa nesse Experimento foi gordura de castanha (AAK, Suécia), os grânulos de amido foram isolados da quinoa e tornados mais hidrofóbicos por modificação por OSA em 2,9% (conforme
15 descrito no Experimento 2) e a fase contínua foi tampão de fosfato de 5 mM em pH 7 e 0,2 M de NaCl. A manteiga de castanha foi derretida a 60 °C antes da homogeneização em um misturador Sorvall Omni em nível 8 por 5 minutos com uso de uma unidade de dispersão de 300 ml. O contentor maior
20 permitiu que ar fosse sugado nas fases líquidas durante a mistura por um vórtice na superfície líquida. Desse modo, tanto as bolhas estabilizadas de partícula quanto gotículas foram formadas.

Resultado do Experimento 17

25 Uma estrutura semelhante à espuma rígida foi produzida com uma densidade similar de creme chantili. Era sólida e podia ser cortada em uma peça mostrada na Figura 11-1. Essa espuma também foi inalterada após mais de um mês de armazenamento.

Conclusões em vista do Experimento 17

30 O uso bem-sucedido de grânulos de amido para estabilizar a espuma foi demonstrado. A estrutura resultante poderia ser atraente em uma variedade de aplicações

alimentícias e cosméticas.

REIVINDICAÇÕES

1. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, caracterizada por compreender pelo menos duas fases e partículas sólidas, sendo que as ditas partículas sólidas são
5 grânulos de amido e os ditos grânulos de amido ou, uma porção dos mesmos, estão situados na interface entre as duas fases que fornecem a emulsão ou espuma estabilizada por partícula, em que os grânulos de amido possuem um tamanho granular pequeno na gama de 0,2-8 micra e em que a quantidade de
10 grânulos de amido adicionada cobre mais de 10% da superfície de uma gotícula de emulsão.

2. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos grânulos de amido terem sido submetidos a uma modificação física e/ou
15 modificação química.

3. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pela modificação física ser realizada por aquecimento seco ou por outros meios que desnaturam, parcialmente, as proteínas de superfície.

20 4. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 3, caracterizada pela modificação química ser realizada por tratamento de anidrido de alquenil succinila ou através de enxerto com outros produtos químicos com uma cadeia lateral
25 hidrofóbica.

5. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelos grânulos de amido de preferência terem um tamanho granular pequeno na faixa de 0,2 a 4 micra, com ainda
30 mais preferência, 0,2 a 1 micron.

6. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelos grânulos de amido serem obtidos a partir

de qualquer fonte botânica.

7. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelos grânulos de amido serem obtidos a partir de quinoa, arroz, milho, amaranto, cevada, milho doce não amadurecido, centeio, 5 triticale, trigo, fagópiro, tifa, filipêndula, durião, teff, aveia, pastinaca, painço pequeno, arroz selvagem, alpiste, pata de vaca, inhame e taro incluindo variedades cerosas e com alto teor de amilose dos supracitados.

8. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada por pelo menos duas fases serem escolhidas a partir de fase à base de óleo/fase de base aquosa, e fase 10 gasosa/fase de base aquosa, como uma emulsão de óleo em água ou uma emulsão de água em óleo.

9. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pela dita emulsão estabilizada por partícula ser submetida a um tratamento térmico.

10. EMULSÃO OU ESPUMA ESTABILIZADA POR PARTÍCULA SECA, caracterizada por uma emulsão ou espuma estabilizada por partícula conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 ter sido submetida à remoção de água como através de secagem.

11. USO DE UMA EMULSÃO ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 caracterizado por ser para o controle da densidade de gotículas de emulsão.

12. USO DE UMA EMULSÃO ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 caracterizado por ser para encapsulação de substâncias escolhidas a partir de biofarmacêuticos, proteínas, 30 probióticos, células vivas, enzimas, anticorpos, ingredientes

alimentares, vitaminas, e lipídeos.

13. USO DE UMA EMULSÃO ESTABILIZADA POR PARTÍCULA, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por ser em produtos alimentares, produtos
5 cosméticos, cremes para a pele, loções, formulações farmacêuticas.

14. FORMULAÇÃO, caracterizada por compreender uma emulsão estabilizada por partícula seca conforme definida na reivindicação 11 e uma substância escolhida a partir de
10 biofarmacêuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas, anticorpos, ingredientes alimentares, vitaminas e lipídeos.

