

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA NOVELO NASCIMENTO BRENAG

**ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEO DE CHIA EM
ÁGUA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE CONCENTRADO
PROTEICO DE SORO DO LEITE**

CAMPO MOURÃO

2023

JÉSSICA NOVELO NASCIMENTO BRENAG

**ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEO DE CHIA EM
ÁGUA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE CONCENTRADO
PROTEICO DE SORO DO LEITE**

**Stabilization of chia oil-water emulsions using whey protein concentrate
nanoparticles**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CAMPO MOURÃO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



JESSICA NOVELO NASCIMENTO BRENAG

**ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEO DE CHIA EM ÁGUA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE
CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DO LEITE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 10 de Outubro de 2023

Dr. Odinei Hess Goncalves, Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina (Ufsc)

Dra. Jessica Thais Do Prado Silva, Doutorado - Usp-Universidade de São Paulo

Dra. Rosana Aparecida Da Silva Buzanello, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 10/10/2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre estar me abençoando com mais do que mereço e preciso, por plantar em meu coração sonhos e me dar forças para conquistá-los. E Nossa Senhora e São Miguel Arcanjo, por todo auxílio, bondade e sabedoria.

Agradeço a minha mãe, Clarice, por sempre ter me incentivado para com os estudos.

Ao meu esposo, Gustavo, por todo companheirismo e ajuda, por desempenhar um papel fundamental para com a realização deste mestrado.

À toda minha família, por se fazerem presentes mesmo que não fisicamente. Agradeço por serem aquilo de mais valioso que um ser pode ter.

Agradeço ao meu orientador pro. Dr. Odinei, por toda ajuda, paciência e parceria durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu coorientador prof. Dr. Rilton, por toda ajuda, parceria e por me receber tão bem em seu laboratório.

Agradeço aos alunos do laboratório Biopol que me auxiliaram com todas as análises realizadas na UFPR, com muita paciência e compreensão.

Agradeço a todos os professores do PPGTA, por contribuírem para com meu crescimento profissional. Em especial a prof. Dr. (a) Fernanda, por sempre estar presente e auxiliar em tudo que era necessário.

A prof. Dr.(a) Rosana, por sua contribuição desde o pré projeto.

A Dr.(a) Jéssica Thaís pela disponibilidade e contribuição para com o trabalho.

Agradeço a todos que fizeram parte desta jornada, seja na universidade ou nos laboratórios, em especial a Poliana que sempre esteve presente, nos altos e baixos desta jornada. A Amarilis, Valéria, Anielle e Alice, por toda ajuda e parceria.

As alunas de IC Byanca e Gabriele por toda colaboração.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Brasil - Código de Financiamento 001. A UTFPR, ao laboratório Multiusuário (Lab-Multi) e ao laboratório Biopol da UFPR.

RESUMO

Emulsões são sistemas multifásicos termodinamicamente instáveis ou metaestáveis que necessitam de agentes que promovam sua estabilização. Nanopartículas (NPs) podem ser utilizadas para estabilizar emulsões, o que é o caso das emulsões de Pickering. Nelas, a estabilização ocorre por meio de partículas sólidas e não por surfactantes, como ocorreria num sistema emulsionado convencional. A formulação de alimentos contendo óleos estabilizados por nanopartículas sólidas vem ao encontro da demanda por alimentos mais saudáveis e com o mínimo de aditivos, e uma opção promissora de material usado para produção de partículas sólidas com esta finalidade é o concentrado proteico do soro do leite (*whey protein concentrate*, WPC). Contudo, estudos no sentido de avaliar o potencial de estabilização de emulsões de óleos alimentícios necessitam de aprofundamento. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo obter NPs de WPC com e sem adição de reticulantes (ácido cítrico e tânico) e estudar a aplicação das NPs na estabilização de emulsões de Pickering. Verificou-se que o ácido tânico foi o reticulante que promoveu maior teor de reticulação ($96,9 \pm 2,96\%$), que pode estar associado ao maior número de grupamentos hidroxila presentes no mesmo. Quanto a caracterização das NPs, estas apresentaram formatos esféricos e com tamanhos próximos entre os grupos de amostras, sendo que, o ultrassom no tempo de 1 minuto não influenciou nas características das mesmas. Diferentemente do pH (faixa de 2 – 9), o qual exerceu efeito sob o diâmetro, PDI e potencial zeta das amostras, tamanhos maiores foram observados em toda a faixa de pH nas amostras reticuladas com ácido tânico, e o aumento da alcalinidade do meio resultou em cargas superficiais mais negativas para todas as amostras. A adição de NaCl (0,1-0,6 mol/L) também resultou em alterações nas nanopartículas, de modo que, com o aumento da concentração deste sal, menor foi a magnitude do potencial zeta, indicando menor estabilidade. Na análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram encontradas bandas que indicam a reticulação das amostras. Posteriormente, foram produzidas emulsões de Pickering em diferentes concentrações de NPs (0,1, 0,5, 1 e 2%) e proporções de óleo (80:20, 50:50 e 20:80 água:óleo), sendo a microscopia e reologia avaliadas logo após a formulação das mesmas e a sua estabilidade macroscópica foi avaliada por 9 dias. As análises reológicas indicaram que as amostras possuem comportamento não newtoniano pseudoplástico, pois, a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento e que as emulsões com a adição de nanopartículas apresentaram maior viscosidade quando comparadas com as amostras sem a adição de nanopartículas. Foi possível verificar que as nanopartículas reticuladas com ácido tânico conferiram boa estabilidade de armazenamento para emulsões com a fração de 80:20 (água:óleo) e na concentração de 2 e 1%, pois não houve separação macroscópica durante os 9 dias avaliados. Os resultados indicaram que as nanopartículas produzidas possuem capacidade emulsificante, encorajado pesquisas posteriores sobre seu uso na obtenção de emulsões alimentícias.

Palavras-chave: Emulsões de Pickering; Partículas Sólidas; Reticulação; Ácidos Orgânicos; PUFAs.

ABSTRACT

Emulsions are thermodynamically unstable or metastable multiphase systems that require agents to promote their stabilization. Nanoparticles (NPs) can be used to stabilize emulsions, as is the case with Pickering emulsions. In these emulsions, stabilization occurs through solid particles rather than surfactants, as in a conventional emulsified system. The formulation of food products containing oils stabilized by solid nanoparticles aligns with the demand for healthier, additive-minimized foods. A promising option for producing solid particles for this purpose is whey protein concentrate (WPC). However, studies aimed at evaluating the potential for stabilizing food oil emulsions require further investigation. This study aimed to obtain WPC NPs with and without the addition of cross-linking agents (citric acid and tannic acid) and study the application of these NPs in Pickering emulsion stabilization. It was found that tannic acid was the cross-linking agent that promoted the highest degree of cross-linking ($96.9 \pm 2.96\%$), which may be associated with a higher number of hydroxyl groups present in it. As for the characterization of NPs, they exhibited spherical shapes with similar sizes among the sample groups. Ultrasonication for 1 minute did not influence their characteristics. Unlike pH (in the range of 2-9), which affected diameter, polydispersity index (PDI), and zeta potential of the samples, larger sizes were observed across the entire pH range in samples cross-linked with tannic acid. An increase in alkalinity resulted in more negative surface charges for all samples. The addition of NaCl (0.1-0.6 mol/L) also led to changes in the nanoparticles, with a higher salt concentration reducing the magnitude of the zeta potential, indicating lower stability. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis revealed bands indicating cross-linking of the samples. Subsequently, Pickering emulsions were prepared with different NP concentrations (0.1, 0.5, 1, and 2%) and oil ratios (80:20, 50:50, and 20:80 water-to-oil), with microscopy and rheology assessed immediately after formulation. The macroscopic stability was evaluated over 9 days. Rheological analyses indicated that the samples exhibited non-Newtonian pseudoplastic behavior, as viscosity decreased with increasing shear rate. Emulsions with the addition of nanoparticles showed higher viscosity compared to samples without nanoparticles. It was observed that tannic acid-cross-linked nanoparticles provided good storage stability for emulsions with an 80:20 (water-to-oil) fraction and at concentrations of 2% and 1%, as there was no macroscopic separation during the 9-day evaluation period. The results indicated that the produced nanoparticles have emulsifying capacity, encouraging further research on their use in the production of food emulsions.

Keywords: Pickering emulsions; Solid Particles; Reticulation; Organic Acids; PUFAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos mecanismos de desestabilização de uma emulsão óleo-água. ...	14
Figura 2 - Mecanismos de adesão das partículas ao redor das gotas de óleo.	15
Figura 3 - Barreira física formada por proteínas ao redor de gotícula de óleo.	18
Figura 4 - Ácido tânico em pó.	21
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do ácido tânico.	22
Figura 6 - Ácido cítrico.	22
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura química do ácido cítrico.	23
Figura 8 - Flores e sementes da <i>Salvia hispanica</i> L.	23
Figura 9 - Óleo de chia.	24
Figura 10 - Esquema do processo de obtenção das emulsões com nanopartículas.	32
Figura 11 - Reticulação para as amostras de nanopartículas em relação ao tempo em 80 °C sem reticulantes (WPC), reticuladas com ácido cítrico (NPs ret. ác. cítrico) e reticuladas com ácido tânico (NPs ret. ác. tânico).....	35
Figura 12 - Micrografias e representação tridimensional obtidas a partir de AFM (a barra de escala representa 100 nm).....	36
Figura 13 - Efeito do pH sobre o potencial zeta das nanopartículas.	41
Figura 14 - Efeito da adição de NaCl no potencial zeta das nanopartículas.	43
Figura 15 - Curvas de DTA para as nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) com e sem adição de ácido cítrico ou tânico.	44
Figura 16 - Curvas termogravimétricas para as nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) com e sem adição de ácido cítrico ou tânico.	45
Figura 17 - Espectros de FTIR para as nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) sem reticulação e com reticulação por ácido cítrico ou ácido tânico.	46
Figura 18 - Varredura de frequência (80:20 w/o, 2% de nanopartículas e sem a adição se nanopartículas).....	50
Figura 19 - Curvas de fluxo das emulsões com e sem a adição de nanopartículas nas concentrações de 2%.	52
Figura 20 - Emulsões sem adição de nanopartículas (NPs) (branco) (barra representa 10µm.).	53
Figura 21 - Emulsões com NPs WPC (sem adição de reticulantes).....	53
Figura 22 - Emulsões com NPs reticuladas com ácido tânico.....	54