Fig 0-1



Fig 0-2



Amido em emulsões

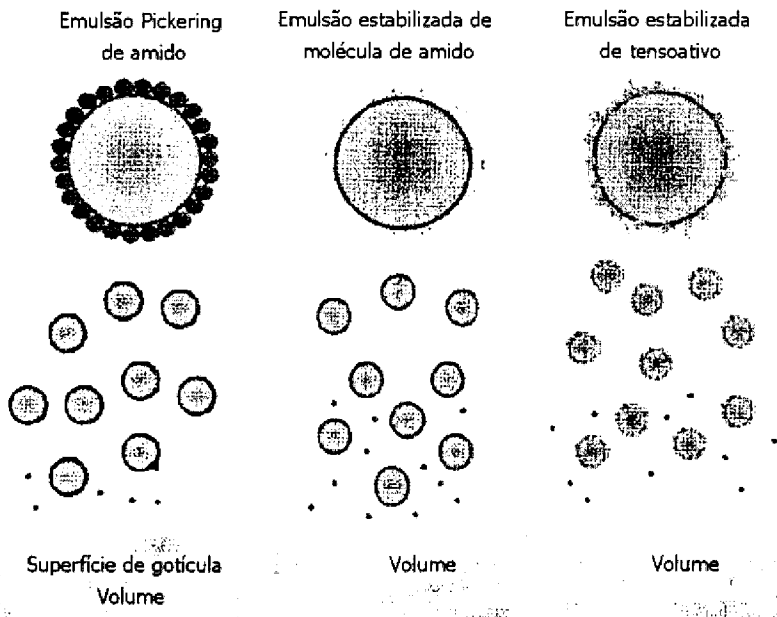


Fig. 0-3

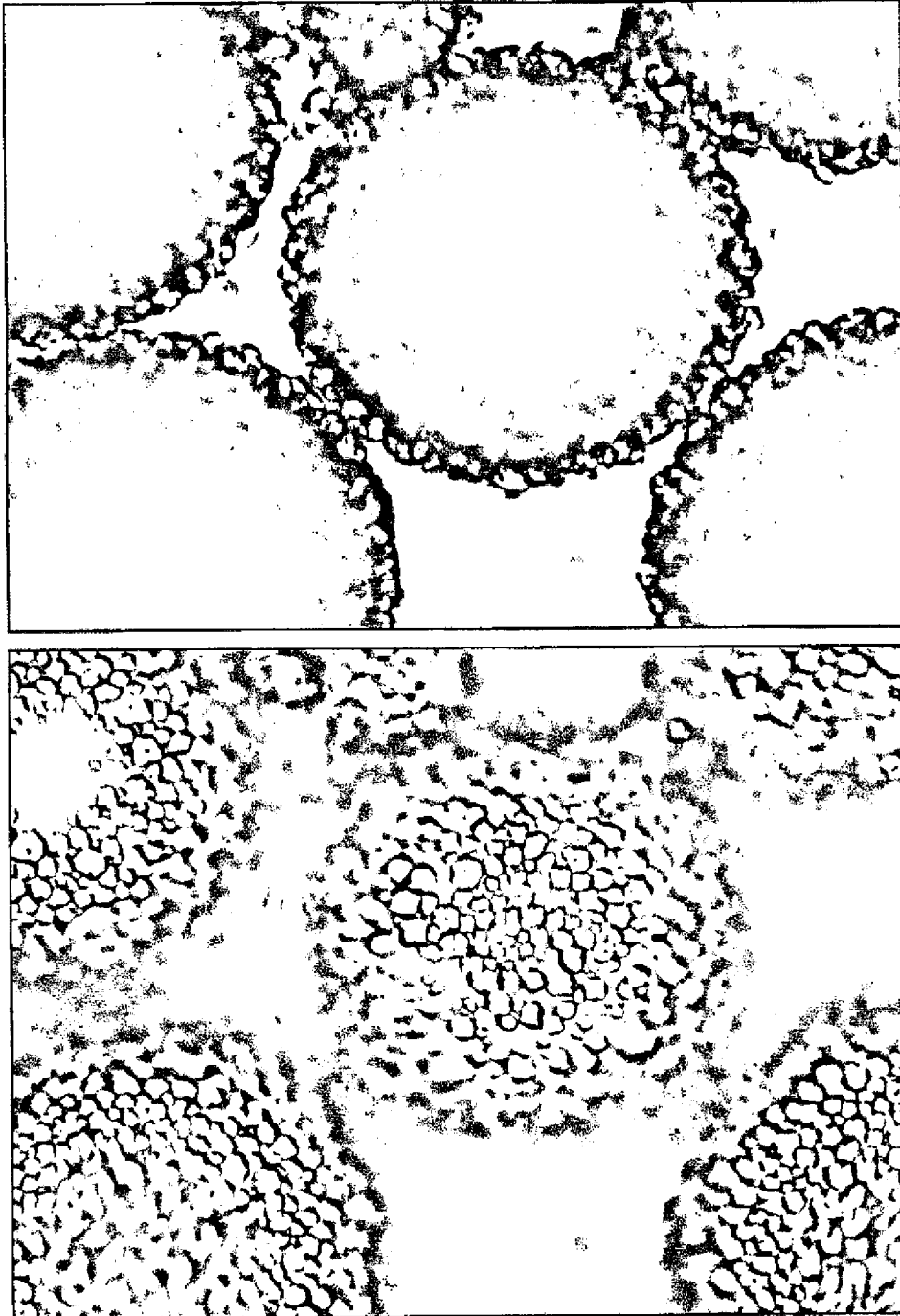


Fig 0-4A

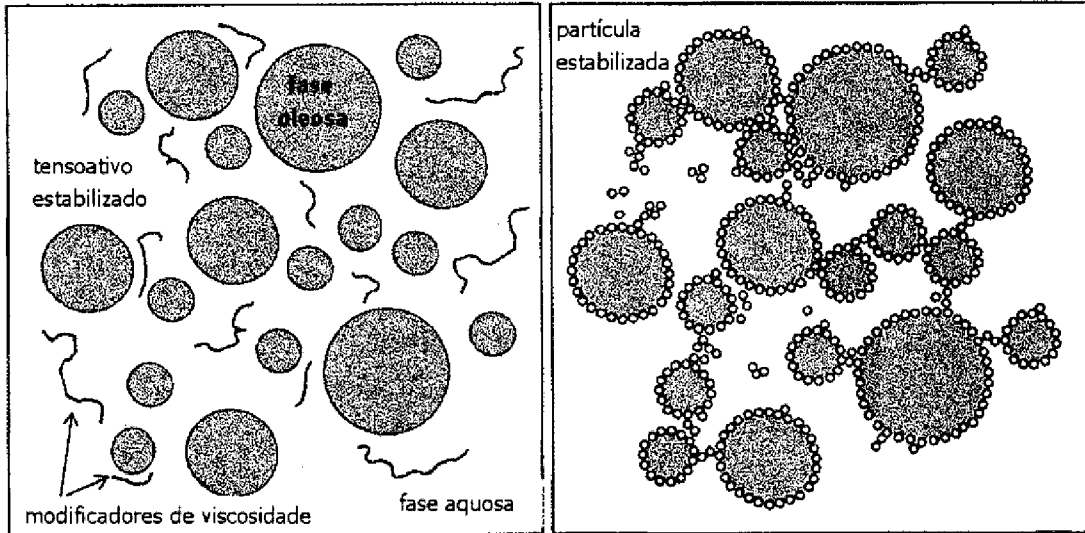


Fig. 0-4B