Figura 23 - Histogramas obtidos através dos dados de distribuição de tamanhos para emulsões sem adição de NPs (branco).	55
Figura 24 - Histogramas obtidos através dos dados de distribuição de tamanhos para emulsões com adição de NPs WPC (sem adição de reticulantes).	56
Figura 25 - Histogramas obtidos através dos dados de distribuição de tamanhos para emulsões com adição de NPs reticuladas com ácido tânico.	57
Figura 26 - Estabilidade ao longo do tempo para diferentes frações de óleo e água e concentrações de nanopartículas WPC (sem adição de reticulantes).	60
Figura 27 - Estabilidade ao longo do tempo para diferentes frações de óleo e água e.....	62
Figura 28 - Imagens das emulsões branco (água e óleo) ao longo do tempo com diferentes frações de óleo.	63
Figura 29 - Imagens das emulsões ao longo do tempo com diferentes concentrações de nanopartículas (NPs) WPC (sem reticulantes) e em diferentes frações de óleo.	63
Figura 30 - Imagens das emulsões ao longo do tempo com diferentes concentrações de nanopartículas (NPs) de ácido tânico e em diferentes frações de óleo.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido Cítrico
AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i>)
ALA	Ácido α -linolênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Ácido Tânico
BIOPOL	Laboratório de Biopolímeros e Coloides
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (do inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DTA	Análise Térmica Diferencial (do inglês, <i>Diferensial termal analysis</i>)
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LA	Ácido Linoleico
NPs	Nanopartículas
PDI	Índice de Polidispersidade (do inglês, <i>Polydispersity Index</i>)
PUFAs	Ácidos Graxos Poli-insaturados
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês, <i>Thermogravimetric Analysis</i>)
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
WP	Proteína do Soro de Leite (do inglês, <i>Whey Protein</i>)
WPC	Concentrado Proteico de Soro do Leite (do inglês, <i>Whey Protein Concentrate</i>)
WPI	Isolado de Proteína de Soro do Leite (do inglês, <i>Whey Protein Isolate</i>)
W/O	Água/Óleo (do inglês, <i>water/oil</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
°C	Grau Celsius
°C.min ⁻¹	Grau Celsius por minuto
cm	Centímetro
µm	Micrômetro
g mol ⁻¹	Gramas por mol
g	Gramas
g.L ⁻¹	Gramas por litro
G'	Módulo elástico/armazenamento
G''	Módulo viscoso/perda
Hz	Hertz
kHz	Quilohertz
mg	Miligrama
min	Minutos
mL min ⁻¹	Mililitro por minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mol.L ⁻¹	Mol por litro
mV	Milivolts
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
τ	Tensão de cisalhamento
V	Volt
W	Watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Emulsões.....	13
3.2 Emulsões de Pickering	15
3.3 Proteína do soro do leite	17
3.4 Reticulação	20
3.5 Óleo de Chia.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Materiais	26
4.2 Elaboração das nanopartículas	26
4.3 Caracterização das nanopartículas.....	28
4.3.1 Cinética de reticulação	28
4.3.2 Microscopia de força atômica (AFM).....	28
4.3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	29
4.3.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas antes e após tratamento com ultrassom	29
4.3.3.2 Influência do pH no potencial zeta e Determinação do Ponto Isoelétrico (PI)	29
4.3.3.3 Determinação do diâmetro hidrodinâmico em função do pH em diferentes faixas	29
4.3.3.4 Efeito da força iônica	30
4.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA).....	30
4.3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	30
4.4 Caracterização do óleo de chia	31
4.5 Elaboração e caracterização das emulsões de Pickering	31
4.5.1 Reologia das emulsões	32
4.5.2 Análise microscópica das emulsões	33
4.5.3 Análise macroscópica das emulsões.....	33
4.6 Análise estatística	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Caracterização das nanopartículas.....	35
5.1.1 Cinética de reticulação	35
5.1.1 Caracterização morfológica e de estabilidade das nanopartículas.....	36
5.1.4 Caracterização térmica e espectroscópica das nanopartículas.....	44

5.2 Caracterização do óleo de chia.....	47
5.3 Caracterização das emulsões de Pickering.....	50
5.3.1 Reologia	50
5.3.2 Análise microscópica	53
5.3.3 Análise macroscópica das emulsões.....	60
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a demanda por alimentos com benefícios adicionais à saúde aumentou, decorrente da conscientização das pessoas acerca do impacto da dieta na saúde e pela busca de maior qualidade de vida. Produtos alimentícios enriquecidos com aditivos que impactam positivamente na saúde estão sendo cada vez mais procurados, contudo, um fator limitante é que as substâncias bioativas utilizadas para este fim podem ser quimicamente instáveis, sensíveis e suscetíveis à degradação. Tecnologias estão em desenvolvimento para aumentar a aplicabilidade, estabilidade e para preservar a qualidade e vida útil destas substâncias em produtos alimentícios, sendo uma delas os sistemas emulsionados ou emulsões.

Emulsões são sistemas heterogêneos formados por duas ou mais fases líquidas imiscíveis que são estabilizadas por meio de agentes emulsificantes (Xu *et al.*, 2022; Yue *et al.*, 2022). Uma forma de estabilizar emulsões é por meio de partículas de Pickering, onde a estabilização ocorre através de partículas sólidas (Lam; Nickerson, 2013; Xu *et al.*, 2022). Tais partículas tem se mostrado uma opção viável para superar estas limitações (Carmo; Fernandes; Borges, 2015; Julio *et al.*, 2015; Mohd Ali *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2021; Tatar Turan; Cengiz; Kahyaoglu, 2015).

As substâncias químicas chamadas de emulsificantes, emulsionantes, tensoativos ou surfactantes são aquelas com a capacidade de atuar na formação ou na manutenção de uma dispersão homogênea de duas ou mais fases imiscíveis (Brasil, 1997). Em geral, tais moléculas possuem características anfífilas com uma porção polar (responsável por interagir com a água e outros líquidos polares) e uma porção apolar (responsável por interagir com lipídios e outros líquidos apolares). Além do mais, estão entre os aditivos mais utilizados na indústria de alimentos, devido às propriedades fundamentais para o processamento de alimentos.

Segundo o relatório publicado na *Market Research* pela editora Syngene Research LLP (2022), a análise global do mercado de emulsificantes em alimentos indica que a estimativa é de que o mercado atinja US\$ 4,27 bilhões até 2028, o que representa um crescimento estimado de 8,4% entre 2021 e 2028. Com base no apresentado, fica demonstrado o quão promissor é o desenvolvimento de novos emulsificantes para o mercado.

Uma maneira de elaborar emulsões é por meio das emulsões de Pickering, ou seja, através da estabilização gerada por nanopartículas. As emulsões de Pickering são cada vez mais estudadas devido ao crescimento da demanda por produtos com rótulos “limpos”, visto que, nestas há a ausência de surfactantes sintéticos e conseqüentemente uma menor toxicidade, devido à substituição por partículas de grau alimentício (Li *et al.*, 2022b). Neste tipo de

emulsão, partículas sólidas são os agentes de estabilização, de forma que as partículas se depositam na interface das gotículas da fase dispersa, formando uma barreira física contra eventos que tendem a desestabilizar a emulsão (Ge *et al.*, 2022; Geng *et al.*, 2021; Yue *et al.*, 2022).

Partículas sólidas são utilizadas como uma alternativa aos emulsificantes tradicionais e também como carreadores de substâncias. O seu tamanho usualmente está em escala micrométrica ou nanométrica, sendo então classificadas como micropartículas ou nanopartículas, respectivamente (Talele *et al.*, 2022). Diversos tipos de materiais de origem alimentícia e diferentes técnicas vem sendo utilizadas para o desenvolvimento dessas partículas, como por exemplo, partículas de amido (Tan *et al.*, 2012), grão de bico (Papalamprou; Doxastakis; Kiosseoglou, 2010), zeína e gliadina (Liu *et al.*, 2019), bagaço de maçã (Lu *et al.*, 2020), proteína de soja (Liu; Ou; Tang, 2017), isolado de proteína do soro do leite (Wu *et al.*, 2015) e concentrado proteico do soro do leite (Noello *et al.*, 2016).

A proteína do soro do leite possui alto valor nutricional e devido à sua composição em aminoácidos essenciais, uma vez que o organismo não consegue produzi-los e que pode ser obtido por meio da alimentação. É uma fonte animal não tóxica, com baixo custo e abundante, e a sua natureza anfifílica e propriedades emulsificantes proporcionam uma proteção física através da formação de uma barreira de proteção ao redor das gotículas de óleo, estabilizando estas gotículas em emulsões (Abdel-Wahhab *et al.*, 2021; Ge *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022; Moghaddam *et al.*, 2021; Nayak *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2022; Shakoury *et al.*, 2022).

O óleo de chia é um produto que vem sendo cada vez mais consumido devido à sua composição rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), sobretudo os ácidos alfa-linolênico e linoleico, que são precursores do ômega-3 (ω -3) e o ômega-6 (ω -6) respectivamente. Esses ácidos graxos são considerados essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados pelo organismo e devem ser ingeridos a partir de fontes externas (Cavalli *et al.*, 2021; Firtin *et al.*, 2020). Além disso, seus efeitos positivos sobre a saúde tem sido extensivamente demonstrados como por exemplo, o fornecimento de suporte energético para a manutenção das funções dos órgãos e efeitos anti-inflamatórios proporcionados principalmente pelas altas concentrações de ω -3 (Gutiérrez; Svahn; Johansson, 2019). Contudo, esses mesmos ácidos graxos possuem baixa estabilidade quando comparados aos ácidos graxos saturados, o que se torna um fator limitante do seu uso em maior escala (Copado *et al.*, 2022; Noello *et al.*, 2016).

Uma alternativa para contornar esse desafio é a estabilização do óleo por meio de partículas sólidas, ou seja, através das emulsões de Pickering. Essa estratégia tem demonstrado

resultados positivos no sentido de proteger e reduzir a degradação de compostos sensíveis, diminuir ou retardar o processo oxidativo, a perda das funções biológicas e de características sensoriais (Chevalier; Bolzinger, 2013; Marineli *et al.*, 2014; Noello *et al.*, 2016; Reis; Ambrosi; Luccio, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estabilizar emulsões de óleo de chia utilizando nanopartículas de concentrado proteico de soro do leite.