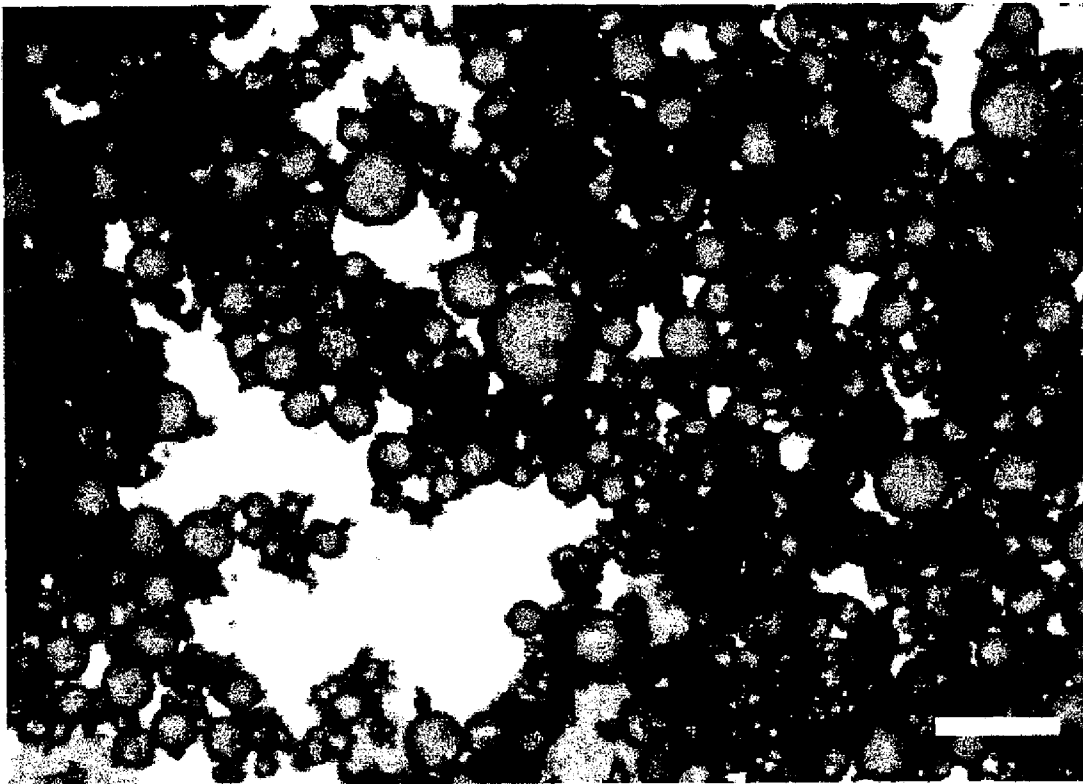


Fig. 0-5A

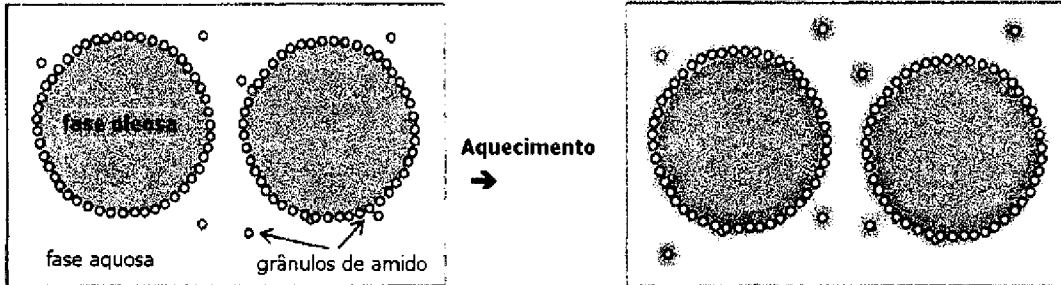


Fig. 0-5B

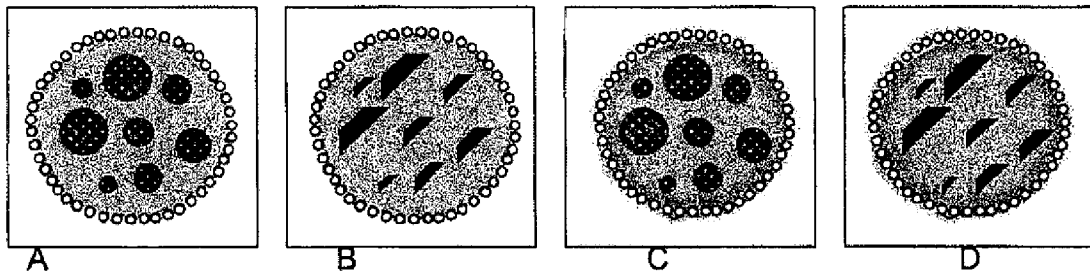


Fig. 0-6

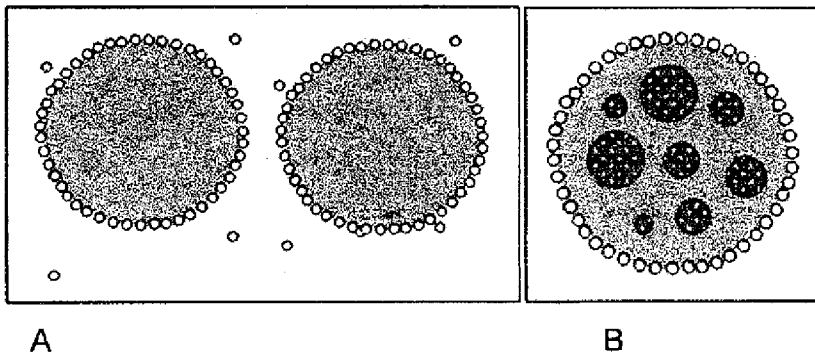


Fig. 1-1

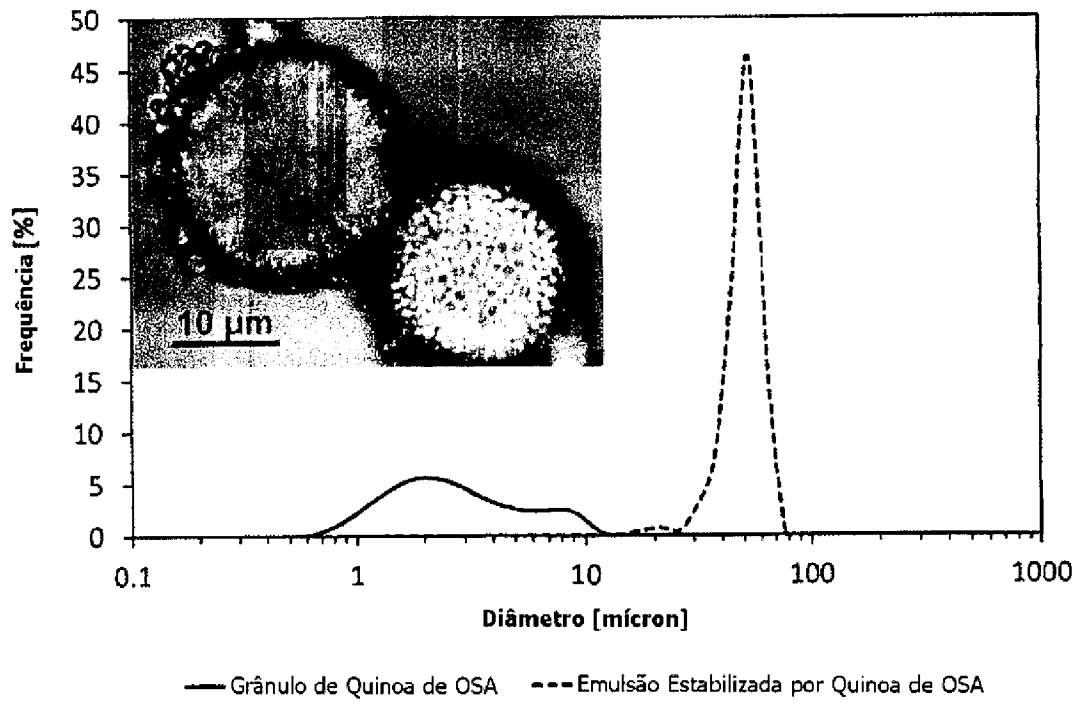


Fig. 1-2

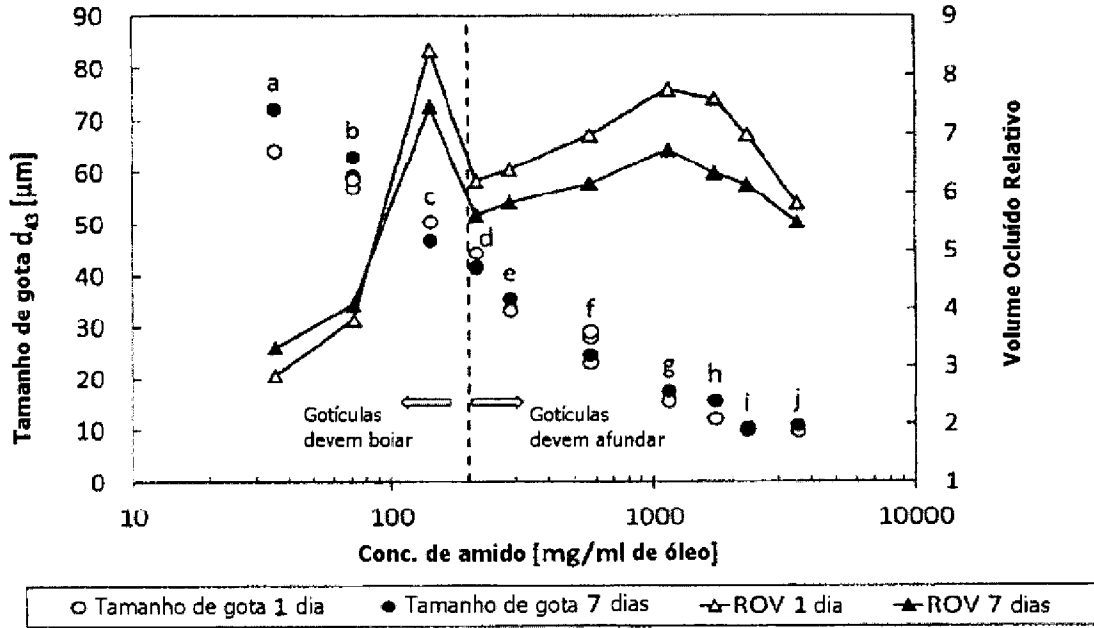


Fig. 1-3

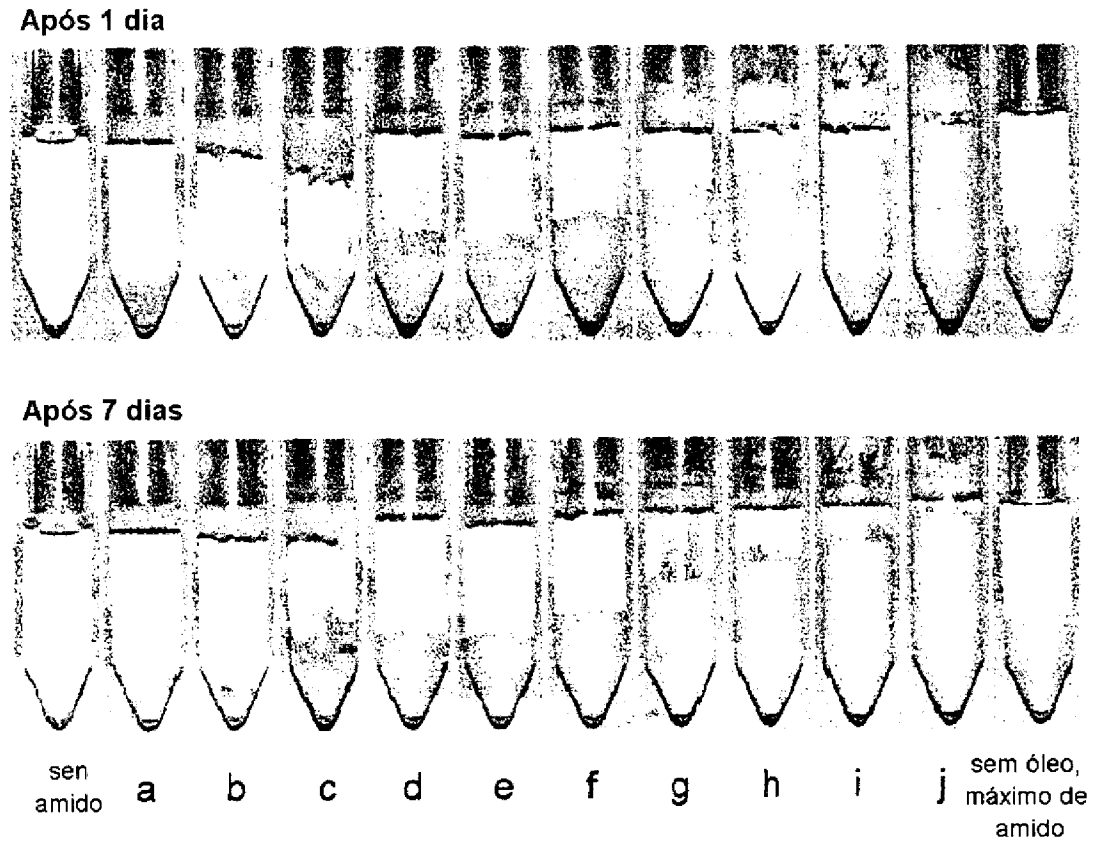


Fig. 2-1

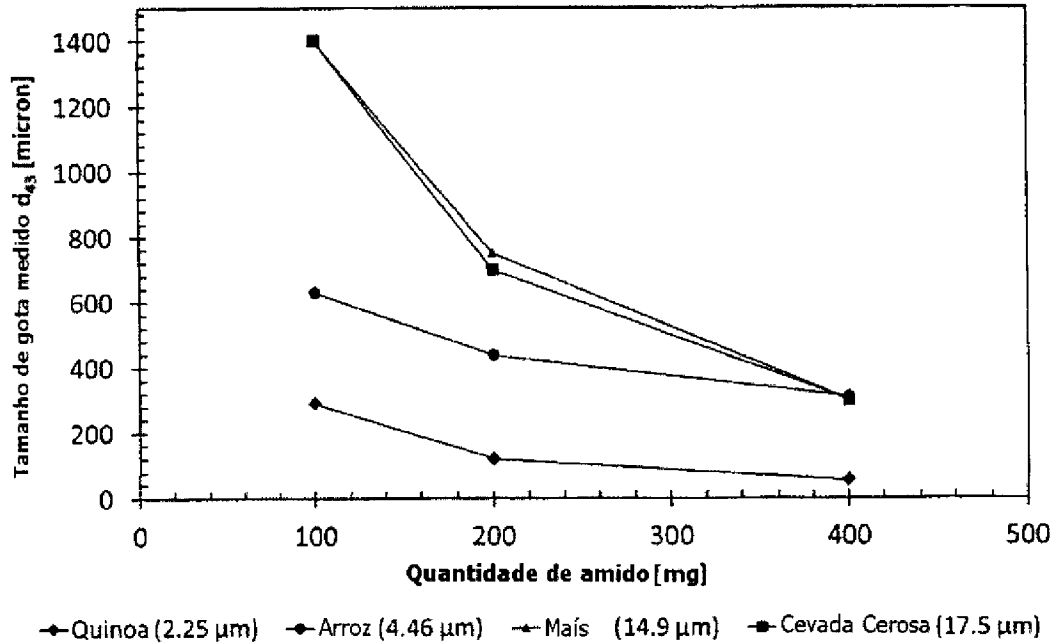