2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos deste trabalho:

- Obter nanopartículas de concentrado proteico de soro do leite (*whey protein concentrate*, WPC) utilizando ácido cítrico ou ácido tânico como agentes promotores de reticulação;
- Caracterizar as nanopartículas em relação ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, possíveis interações entre os componentes (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, FTIR), morfologia (microscopia de força atômica/AFM), propriedades térmicas (análise térmica diferencial/DTA e termogravimetria/TGA);
- Determinar a influência do pH e ultrassom no tamanho e potencial zeta das NPs; da força iônica no potencial zeta;
- Caracterizar o óleo de chia em relação à sua composição em ácidos graxos;
- Estabilizar o óleo de chia através de emulsão de Pickering utilizando diferentes concentrações de nanopartículas de WPC reticuladas com ácido tânico comparadas à emulsões sem a adição de nanopartículas (branco) e com a adição de nanopartículas sem reticulação;
- Caracterizar as emulsões em relação à estabilidade de armazenamento, análise macroscópica durante 9 dias, microscópica e reológica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Emulsões

A emulsão líquido-líquido é um sistema disperso formado por duas fases imiscíveis, uma fase é denominada fase interna ou dispersa que se encontra distribuída em uma fase externa ou contínua (X *et al.*, 2022). Emulsões possuem relevância na indústria de alimentos pois, entre outras funções, podem ser utilizadas como meios de fornecer compostos bioativos ao consumidor (Xu *et al.*, 2022; Yue *et al.*, 2022)

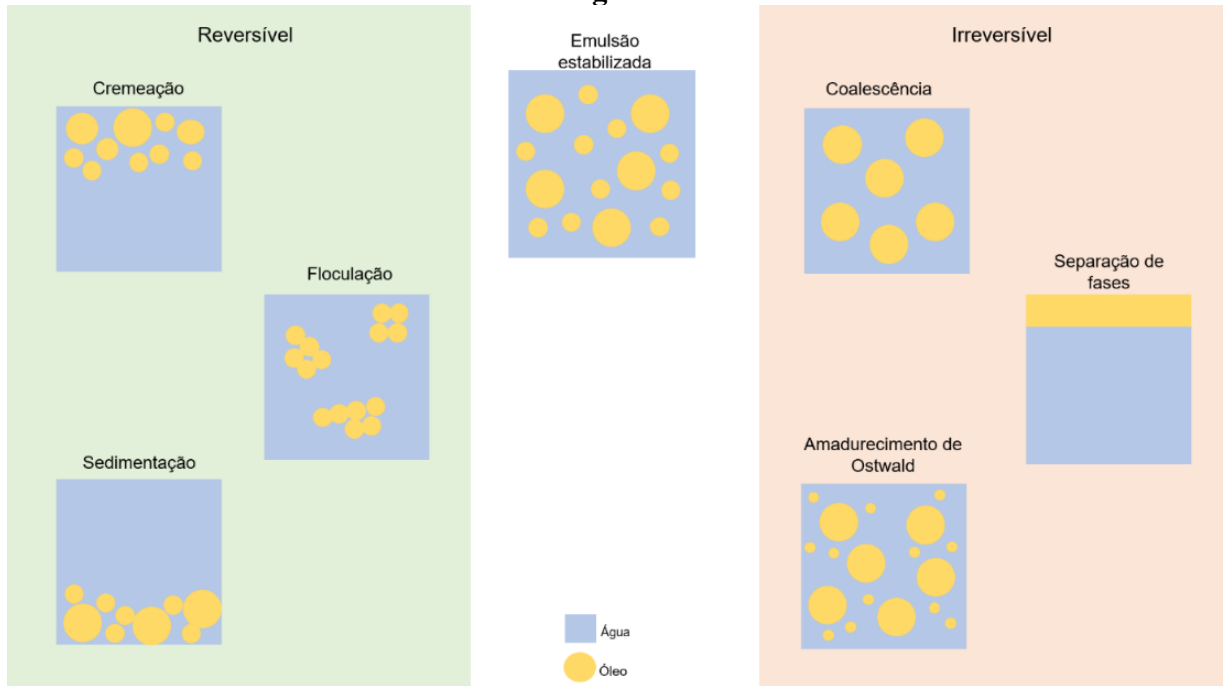
As emulsões tendem a se desestabilizar ao longo do tempo em consequência de mecanismos como a floculação, cremação ou sedimentação, coalescência e amadurecimento de *Ostwald* (*Ostwald Ripening*) (Quadro 1 e Figura 1) (Chen *et al.*, 2022b; Niizawa; Sihufe; Zorrilla, 2021; Ravera *et al.*, 2021).

Quadro 1 - Mecanismos de desestabilização de emulsões.

Processo de desestabilização	Mecanismo
Floculação	Decorre de uma associação fraca entre partículas da emulsão, as gotas formam agregados que resultam na formação de gotículas que mantém a sua integridade da interface, também classificados como flocos. Pode ser revertida através de agitação (com a quebra dos flocos). Contudo, nos casos em que é irreversível, resulta no fenômeno de coalescência das gotículas.
Cremação (cremagem) ou sedimentação	Fenômeno reversível que acontece devido à diferença de densidade entre duas fases, ocasionando migração das gotas para a parte superior (topo) ou inferior (fundo) da emulsão por ação da gravidade. Pode ser revertido por meio de agitação.
Coalescência	Processo irreversível que envolve a fusão de duas ou mais gotas de uma fase resultando na formação de uma única gota. As gotículas da fase dispersa se fundem para formar gotas maiores, esse processo acontece até que ocorra a total separação de fases.
Amadurecimento de <i>Ostwald</i> (<i>Ostwald Ripening</i>)	Processo irreversível que decorre da diminuição do número total de gotículas da fase dispersa e aumento do raio da fase dispersa. As gotículas menores diminuem e acabam desaparecendo, e em contrapartida, as maiores crescem devido a solubilidade da fase dispersa na fase externa. É um mecanismo de difusão de moléculas da fase dispersa pela contínua.

Fonte: Bouyer *et al* (2012) e Franzol; Rezende (2015).

Figura 1 - Representação dos mecanismos de desestabilização de uma emulsão óleo-água.



Fonte: Adaptado de Ravera *et al.* (2021)

Para que se agregue estabilidade à emulsão, a adição de emulsificantes no sistema é uma das estratégias. Embora a estabilidade citada não seja de origem termodinâmica para as emulsões convencionais, estabilizadas com surfactantes moleculares ou partículas, um estado de metaestabilidade pode ser gerado pela barreira física, estérica e/ou repulsiva formada pelas partículas, que conferem uma estabilidade de ordem cinética (Wei *et al.*, 2020).

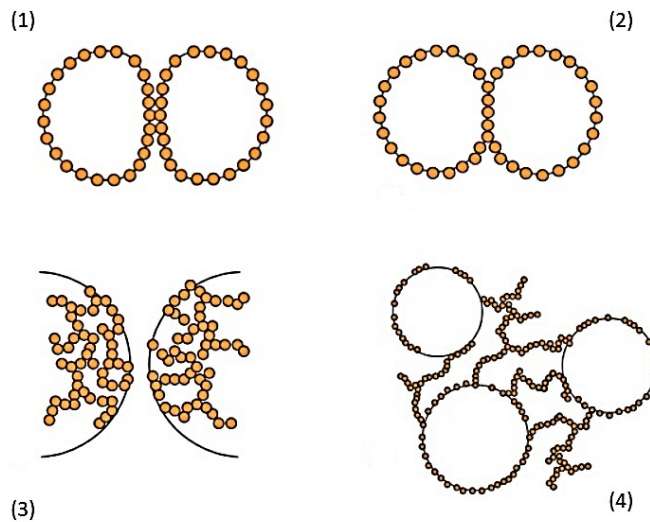
Emulsificantes, tensoativos ou surfactantes (agentes ativos de superfície) são substâncias consideradas aditivos alimentares que reduzem a tensão superficial ou interfacial entre as fases dispersa e contínua. O estado de metaestabilidade da emulsão é gerado através de impedimento estérico e/ou repulsivos, associados à adsorção de surfactantes moleculares à interface (Amaral *et al.*, 2023). São largamente aplicados na indústria de laticínios, confeitaria, panificação, bebidas e em outros setores, posto que afetam as propriedades físico-químicas dos alimentos bem como propriedades tecnológicas como textura e viscosidade (Kim; Wang; Selomulya, 2020). O uso de emulsificantes moleculares naturais é de interesse para a indústria, uma vez que estes podem ser usados para suprir a crescente demanda da população por produtos naturais.

3.2 Emulsões de Pickering

A estabilização por partículas de Pickering foi descrita inicialmente por Ramsden e foi observada e nomeada por Pickering em 1907, consistindo em uma emulsão que é estabilizada por meio de partículas sólidas e pode resultar em estabilidade a longo prazo (Bist *et al.*, 2022; apud Pickering, 1907; Sun *et al.*, 2022). Como as partículas sólidas atuam como emulsificantes, essas emulsões podem ser livres de emulsificantes tradicionais (Ge *et al.*, 2022; Kibbelaar *et al.*, 2022; Tai *et al.*, 2020). É um método que produz emulsões que geralmente possui baixa toxicidade e ecologicamente mais corretas, econômicas e de obtenção relativamente fácil (Ge *et al.*, 2022; Geng *et al.*, 2021; Yue *et al.*, 2022).

O mecanismo de como as partículas se depositam ao redor da gota de óleo pode ocorrer de diferentes maneiras, entre os possíveis mecanismos (Figura 2), encontram-se: (1) recobrimento de toda a superfície da gotícula, (2) formação de “ponte” entre partículas próximas, (3) repulsão através de forças entre as partículas e (4) formação de rede tridimensional entre as partículas.

Figura 2 - Mecanismos de adesão das partículas ao redor das gotas de óleo.



Fonte: Pires (2020).

Este tipo de emulsão possui vantagens em comparação com emulsões utilizando emulsificantes convencionais, entre elas a alta estabilidade, menor ocorrência de difusão na superfície da fase dispersa e elevada resistência à coalescência. Vale ressaltar que as partículas sólidas devem apresentar boa molhabilidade com a fase oleosa e com a fase aquosa (Ge *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2022). Ademais, em aplicações alimentícias as nanopartículas usadas na

formulação de emulsão de Pickering possuem vários potenciais usos, como por exemplo, atuar como encapsulante de compostos bioativos e na elaboração de produtos com baixo teor de gordura (Hu *et al.*, 2016b; Jafari *et al.*, 2020; Keramat; Kheynoor; Golmakani, 2022; Matsumiya; Murray, 2016).