Fig. 2-2

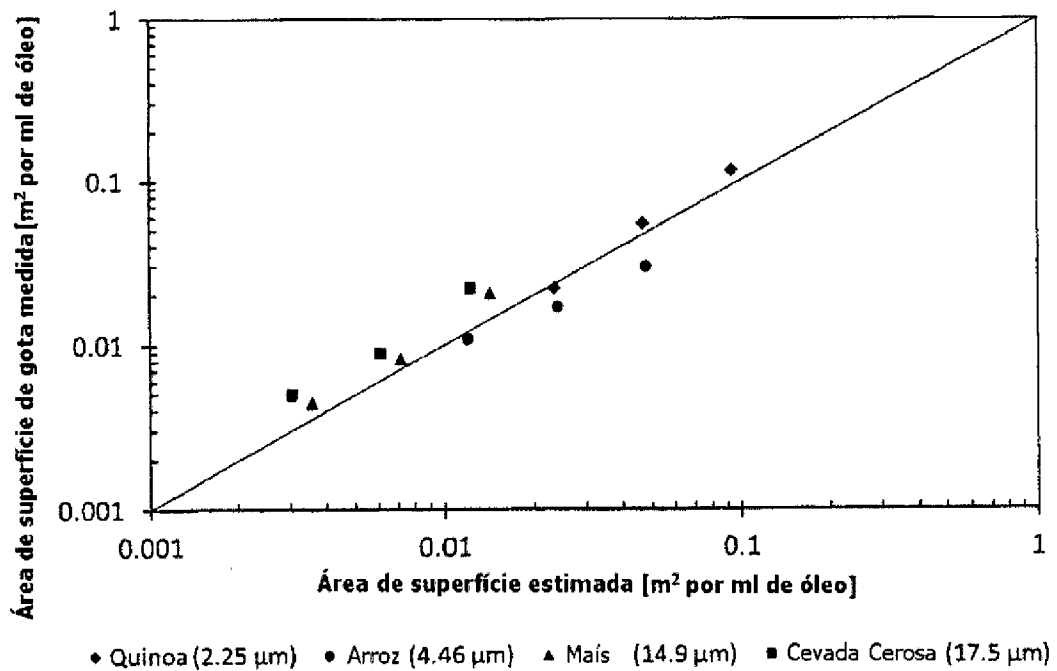


Fig. 3-1

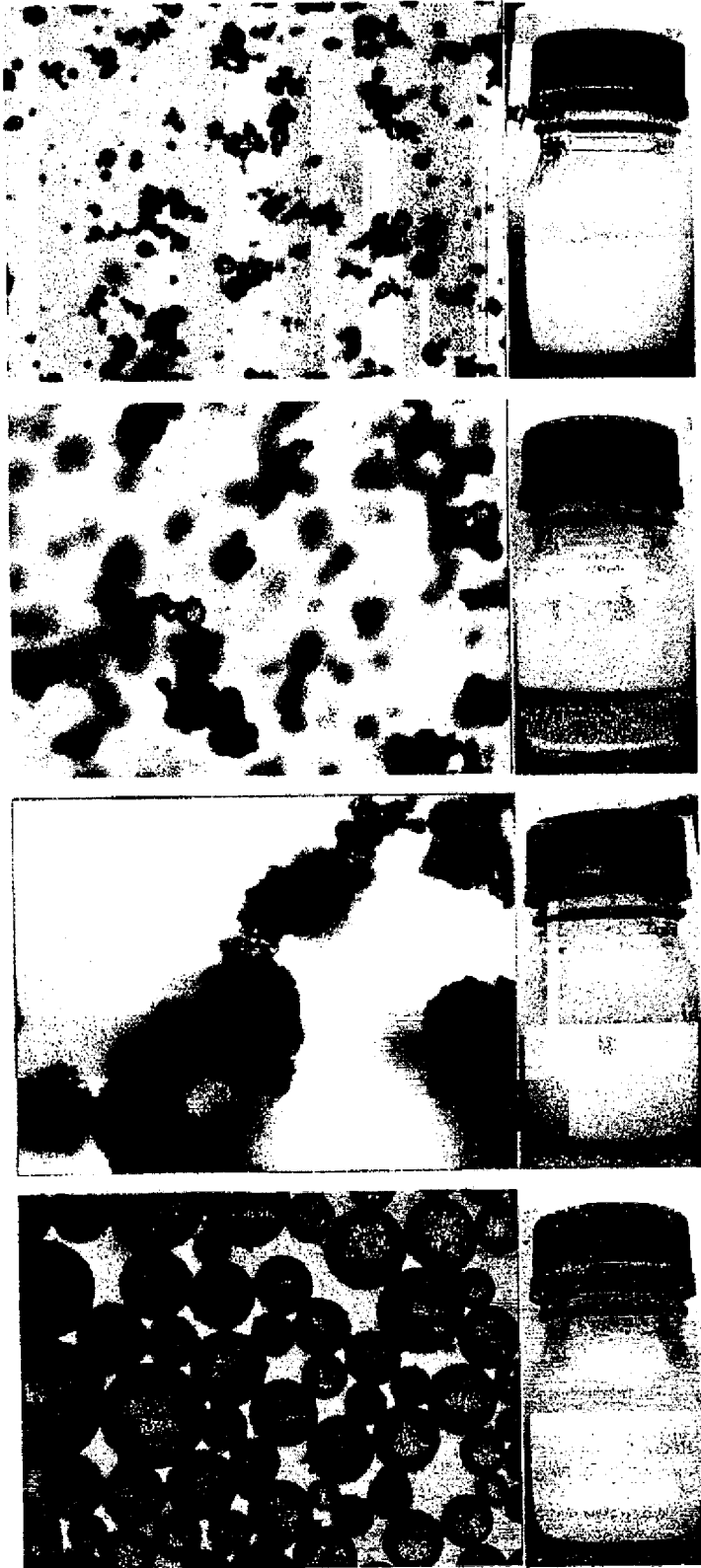


Fig. 4-1

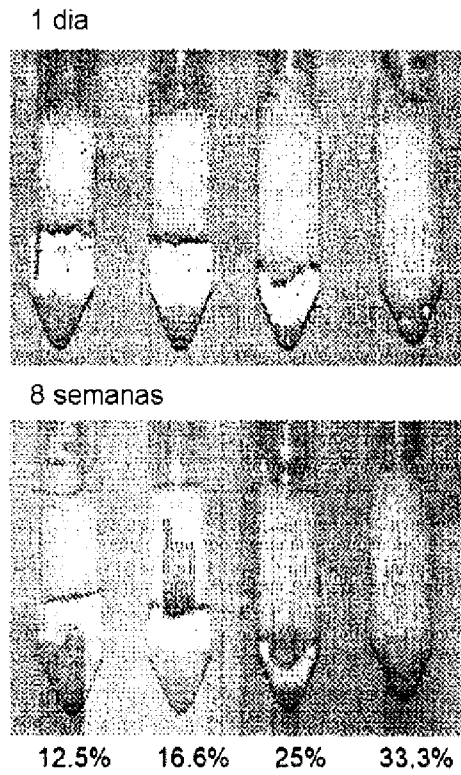


Fig. 4-2

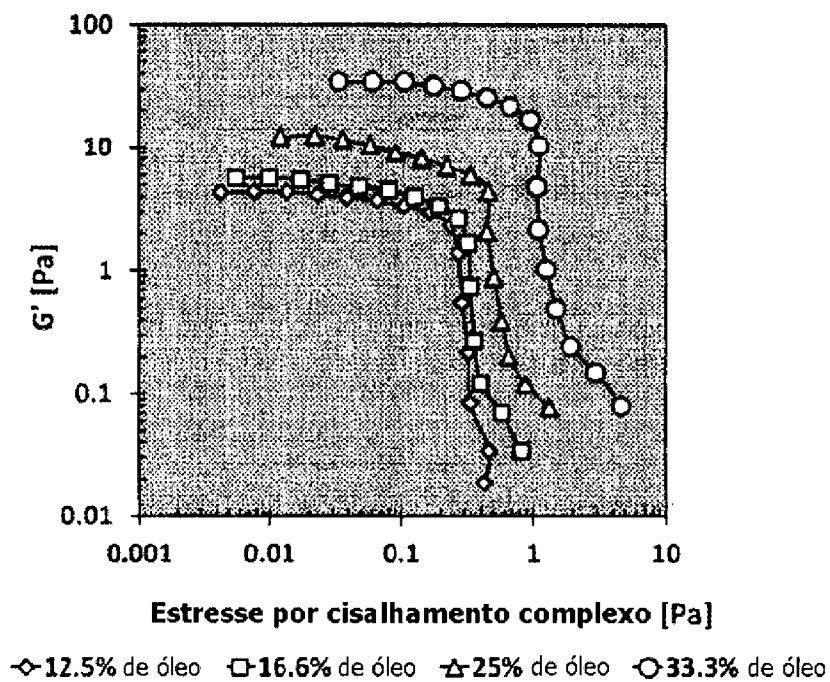


Fig. 5-1

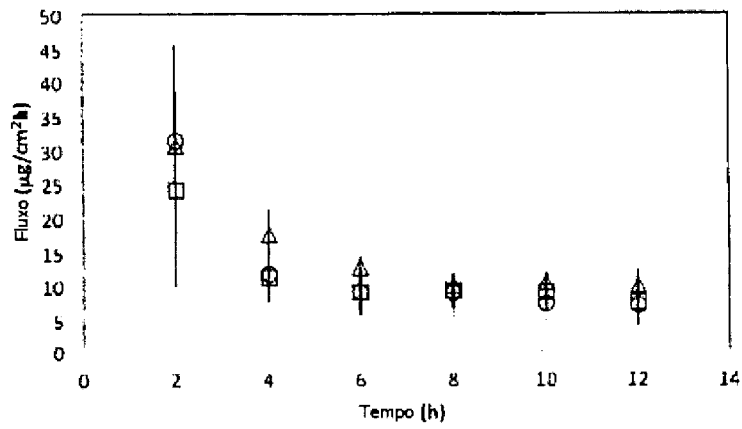


Fig. 6-1

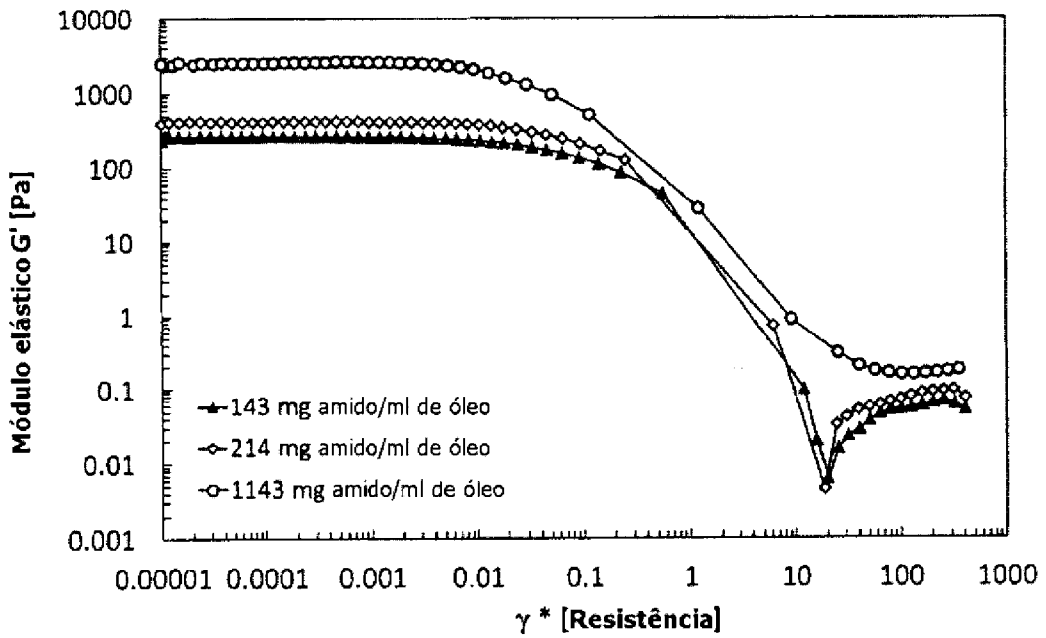


Fig. 7-1

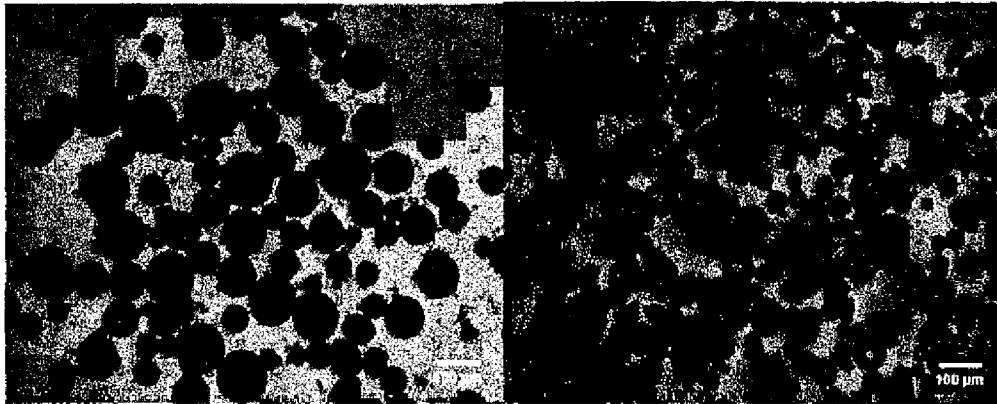
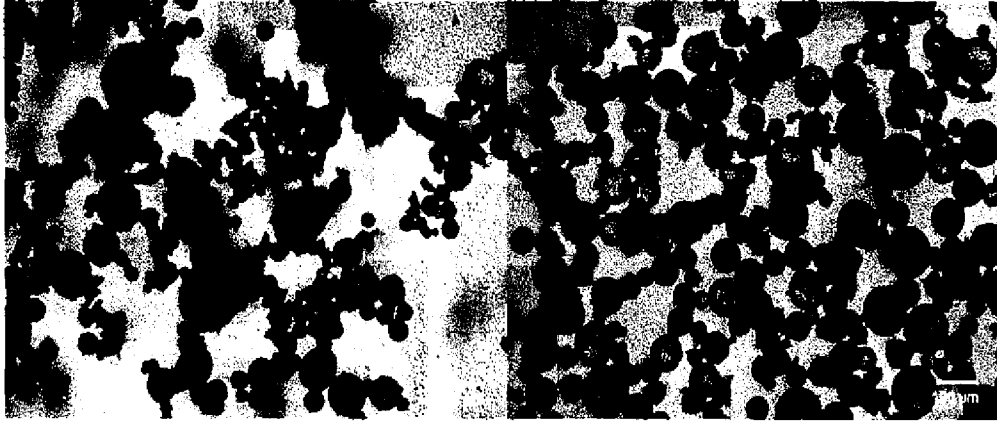