Uma área importante para o estudo de emulsões é a reologia, a qual é ciência que estuda a deformação e escoamento da matéria permite que informações quanto a forma como um material reage quando este é submetido a forças externas sejam obtidas (Kim; Wang; Selomulya, 2020). É amplamente utilizada na indústria de alimentos, uma vez que, é possível analisar de maneira aprofundada a microestrutura, fluidez e deformação dos alimentos, por meio de medições de baixa até grandes tensões (Ahmed; Basu, 2023). Fatores que ajudam no desenvolvimento, melhoramento e controle das propriedades de textura de matrizes alimentares, tanto no processamento, armazenamento e transporte, além das propriedades de fluxo da estrutura do alimento correlacionadas ao consumidor, propriedades fisiológicas na percepção humana quanto ao sabor, textura e digestão (boca, estômago e intestino) onde o alimento é percebido e digerido, impactando diretamente na satisfação do consumidor (Fischer; Windhab, 2011).

Parâmetros como tensão de escoamento, viscosidade, elasticidade, viscoelasticidade, varreduras de frequência, amplitude, rampa de temperatura e módulo oscilatório podem ser obtidos em análises reológicas (Cheng *et al.*, 2022). Um exemplo de aplicação da análise reológica é em emulsões, pois, é um método útil para entender o comportamento destas durante as transformações de fases e comportamento de fluxo, sob temperatura e estresse (Yi *et al.*, 2023).

O comportamento viscoelástico de um material pode ser analisado através de varreduras de frequência por reologia oscilatória dinâmica, variações quanto aos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') permitem caracterizar a estrutura de rede de uma amostra. Sendo que, o parâmetro G' indica o quanto um dado material é capaz de armazenar a tensão sofrida sem escoar, ou seja, o quanto o material quando sofre ação de uma força resiste à deformação. Já o G'' , indica o quanto um dado material é capaz de perder a tensão sofrida (Fingas *et al.*, 2003). Estes módulos podem ser utilizados para analisar a estabilidade de formulações.

A viscosidade é a resistência ao fluxo de um determinado material em se recuperar de um estresse. Indica mudanças estruturais reversíveis ou irreversíveis do fluxo de fluido sob estresse. Nesta análise, obtém-se uma curva de fluxo, onde a viscosidade (Pa.s) em função da taxa de cisalhamento ($1/s$) é registrada, e o material pode ser classificado como viscoso ou

elástico, dependendo da resposta gerada ao estímulo mecânico (Fingas; Fieldhouse; Wang, 2003). Em relação ao comportamento de uma emulsão, quando o fluido é do tipo não newtoniano, o comportamento viscoso é em função da taxa de cisalhamento. Diferentemente do fluido newtoniano, onde o comportamento da viscosidade é independente da taxa de cisalhamento (Torres *et al.*, 2007).

Sendo assim, para preparar emulsões de Pickering, uma ampla variedade de partículas sólidas tem sido empregada, entre elas, a proteína do soro do leite (*whey protein*, WP) (Li *et al.*, 2022a; Nayak *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2022).

3.3 Proteína do soro do leite

O soro do leite é um subproduto líquido que pode ser obtido a partir do processamento do leite. Sua fração proteica contém majoritariamente β -lactoglobulina, estando também presentes a α -lactalbumina, albumina de soro bovino, lactoferrina e imunoglobulinas. A β -lactoglobulina representa aproximadamente 20% das proteínas totais do leite bovino, possui alto valor biológico e nutricional e dessa forma, é amplamente utilizada na indústria de alimentos (Liu *et al.*, 2022; Shakoury *et al.*, 2022).

A produção do soro de leite vem aumentando cada vez mais em nível mundial, em consequência da valorização deste como subproduto para aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e de biomateriais. A produção mundial é superior a 160 milhões de toneladas por ano, com um índice de crescimento de 1 a 2% ao ano. Isto se deve ao fato de que para produzir 1 quilo de queijo, 9 litros de soro de leite são gerados (Smithers, 2008).

Os produtos mais abundantes produzidos a partir do soro de leite são os concentrado proteico do soro de leite (WPC, do inglês) e isolado proteico do soro de leite (WPI, do inglês). O WPC é obtido mediante a ultrafiltração do soro de leite, processo que visa concentrar proteínas e sua concentração de proteínas totais varia de 50 a 80%, tendo outros componentes como, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais. Já para a produção de WPI é necessário processamento adicional, tais como a troca iônica, que remove lactose, minerais e outros componentes de baixa massa molar. O resultado é que o WPI possui concentrações de proteínas superiores a 90% (Ha *et al.*, 2019; Livney, 2010; Madureira *et al.*, 2007).

Segundo o Grand View Research (2022), o mercado global de *whey protein* em 2021 foi avaliado em US\$ 5,33 bilhões com predomínio pela demanda do segmento de WPC e maior participação na receita, atingindo mais de 40% comparado as outras formas de *whey protein*

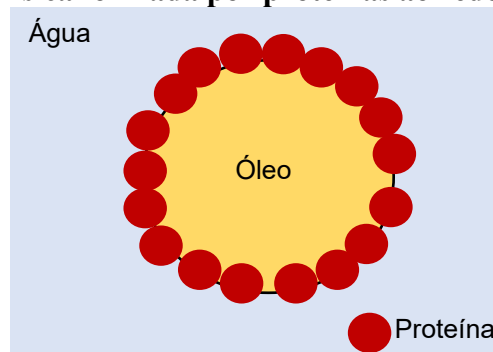
produzidas (Isolado e Hidrolisado), e estima-se que estes números devem crescer em uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) mais rápido de 2022 a 2030.

Além do mais, a proteína do soro do leite é uma fonte animal não tóxica para a maioria dos indivíduos, com baixo custo e uma fonte abundante para a formação de nanopartículas, visto que, esta proteína possui propriedades emulsificantes, formação de barreira física de proteção e estabilizando gotículas de óleo em emulsões (Figura 3) (Moghaddam *et al.*, 2021; Shakoury *et al.*, 2022). Entre as propriedades funcionais das proteínas do soro do leite, estão a capacidade de formação de espuma, devido à forte camada adsorvida na interface ar-água que as proteínas geram (Levin *et al.*, 2016) e a capacidade de gelificação (Van Den Berg *et al.*, 2007).

Quando as proteínas globulares estão em sua forma nativa, o interior dela é composto em sua maior parte por aminoácidos hidrofóbicos, enquanto na parte externa (interface proteína/água) é composta principalmente por aminoácidos hidrofílicos. Quando a proteína é tratada por algum agente físico, como a temperatura, ocorre alterações nas propriedades físico-químicas destas, o que melhora sua característica anfifílica, pois, ocorre o desdobramento da proteína que inicialmente se apresentava em forma globular, e a abertura desta faz com que a proteína fique com pontos hidrofílicos e hidrofóbicos expostos e conseqüentemente tenha um resultado mais eficiente como emulsificante (Mcsweeney; Fo, 2013).

A proteína do soro do leite não somente auxilia na questão funcional, mas possui também propriedades nutricionais, pois sua composição conta com os nove tipos de aminoácidos essenciais (EAA): fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, valina (Haraguchi; Abreu; Paula, 2006; Xiao; Guo, 2022). Possui também vitaminas e minerais que contribuem para o desenvolvimento de alimentos funcionais com alto valor nutricional e com benefícios à saúde (Chen; Remondetto; Subirade, 2006; Liu *et al.*, 2022; Pu *et al.*, 2022; Shakoury *et al.*, 2022).

Figura 3 - Barreira física formada por proteínas ao redor de gotícula de óleo.



Fonte: Adaptado de Bouyer *et al.* (2012).

Alguns estudos utilizando proteína do soro de leite apresentaram resultados promissores na encapsulação de substâncias bioativas. Hong *et al.* (2022) realizaram nanoencapsulação de apigenina por meio de isolado proteico de soro de leite e a eficiência do encapsulamento foi de até 98,15%, as nanodispersões obtidas foram estáveis durante o armazenamento em temperatura ambiente por 30 dias. Wu *et al.* (2015) formularam e estabilizaram emulsões de Pickering a partir de nanopartículas de isolado de proteína de soro do leite, as nanopartículas obtidas apresentaram boas propriedades de umectação e resistência ao calor, permitindo que estas nanopartículas fossem aplicadas em usos que requerem tratamento térmico.

Zhou *et al.* (2022) prepararam nanopartículas a partir de isolado de proteína de soro de leite (WPI) e fitoesteróis (PSs), formando um composto leite-fitoesterol (WPS) como estabilizadores de emulsões de Pickering do tipo óleo em água, observaram que o WPI e PSs foram ligados através de ligação não covalente, fato que altera a função e estrutura das nanopartículas. Em uma proporção de 25:2 de WPI e PSs respectivamente, houve uma excelente molhabilidade interfacial das partículas, atividade antioxidante e estabilidade da emulsão. As emulsões obtidas apresentaram excelente estabilidade ao armazenamento e oxidação, e também uma reduzida digestibilidade lipídica.

Noello *et al.* (2016) produziram emulsões de óleo de chia estabilizadas por meio de micropartículas de concentrado proteico de soro de leite e pectina, e também utilizando somente o concentrado proteico do soro do leite, sendo que ambas foram secas por *spray dryer*. Todas as formulações foram estáveis por no mínimo 24 horas após a preparação, e todas as formulações contendo micropartículas apresentaram maior estabilidade oxidativa quando comparado ao óleo de chia na forma pura.

Uma forma de melhorar a aplicabilidade e desempenho das proteínas é mediante reticulação. Esta técnica é promissora na área de alimentos e comumente aplicada a proteínas devido a estas possuírem mais grupos funcionais quando comparado a outros polímeros, como por exemplo, os polissacarídeos (Azeredo; Waldron, 2016). Como exemplo, Silva *et al.* (2021) formularam microgéis com WPI reticulado com ácidos orgânicos para estabilizar emulsões de Pickering contendo óleo de café torrado. A reticulação melhorou a estabilidade das emulsões, pois reduziu o tamanho dos microgéis de ~1800 nm para 185 nm, bem como aumentou o ângulo de contato com a água destes microgéis quando comparado a microgéis de WPI sem o processo de reticulação. Este processo proporcionou maior estabilidade física para as emulsões (O/A), devido ao fato de que o tamanho menor dos microgéis e um maior ângulo

de contato entre a partícula e as fases líquidas, formaram uma camada com espessura mais fina na interface óleo/água, resultando em uma barreira eficaz contra a coalescência de partículas.

Uma forma de melhorar a aplicabilidade e desempenho das proteínas é mediante a técnica de reticulação, técnica promissora na área de alimentos e comumente aplicada a proteínas devido a estas possuírem mais grupos funcionais quando comparado a outros polímeros, como por exemplo, os polissacarídeos (Azeredo; Waldron, 2016).

3.4 Reticulação

A reticulação consiste na formação de ligações físicas ou químicas entre cadeias poliméricas, como por exemplo de proteínas, e que resultam na formação de redes tridimensionais. Consequente, esta técnica aumenta as propriedades de barreira e mecânica, assim como, torna a estrutura mais resistente à luz, calor e melhora a estabilidade, pode também retardar a biodegradação de materiais proteicos. Uma das formas de realizar este processo é por meio da reticulação química (Azeredo; Waldron, 2016; Liang *et al.*, 2020). Os ácidos cítrico e tânico são utilizados na área de alimentos para reações de reticulação química, visto que possuem grau alimentício e possuem baixa toxicidade. Reticulantes como o formaldeído e glutaraldeído devem ser evitados dado que não são permitidos em alimentos por possuírem potencial tóxico (Silva *et al.*, 2021).

Os grupos amino presentes nas proteínas são fortemente nucleofílicos, o que proporciona a participação das proteínas em variados tipos de reações de reticulação. A reação de reticulação de proteínas com compostos fenólicos é uma alternativa que pode ser utilizada em alimentos. Estes compostos possuem propriedades antioxidantes e estão presentes em uma ampla variedade de vegetais, frutas e especiarias, os quais proporcionam diversos benefícios à saúde (Azeredo; Waldron, 2016).

Segundo a *Food and Drugs Administration* (FDA), o ácido tânico é classificado como substância de alimentos afirmados como geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), porém, possui algumas limitações específicas quanto ao seu uso em alimentos, sendo 0,04% o nível máximo de uso em alimentos (FDA, 2022).

O ácido tânico é um composto fenólico que possui coloração branca amarelada a marrom clara na forma de pó volumoso e amorfo (Figura 4) com sabor adstringente e odor característico fraco, e é extraído de espécies como *Quercus infectoria* Olivier, e várias espécies de sumagre (*Rhus semialata*, *Rhus coriaria*, *Rhus glabra*). Os polifenóis, como o ácido tânico,

juntamente com emulsificantes macromoleculares, como, polissacarídeos e proteínas através de ligação não covalentes podem melhorar o desempenho da estabilidade de emulsões frente à oxidação devido à sua propriedade antioxidante (Liang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2018).

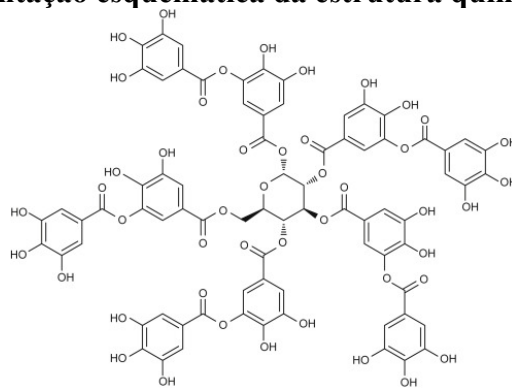
Figura 4 - Ácido tânico em pó.



Fonte: Autoria própria (2022).

O ácido tânico vem sendo utilizado como agente reticulante por possuir propriedades que modificam as proteínas através de interações não covalentes e complexação molecular, possui custo relativamente baixo e exige menos condições estritas de temperatura, pH e substrato, diferentemente das enzimas lacase e transglutaminase que necessitam de condições mais restritas e possuem o valor elevado, limitando assim o seu uso. Outro fator que contribui para a utilização deste ácido como reticulante é que ele é altamente reativo com macromoléculas biológicas, pois, possui vários grupos hidroxila (OH) e anéis aromáticos (Figura 5) que são capazes de formar ligações de hidrogênio, atuando como uma “cola molecular” entre as proteínas (Jia *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023; Yuan *et al.*, 2021). Ou seja, reage com aminoácidos por meio do seu grupo fenólico que atua doando prótons capaz de formar fortes ligações de hidrogênio com os grupos carboxílicos existentes na estrutura da proteína (Andrade *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2016a; Sainz-Urruela *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021; Ullah *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2018).

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do ácido tânico.



Fonte: Robles (2014).

Outro agente reticulante é o ácido cítrico, que se apresenta na forma de pó branco ou cristais incolores (Figura 6). É um ácido carboxílico de baixo custo produzido principalmente por processos de fermentação de carboidratos como glucose ou amido, ou encontrado em frutas cítricas como limão, abacaxi e lima (Alavarse *et al.*, 2022; Franklin; Guhanathan, 2014; Galvão *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2015). É muito utilizado na indústria de alimentos como antioxidante, acidificante e intensificador de sabor e na indústria farmacêutica como efervescente, corretor de pH, antioxidante e conservante de ferro. Setenta e cinco por cento do consumo global de ácido cítrico em alimentos e bebidas tem como objetivo sua função de acidulante (Reena *et al.*, 2022; Vandenberghe *et al.*, 2017). O mecanismo de reticulação envolve os grupos carboxílicos do ácido cítrico (Figura 7) que reagem com os grupos amino livres da proteína por substituição nucleofílica (Galvão *et al.*, 2018; Hashemi; Madadlou; Salami, 2017).

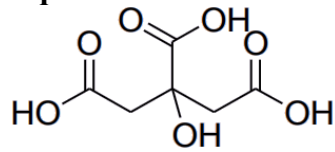
Figura 6 - Ácido cítrico.



Fonte: Autoria própria (2022).

É permitido pela resolução brasileira (RDC n° 45, de 3 de novembro de 2010) sem limitações para ingestão diária indicando que não apresenta riscos à saúde (Brasil, 2010).

Figura 7 - Representação esquemática da estrutura química do ácido cítrico.

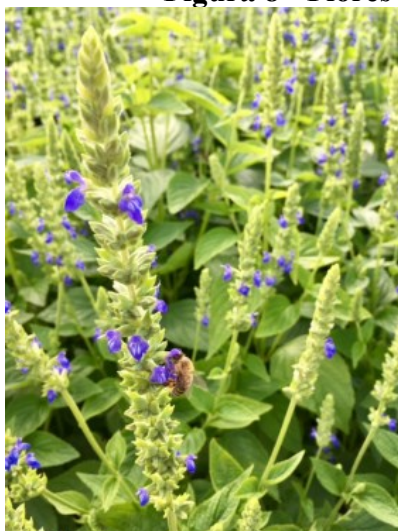


Fonte: Scopel *et al.* (2017).

3.5 Óleo de Chia

A *Salvia hispanica* L., popularmente conhecida como chia (Figura 8a) é uma planta herbácea anual que pertence à família Lamiaceae e é nativa da região do centro-oeste do México ao norte da Guatemala, estando atualmente difundida em várias outras regiões. Suas sementes eram muito utilizadas por tribos astecas como alimento, fabricação de tintas e remédio (Martínez *et al.*, 2012). As sementes de chia (Figura 8b) possuem formato oval com tamanho heterogêneo de 1 a 2 mm, a cor varia de cinza, marrom, preto e preto mesclado a branco, normalmente são consumidas de forma integral ou moídas, adicionadas a bebidas, leite, bolo, biscoitos, iogurte, saladas, barras de cereais, outra maneira de uso é em forma de óleo devido ao alto valor nutricional, a presença de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e outros compostos bioativos (Mohd Ali *et al.*, 2012; Oliveira-Alves *et al.*, 2017; Timilsena *et al.*, 2016).

Figura 8 - Flores e sementes da *Salvia hispanica* L.



(a) *Salvia hispanica* L. em fase de floração.



(b) Sementes de chia.

Fonte: Mack (2020).

Os compostos presentes na chia proporcionam diversos benefícios à saúde, estudos indicam potencial ação para com prevenção de doenças como diabetes, problemas

cardiovasculares e obesidade, pois, possuem atividades hipocolesterolêmicas e hipotensoras (Toscano *et al.*, 2014), anti-inflamatórias, antioxidantes (Pellegrini *et al.*, 2018) e melhora a tolerância à glucose (Marineli *et al.*, 2015). Outro ponto, é que a inclusão de PUFA's na dieta ou na suplementação é de suma importância devido ao fato de que o organismo não é capaz de sintetizar estes ácidos graxos essenciais (Firtin *et al.*, 2020; Noello *et al.*, 2016). Em comparação ao leite, a chia possui onze vezes mais fósforo, seis vezes mais cálcio e quatro vezes mais potássio (Marineli *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2013; Muñoz-Tébar *et al.*, 2019).

O óleo de chia (Figura 9) é um produto obtido das sementes de chia e é uma fonte rica de PUFA's de cadeia curta, ácido α -linolênico (ALA, n-3) e ácido linoleico (LA, n-6), sendo a proporção de cerca de 65% e 20% respectivamente (Copado; Ixtaina; Tomás, 2022; Noello *et al.*, 2016). Além destes, contém compostos fenólicos e antioxidantes naturais, fibras, vitaminas (complexo B), proteínas e minerais (Marineli *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2013; Muñoz-Tébar *et al.*, 2019).

Figura 9 - Óleo de chia.



Fonte: Autoria própria (2022).

Este óleo tem sido utilizado para o enriquecimento de produtos na indústria alimentícia e na obtenção de cápsulas para o uso de atletas com o intuito de supressão do apetite, perda de peso e também como promotores de saúde para o público em geral (Firtin *et al.*, 2020; Noello *et al.*, 2016)

Segundo a Instrução Normativa nº 28 da ANVISA, de 26 de julho de 2018, que estabelece os constituintes, limites de uso, alegações e rotulagem complementar dos suplementos alimentares, o óleo de semente de chia (*Salvia hispanica* L.) está autorizado para ser usado em suplementos alimentares, não sendo indicado para lactentes de 0 a 12 meses ou crianças com a faixa etária compreendida entre 1 a 3 anos. Segundo a mesma normativa, os limites mínimos recomendados para o consumo diário de ALA são de 0,24 g para indivíduos

com idade acima de 19 anos, já a recomendação de LA é de 2,55 g. O limite máximo respectivamente é de 2,4 g e 25,5 g (Brasil, 2018). Dessa forma, o óleo de chia se torna uma possível fonte para a obtenção destes compostos, visto que entre as fontes naturais conhecidas possui a maior proporção de ALA (Ayerza, 1995; Marineli *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2013).