Fig. 7-2

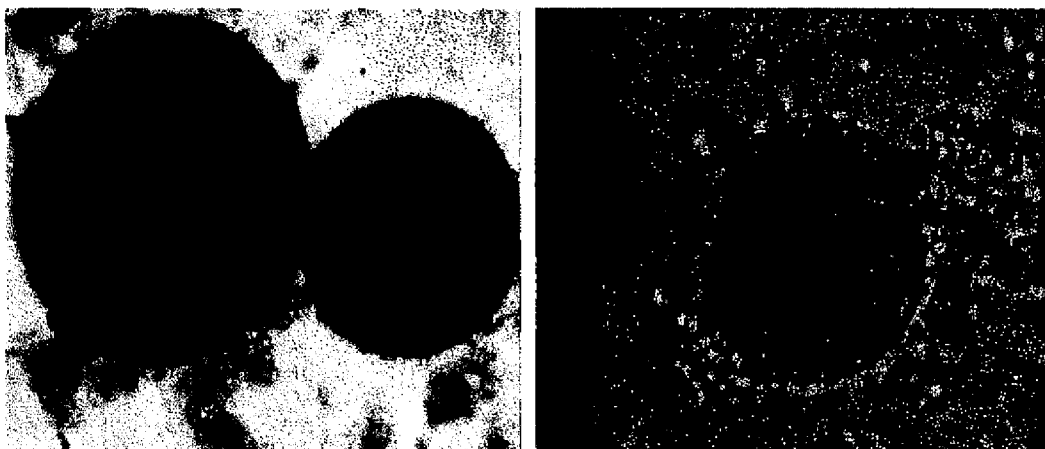


Fig. 7-3

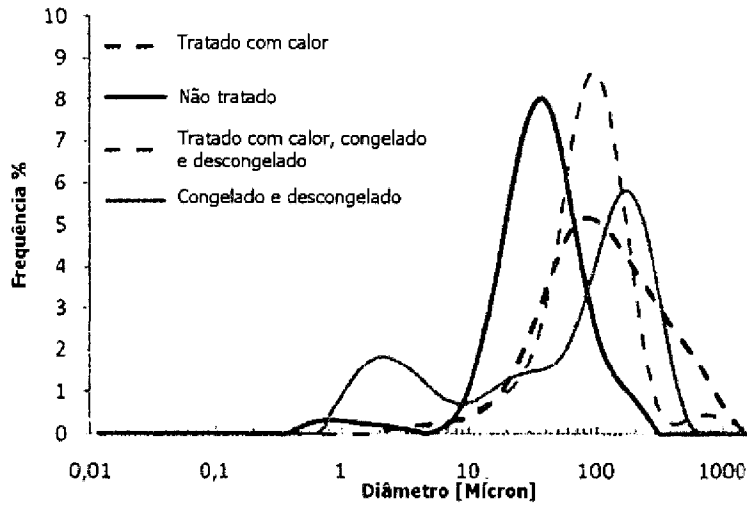


Fig. 8-1



Fig 8-2

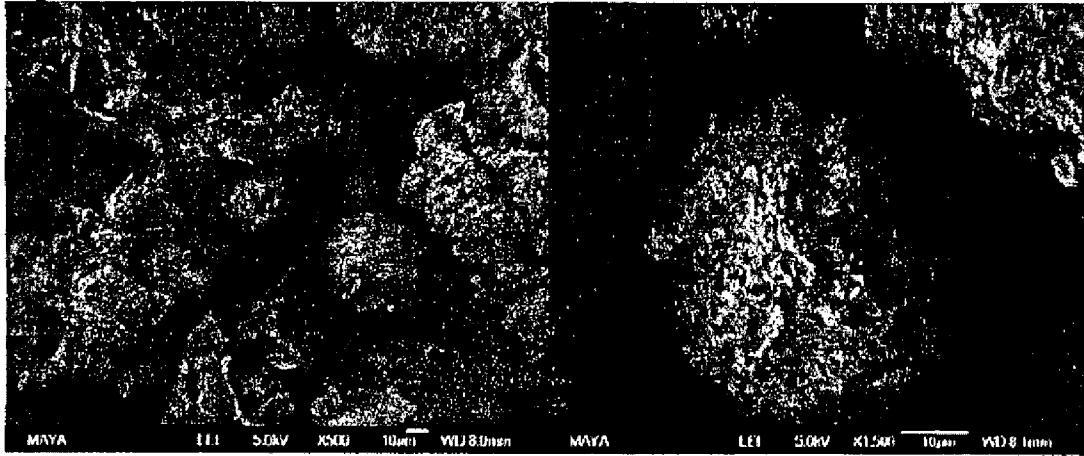


Fig. 8-3

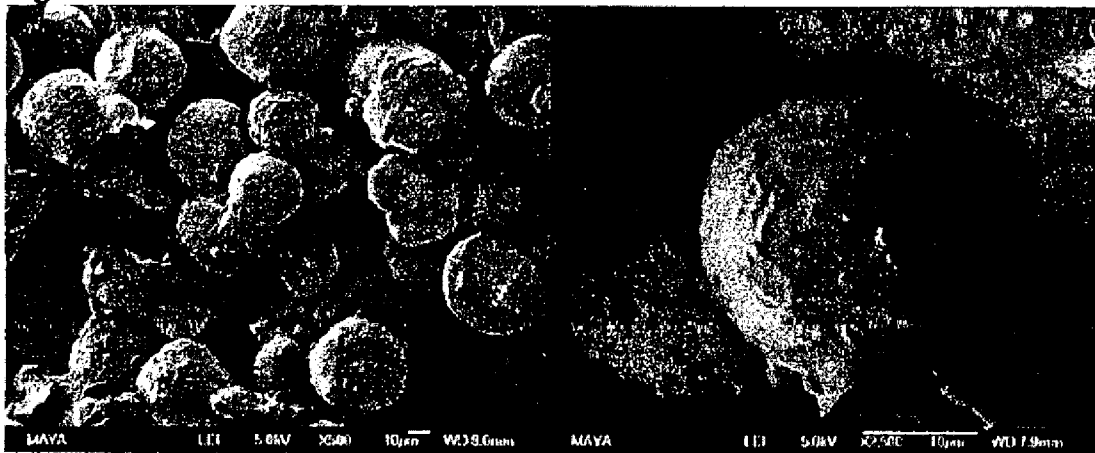


Fig. 8-4

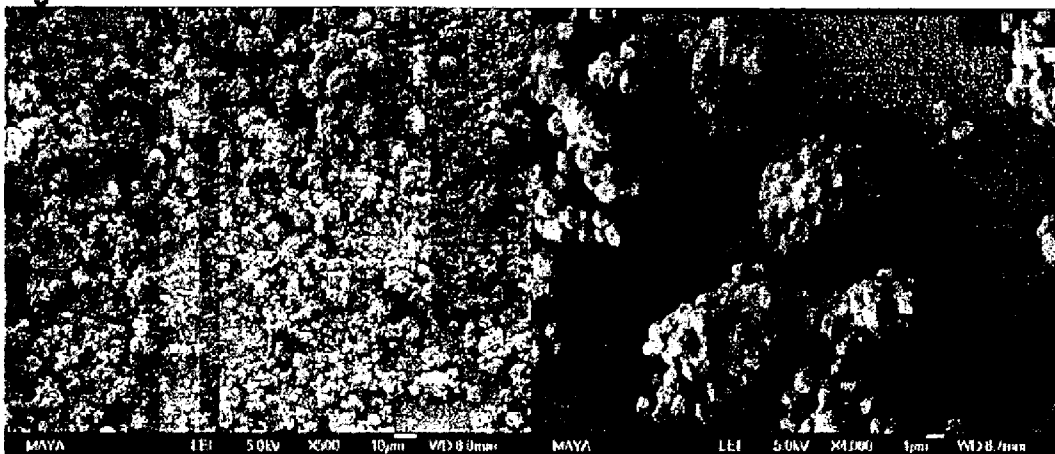