Em contrapartida, o elevado teor de PUFA e seu grau de insaturação no óleo resulta em baixa estabilidade ao calor, umidade, oxigênio e luz frente às condições de processos e ambientais, sendo então necessário alternativas que evitem ou minimizem estes efeitos para que a utilização deste e para que os potenciais benefícios não sejam invalidados (Ayerza, 1995; Marineli *et al.*, 2014).

Uma alternativa para tal desafio é a encapsulação do óleo de chia, a fim de que seja realizado um revestimento em volta deste, e conseqüentemente uma proteção e melhora na estabilidade, reduzindo a degradação de compostos sensíveis, diminuindo ou retardando o processo oxidativo e a perda das funções biológicas e características sensoriais (Marineli *et al.*, 2014; Noello *et al.*, 2016; Reis; Ambrosi; Luccio, 2022).

Dessa forma, nanopartículas de concentrado proteico do soro de leite foram reticuladas com ácidos orgânicos para a estabilização de emulsões de óleo de chia em água. Foram realizadas as técnicas de caracterização nas amostras de nanopartículas e emulsões, e esta última foi avaliada por testes micro e macroscópicos para verificar a estabilidade a separação de fases.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento do projeto bem como as análises foram realizados nos laboratórios do PPGTA (UTFPR - Campus Campo Mourão) e no laboratório Biopol da Universidade Federal do Paraná (UFPR – Campus Botânico - Curitiba). A estrutura de laboratórios multiusuários da UTFPR também foi utilizada sem custos adicionais.

4.1 Materiais

O concentrado proteico do soro do leite (WPC, do inglês) foi fornecido pela indústria GSG Nutrição LTDA, e a composição segundo o fabricante é de 81,0% de proteína, 5,5% de gordura, 5,0% de cinzas (550 °C), 4,5% de umidade e o pH 6,5 da solução aquosa. Ácido tânico (*Sigma Aldrich*) e o ácido cítrico (*Alphatec*) foram usados como agentes de reticulação. Azida de sódio (*Sigma Aldrich*) foi utilizada para prevenir o crescimento de microrganismos em concentração de 200 ppm (CARPENTER; GEORGE; SAHARAN, 2018). Soluções de ácido clorídrico (*Alphatec*, HCl, 1 mol.L⁻¹) ou hidróxido de sódio (Isifar, NaOH, 1 mol.L⁻¹) foram empregadas para ajuste do pH. Óleo de chia (Veris Óleos Vegetais Ltda) foi utilizado para a formulação de emulsões. Brometo de potássio (KBr, Sigma-Aldrich, grau espectroscópico) foi usado nas análises de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR). Substrato de mica V-1 (*Electron Microscopy Science*, EUA) foi utilizado como substrato padrão nas análises de Microscopia de Força Atômica. Solução aquosa de KCl 0,01 mmol.L⁻¹ foi usada nas análises de estabilidade das nanopartículas. Trifluoreto de boro (*Sigma Aldrich*) e metanol foram utilizados nas análises de cromatografia gasosa. Água purificada (tipo de água que passou por algum processo de tratamento para a retirada de possíveis contaminantes) por destilação e água ultrapurificada (tipo de água purificada com tratamento adicional para a remoção dos possíveis contaminantes) pelo MiliQ (BRASIL, 2019).

4.2 Elaboração das nanopartículas

A preparação de nanopartículas sólidas foi realizada de acordo com a metodologia de Farjami *et al.* (2015) e por Silva *et al.* (2021) com pequenas modificações. Primeiramente, preparou-se uma solução de concentrado de proteína do soro do leite (20 g) em água purificada

por destilação (500 mL) sob agitação a 200 rpm por 2 h, sem aquecimento. Em seguida, a solução foi armazenada em geladeira por aproximadamente 12 h para garantir a hidratação das proteínas. Posteriormente, a solução foi centrifugada (NT 815, NovaTecnica) em tubos Falcon a 6.000 rpm por 10 minutos a 10 °C, a fim de separar a fração insolúvel em água. A concentração de WPC após a centrifugação foi determinada gravimetricamente e em triplicata.

A concentração de WPC foi determinada adicionando-se aproximadamente 1 g da solução, após-centrifugação, em placa de Petri e estas foram secas em estufa a 100 °C até que a massa do resíduo não variasse em função do tempo. O cálculo foi realizado segundo a equação (Eq. 1), onde C_{WPC} é a concentração de sólidos (g mL^{-1}), m_{seca} é a massa na placa de petri após a secagem, m_{placa} é a massa da placa de petri vazia e $m_{solução}$ é a massa de solução adicionada na placa antes da secagem.

$$C_{WPC} = \frac{m_{seca} - m_{placa}}{m_{solução}} \quad (\text{Eq.1})$$

A razão molar de reticulante e proteína foi de 3:1 (mol:mol) com base no teor da proteína usada (considerou-se a massa molar do principal constituinte, a proteína β - lactoglobulina, aproximadamente 18.000 g/mol (Food ingredients Brasil, 2014), resultando nas concentrações de 3,135 g_{reticulante}/100 g_{WPC} para o ácido cítrico e 27,900 g_{reticulante}/100 g_{WPC} para o ácido tânico.

Foram utilizadas três condições experimentais: a) solução de WPC em água sem a adição de reticulantes (amostra NPs WPC); b) solução de WPC em água com adição de ácido cítrico (amostra NPs ret. ác. cítrico); e c) solução de WPC em água com adição de ácido tânico (amostra NPs ret. ác. tânico).

Os reticulantes foram adicionados à 500 mL de uma solução aquosa de *whey protein* (20 g), seguido de agitação à 200 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O pH foi ajustado por meio da adição de ácido clorídrico (HCl, 1 mol.L⁻¹) ou hidróxido de sódio (NaOH, 1 mol.L⁻¹) até pH 5,8. As soluções foram aquecidas à 80 °C sob agitação magnética à 100 rpm, durante 15 minutos. Quando as soluções arrefeceram à temperatura ambiente, foi adicionada azida de sódio (0,2 g.L⁻¹) para evitar o crescimento microbiano (Ramalho; Lelis, 2021; Vancin *et al.*, 2020).

As soluções obtidas foram sonicadas (Fischer Scientific, Sonic desembrator, 117 V, 50-60 Hz, 4 A e 400 W) por 3 minutos (30 segundos ligado/10 segundos desligados) em banho de gelo para evitar superaquecimento. Posteriormente, foram liofilizadas e acondicionadas em tubo Falcon, etiquetadas e armazenadas a -10 °C. O mesmo procedimento foi seguido para o caso da amostra sem adição de reticulantes.

4.3 Caracterização das nanopartículas

4.3.1 Cinética de reticulação

A formação das nanopartículas, com ou sem adição de reticulantes, foi acompanhada ao longo do tempo. Soluções de WPC em água purificada por destilação foram obtidas conforme descrito anteriormente, e após ajuste do pH para 5,8 foram aquecidas a 80 °C. Posteriormente, foram coletadas alíquotas de 1,5 mL nos tempos de 0, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos, que foram posteriormente resfriadas em banho de gelo para que o processo de reticulação térmica fosse interrompido.

Posteriormente, estas amostras retiradas foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi acondicionado em placas de Petri, as quais foram levadas à estufa a 100 °C até a completa secagem das mesmas. Os cálculos foram realizados de acordo com as Equações 2 e 3, onde $C_{sólidos}$ é a concentração de sólidos total, m_{seco} é a massa da placa após a secagem, m_{placa} é a massa da placa vazia, $m_{psolução}$ é a massa da placa com solução de WPC antes da secagem, C_{WPC} é a concentração de WPC antes da reticulação, $C_{ácido}$ é a concentração de ácido adicionado.

$$C_{sólidos} = \frac{m_{seco} - m_{placa}}{(m_{psolução} - m_{placa})} \quad (\text{Eq.2})$$

$$\text{Reticulação (\%)} = 100 \times \frac{C_{WPC} - (C_{sólidos} - C_{ácido})}{C_{WPC}} \quad (\text{Eq.3})$$

4.3.2 Microscopia de força atômica (AFM)

Na análise de Microscopia de Força Atômica (AFM, realizada no laboratório Biopol da UFPR), as amostras foram diluídas (1:50 em volume) em água ultrapurificada (MilliQ system), e uma alíquota de 50 µL foi depositado em substrato de mica V-1 (Electron Microscopy Science, EUA), previamente clivada. Após 5 minutos, as amostras foram secas em fluxo de nitrogênio durante 5 minutos e armazenadas em estufa a 30 °C, durante 10 minutos antes da análise. As imagens foram obtidas através do microscópio de força atômica (Agilent SPM 5500, EUA) em modo de contato intermitente (*tapping*), utilizando alavanca NSC35 (µmasch, Estônia) com constante de força de 7,5 N m⁻¹ e frequência de 190 kHz. Foram escaneadas três áreas distintas (A, B e C) com áreas de 8x8, 4x4, 2x2 e 1x1 µm, com velocidade de 1,44 ln s⁻¹

e resolução de 512 p. O tratamento das imagens foi realizado através do *software* Gwyddion (v 2.50). O tamanho médio das nanopartículas foi calculado pela medição do diâmetro de cerca de 120 nanopartículas para cada condição experimental.

4.3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

4.3.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas antes e após tratamento com ultrassom

O diâmetro hidrodinâmico (D_h), o índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta das nanopartículas foram determinados em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern). Análises das nanopartículas após 1 minuto (30 s ligado/10 s desligado) de sonicação também foram realizadas, a fim de verificar se a sonicação possuía alguma influência sobre as nanopartículas. As amostras foram dispersas em solução aquosa de KCl a $0,01\text{mmol.L}^{-1}$ e as nanopartículas foram preparadas a 1mg.mL^{-1} em KCl e posteriormente diluídas na proporção de 1:25 (v:v) para todas as amostras. As amostras foram então filtradas em filtro de acetato de celulose $0,45\text{ }\mu\text{m}$ com diâmetro de 13 mm. Após a análise em triplicata dessas amostras, estas foram sonicadas por 1 min e reanalisadas conforme descrito anteriormente.

4.3.3.2 Influência do pH no potencial zeta e Determinação do Ponto Isoelétrico (PI)

A determinação do potencial zeta em função do pH das nanopartículas foi realizada por meio do método de titulação manual no equipamento Stabino (Particle Metrix GmbH Corporation) com copo de medida de 10 mL e pistão de $0,4\text{ }\mu\text{m}$. Foram realizadas titulações de ácido ou base (5 mmol.L^{-1}) a um fluxo de incremento de $40\text{ }\mu\text{L}$ a cada 30 s. Foram preparadas suspensões de NPs a 1mg.mL^{-1} em solução aquosa de KCl a 1 mmol.L^{-1} . Foi utilizada a faixa de pH de 2 a 9, sendo que, o pH de todas as amostras foi ajustado inicialmente para 9 pela adição de uma solução padrão de NaOH 5 mmol.L^{-1} e, posteriormente, foi realizada a titulação para pH 2 com uma solução padrão de HCl $0,005\text{ mol.L}^{-1}$.

4.3.3.3 Determinação do diâmetro hidrodinâmico em função do pH em diferentes faixas

A determinação do diâmetro hidrodinâmico (D_h) em função do pH das nanopartículas foi realizada através do método de titulação automática no equipamento Zetasizer Nano ZS. O método utilizado foi como descrito na Seção 4.3.4.1, porém, com titulação automática com 10 mL de volume inicial na concentração de NPs de 1 mg.mL^{-1} em KCl a 1mM. As amostras foram previamente filtradas em filtro de acetato de celulose $0,45 \mu\text{m}$ com diâmetro de 13 mm. A faixa de pH avaliada foi de 4 a 9.

4.3.3.4 Efeito da força iônica

A determinação do potencial zeta com incremento da força iônica foi realizada por meio do método de titulação automática no equipamento Stabino da Particle Metrix GmbH Corporation com copo de medida de 10 mL e o pistão de $0,4 \mu\text{m}$. Primeiramente, preparou-se uma solução com o volume total de 20 mL com NaCl na concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em água ultrapura e depois, uma solução com 10 mL contendo 1 mg.mL^{-1} de NPs em água ultrapura.

4.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

As análises termogravimétricas (TGA) e a Análise Térmica Diferencial (DTA) foram realizadas utilizando analisador térmico simultâneo (STA 6000, Perkin Elmer), alocado no laboratório Multiusuário (Central Analítica Multiusuário de Medianeira - CeanMed) da UTFPR Campus Medianeira, com o intuito de avaliar o estado físico das nanopartículas. Em ambas as análises, aproximadamente 10 mg de amostra foram inseridas em cadinhos de platina e aquecidas de 25 a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ a $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio à vazão de 20 mL min^{-1} .

4.3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Shimadzu, modelo IRAffinity-1) foi realizada na Central Analítica Multiusuário da UTFPR Campo Mourão (CAMulti-CM). O objetivo foi observar possíveis alterações nos modos vibracionais dos grupos funcionais das proteínas do soro do leite devido ao processo de reticulação (FarjamI *et al.*, 2015). Foram utilizadas aproximadamente 3 mg de nanopartículas e 100 mg de brometo de potássio. Os espectros FTIR foram determinados no intervalo de

número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} com 32 acumulações para cada amostra analisada.

4.4 Caracterização do óleo de chia

A análise de composição de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás com detector de espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS-QP2010 SE) equipado com injetor automático (AOC-20i) utilizando a coluna capilar ZB-Wax (ZebronTM, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O gás de arraste usado foi o Hélio (White Martins, pureza > 99%) a uma vazão de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com razão de Split de 1:40 e o volume de injeção foi de 1 μL . Os espectros de massa foram registrados a 70 eV com intervalo de m/z 55 a 550. A identificação dos compostos foi realizada a partir da pesquisa no banco de dados da biblioteca de espectros NIST *Mass Spectral Library* (versão 2014). A preparação das amostras foi efetuada segundo Gonzalez *et al.* (2013), aproximadamente 60 mg de amostras foram usados e derivatizados com solução 14 % de trifluoreto de boro em metanol. A temperatura da coluna inicialmente foi programada a 80 °C aumentando até 180 °C a uma taxa de 10 °C min^{-1} e depois para 240 °C com taxa de 4 °C min^{-1} , que foi mantido por 2 minutos.

4.5 Elaboração e caracterização das emulsões de Pickering

As emulsões de Pickering foram preparadas seguindo a metodologia proposta por Silva *et al.* (2021) e Sieben; Wypych; Freitas (2022) com pequenas modificações. As emulsões foram preparadas em duplicatas e em 3 grupos distintos: branco (sem a adição de nanopartículas, somente óleo e água submetidos ao ultrassom), NPs-WPC (nanopartículas de WPC sem adição de reticulantes) e reticulado (nanopartículas com ácido tânico), as proporções e concentrações são descritas na Tabela 1.

As concentrações de nanopartículas empregadas foram escolhidas a partir de testes preliminares para a determinação da quantidade necessária de nanopartículas para obtenção das emulsões, bem como a escolha do uso somente das nanopartículas que demonstraram melhores resultados nas análises macroscópicas preliminares, ou seja, que foram capazes de estabilizar eficientemente as emulsões.

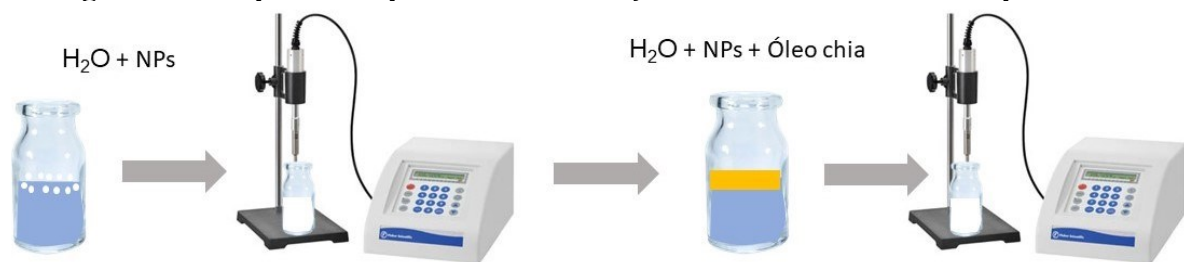
Tabela 1 – Proporção e concentração de nanopartículas utilizadas para formulação das emulsões.

	Proporção água:óleo (v:v)		
	80:20	50:50	20:80
0,1% nanopartículas (0,006 g)	4,8 mL água + 1,2 mL óleo	3 mL água + 3 mL óleo	1,2 mL água + 4,8 mL óleo
0,5% nanopartículas (0,03 g)	4,8 mL água + 1,2 mL óleo	3 mL água + 3 mL óleo	1,2 mL água + 4,8 mL óleo
1% nanopartículas (0,06 g)	4,8 mL água + 1,2 mL óleo	3 mL água + 3 mL óleo	1,2 mL água + 4,8 mL óleo
2% nanopartículas (0,12 g)	4,8 mL água + 1,2 mL óleo	3 mL água + 3 mL óleo	1,2 mL água + 4,8 mL óleo

Fonte: Autoria própria (2023).

As dispersões de nanopartículas em água, contendo 200 ppm de azida de sódio, foram preparadas conforme concentrações descritas na Tabela 1. A dispersão coloidal foi colocada em um frasco de cintilação e sonicada (Fischer Scientific, 117V, 50-60 Hz, 4 A e 400 W) por 1 minuto (30 s ligado/10 s desligados). Depois, o óleo de chia foi adicionado com o auxílio de uma micropipeta e novamente a dispersão foi sonicada por 1 minuto (30 segundos ligado/10 segundos desligados) para obter das emulsões (Figura 10). Posteriormente, estes frascos foram tampados e acondicionados em uma caixa a temperatura ambiente 25 ± 1 °C para a avaliação da estabilidade por 9 dias para avaliação da macroscopia das emulsões.

Figura 10 - Esquema do processo de obtenção das emulsões com nanopartículas.



Fonte: Autoria própria (2023).

4.5.1 Reologia das emulsões

Para determinação das propriedades reológicas, todos os testes foram conduzidos em um reômetro Thermo Scientific HAAKE Rheostress 1 (HR10) acoplado em um computador com *software* de comando (Trios, TA Instruments) localizado na UFPR. Os testes foram obtidos

a partir de emulsões contendo 2% de NPs. Para todas os testes foi utilizada uma geometria placa-cone (40 mm, 2°) com gap de 0,5 mm. Para os testes sem variação de temperatura, a temperatura fixa utilizada foi de $25,0 \pm 0,5$ °C. No total, foram realizados 2 testes reológicos: varredura de frequência e curva de viscosidade, os quais são descritos abaixo.

Nos testes de varredura de frequência utilizou-se uma frequência de 0,01 a 10 Hz, em regime viscoelástico linear, determinados nos testes oscilatórios de varredura de amplitude, a fim de avaliar os módulos G' e G'' em função da frequência angular.

Foi também determinada a relação entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento entre 1 e 1000 s^{-1} , e 1000 e 1 s^{-1} em 300 s cada rampa.

4.5.2 Análise microscópica das emulsões

A microestrutura das emulsões foi avaliada através de um microscópio óptico (*Nikon Eclipse E200*) equipado com câmera (*Moticam 2.0mp*) para aquisição de imagem ampliação de 400 x (ZHU *et al.*, 2017). A análise foi realizada após 3 h do processo de emulsificação para cada uma das emulsões produzidas, com uma gota sendo depositada em uma lâmina e coberta com uma lamínula de vidro.

A medição da distribuição dos tamanhos das gotas foi realizada no software *ImageJ* (disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), onde foram medidas as áreas das gotas (ferramenta “*Analyse Particles*”) e foram contadas uma população entre 50 a 100 gotas (somente a amostra com 2% na fração de 50:50 apresentou uma contagem menor, de aproximadamente 30 gotas) para cada formulação em duas imagens independentes. Posteriormente, as áreas das partículas foram utilizadas para o cálculo dos diâmetros de cada gota e dos valores médios.

4.5.3 Análise macroscópica das emulsões

A estabilidade das emulsões durante o armazenamento foi avaliada através de análises macroscópicas das emulsões, estas foram observadas a olho nu a 25 ± 1 °C e imagens dos tubos de vidro contendo as emulsões foram registradas durante 9 dias. Por meio do software *ImageJ*, foram medidas a altura da camada de água e de óleo (volume não emulsificado), bem como a altura total de líquido nos frascos.