Fig. 8-5

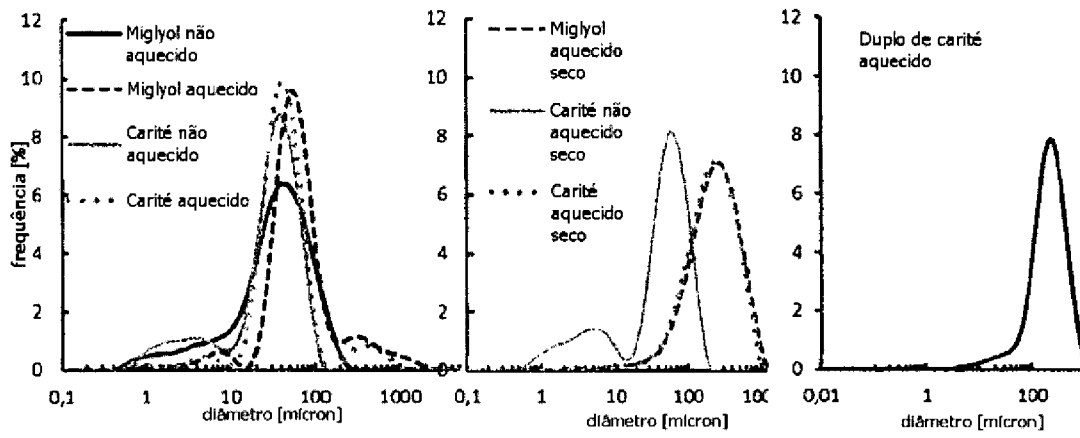
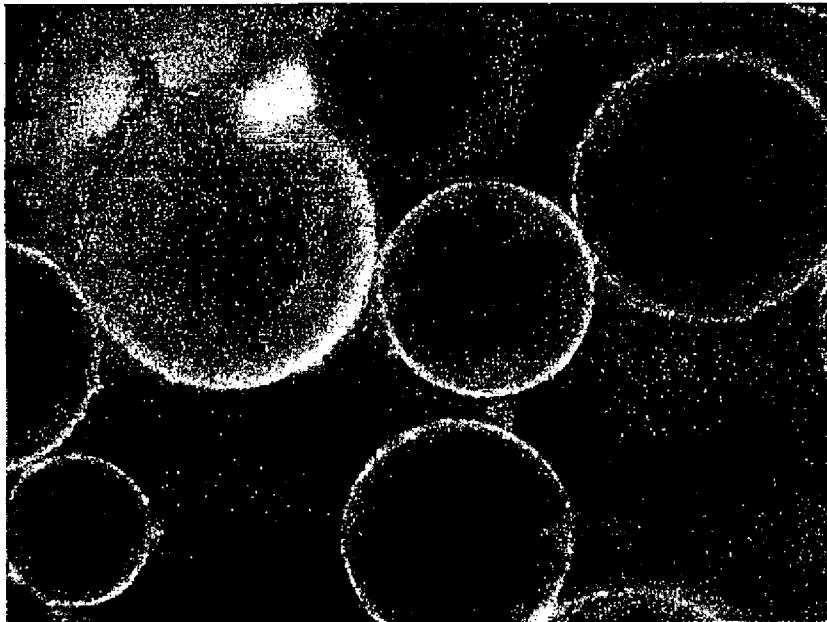


Fig. 9-1



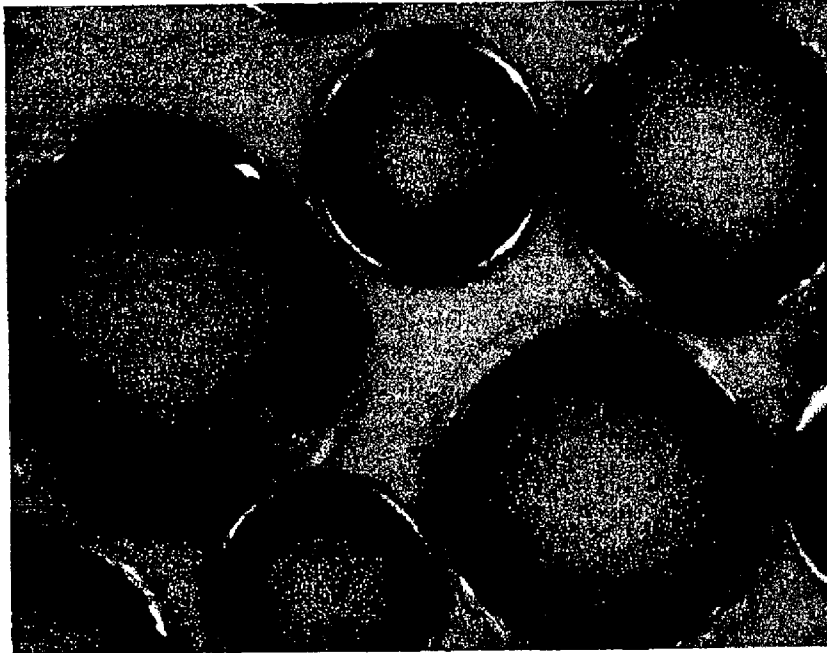


Fig. 9-2

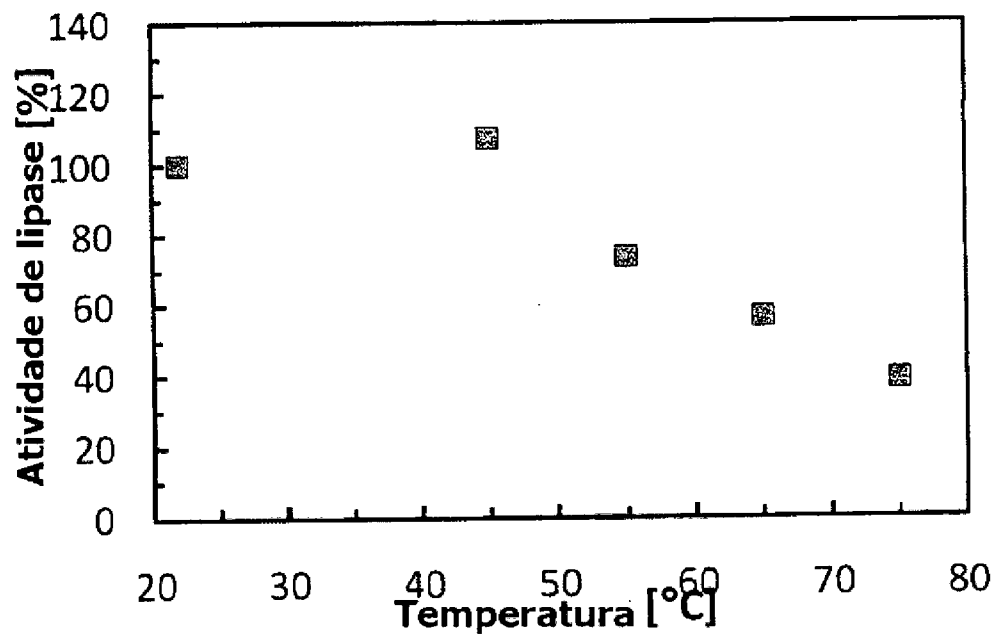


Fig. 10-1

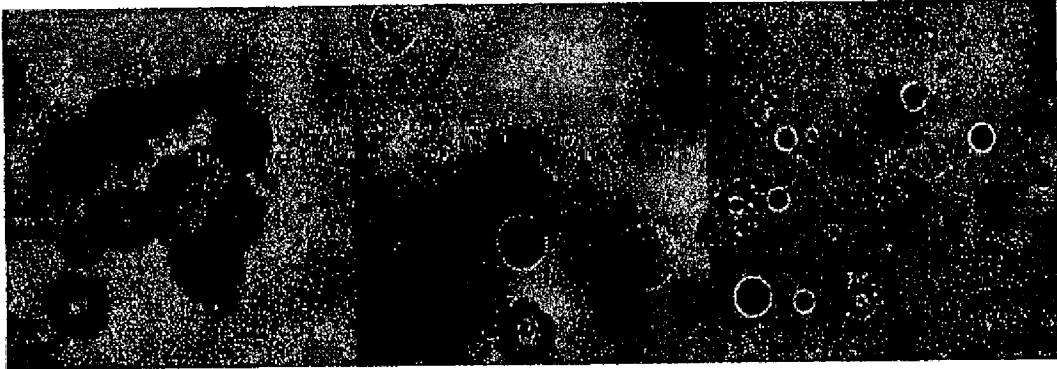


Fig. 11-1