4.6 Análise estatística

Os gráficos foram obtidos no programa OriginPro 8.5 e a análise estatística foi realizada usando o software Matlab. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) para detectar as diferenças significativas ($p < 0,05$) e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os resultados dos experimentos foram expressos como valores médios \pm desvio padrão.

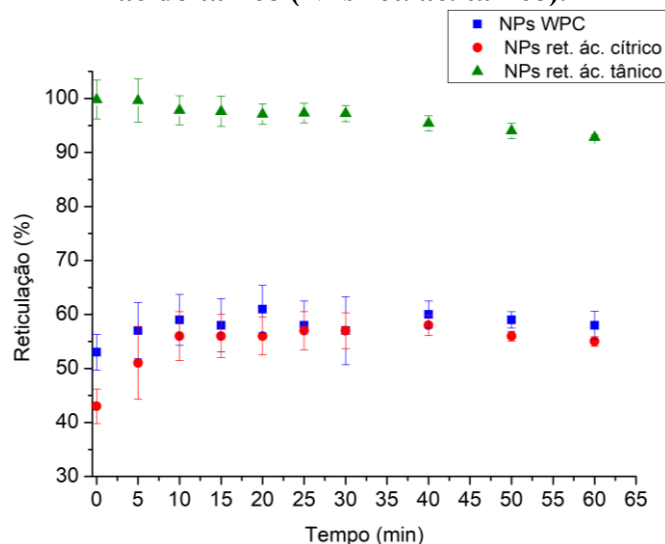
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das nanopartículas

5.1.1 Cinética de reticulação

A Figura 11 apresenta o percentual de reticulação para as amostras de nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) sem reticulantes e reticuladas com ácido cítrico ou ácido tânico.

Figura 11 - Reticulação para as amostras de nanopartículas em relação ao tempo em 80 °C sem reticulantes (WPC), reticuladas com ácido cítrico (NPs ret. ác. cítrico) e reticuladas com ácido tânico (NPs ret. ác. tânico).



Fonte: Autoria própria (2022).

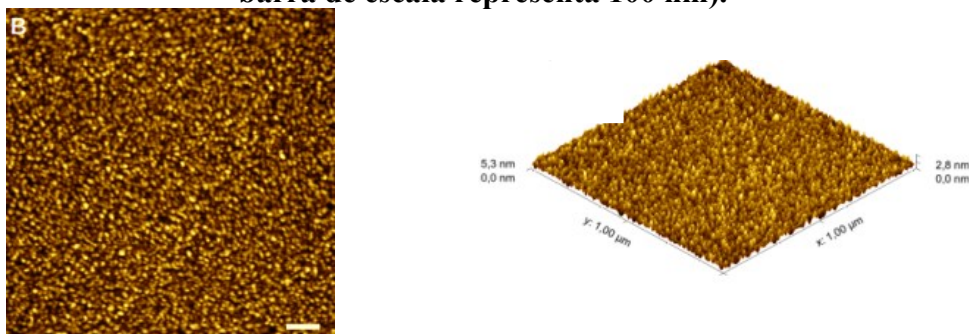
Foi observada a formação nanopartículas de WPC na amostra onde não foi utilizado os ácidos orgânicos para promover a reticulação das nanopartículas, o que é frequentemente atribuído à reticulação térmica (W *et al.*, 2015). A reticulação foi mais intensa nas amostras onde ácido tânico foi utilizado como reticulante, com média percentual de $96,9 \pm 2,96\%$. Não foi possível perceber diferenças entre a amostra contendo ácido cítrico e a amostra sem uso de ácido, permitindo concluir que o ácido cítrico não tenha levado à reticulação adicional do WPC além da reticulação térmica da proteína. Também foi possível verificar que a reação de reticulação ocorreu de forma rápida, em um período de tempo menor que os 60 minutos avaliados.

A reticulação térmica contribui para com a reticulação química, uma vez que, quando a proteína está na forma globular, as reações de reticulação tendem a ser mais fracas em comparação com a proteína em sua forma desdobrada, porque, nesta última, a reação de ligação cruzada com o reticulante é facilitada, aumentando então o teor de reticulação (Wijayanti *et al.*, 2014). Acredita-se que o grau de reticulação está relacionado com a quantidade de grupos amino livres, os quais dependem das características estruturais do composto (Escamilla-García *et al.*, 2019). Os grupamentos hidroxila presentes na estrutura do ácido tânico permitem que este reticule as moléculas de proteína, principalmente por meio dos grupamentos aminos existentes na composição da mesma, através de ligações de hidrogênio (Zhang *et al.*, 2023a). O alto teor de hidroxilas proporciona maior capacidade de ligação entre as moléculas, porém, pode resultar em agregação e combinação destas. Isso pode explicar a diferença nos comportamentos observados nas amostras contendo ácido cítrico e ácido tânico, já que esse último possui um número maior de hidroxilas em sua molécula (Chen *et al.*, 2022a).

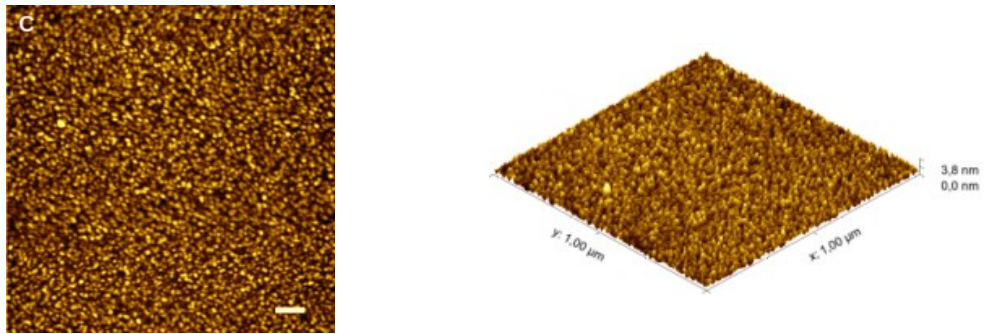
5.1.1 Caracterização morfológica e de estabilidade das nanopartículas

As imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM) das nanopartículas são apresentadas na Figura 12. A Tabela 2 e a Tabela 3 apresentam as análises de tamanho de partículas, índice de polidispersidade (PDI) obtido por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta antes e após tratamento de ultrassom das nanopartículas sem adição de reticulantes e reticuladas com ácido cítrico e ácido tânico. A Tabela 4 mostra a influência do pH no diâmetro e PDI das nanopartículas sem reticulantes e reticuladas com ácido tânico.

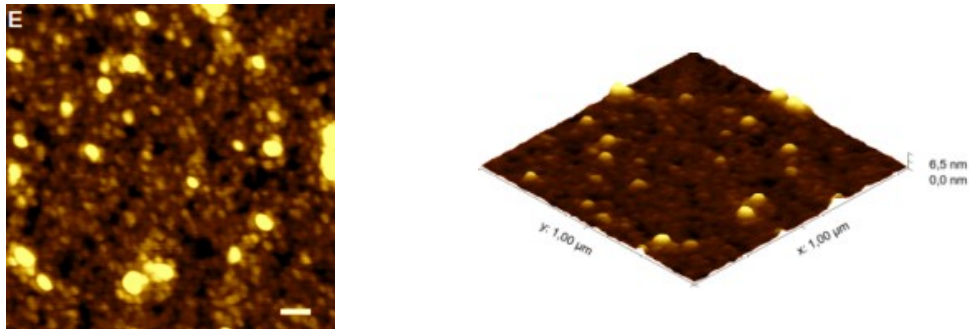
Figura 12 - Micrografias e representação tridimensional obtidas a partir de AFM (a barra de escala representa 100 nm).



(a) NPs WPC sem adição de reticulantes.



(b) NPs reticuladas com ácido cítrico.



(c) NPs reticuladas com ácido tânico.

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 2 – Influência do ultrassom no diâmetro médio e PDI das NPs sem reticulantes (WPC) e com a adição de reticulantes (ácido cítrico, ÁC e ácido tânico, ÁT).

Amostras	Antes da sonicação		Após a sonicação	
	Diâmetro (nm)	PDI	Diâmetro (nm)	PDI
NPs WPC	229 ^{aA} ± 12	0,20 ^{aA} ± 0,07	212 ^{aA} ± 28	0,16 ^{aA} ± 0,02
NPs ret. ÁC	248 ^{aA} ± 6	0,22 ^{aA} ± 0,04	360 ^{aA} ± 108	0,27 ^{aA} ± 0,14
NPs ret. ÁT	319 ^{aA} ± 119	0,2 ^{aB} ± 0,2	224 ^{aA} ± 18	0,94 ^{aA} ± 0,006

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$).

Médias ± desvio padrão.

Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 3 – Influência do ultrassom no potencial zeta das NPS sem reticulantes (WPC) e com a adição de reticulantes (ácido cítrico, ÁC e ácido tânico, ÁT).

Amostras	Antes da sonicação	Após a sonicação
NPs WPC	-22,8 ^{aA} ± 0,5	-24 ^{aA} ± 6
NPs ret. ÁC	-12 ^{aA} ± 10	-29 ^{aA} ± 11
NPs ret. ÁT	-20 ^{aA} ± 6	-19 ^{aA} ± 6

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$).

Médias ± desvio padrão.

Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 4 - Influência do pH no diâmetro e PDI das NPS sem reticulantes (WPC) e reticuladas com ácido tânico (ÁT).

pH	NPs WPC		NPs ret. ÁT	
	Diâmetro (nm)	PDI	Diâmetro (nm)	PDI
4	337,6 ^{bB} ± 4,8	0,38 ^{aC} ± 0,04	1506 ^{dA} ± 111,6 *	0,59 ^{bD} ± 0,04
5	233,7 ^{aB} ± 6,26	0,41 ^{aC} ± 0,05	1094 ^{cA} ± 45,5*	0,53 ^{abD} ± 0,007
6	222,5 ^{aB} ± 1,1	0,41 ^{aC} ± 0,0316	912 ^{bA} ± 78,3	0,57 ^{bC} ± 0,09
7	217,8 ^{aB} ± 0,9	0,42 ^{aC} ± 0,06	850 ^{bA} ± 17,5	0,58 ^{bD} ± 0,03
8	223,4 ^{aA} ± 11,9	0,38 ^{aB} ± 0,06	368 ^{aA} ± 5,3	0,42 ^{aB} ± 0,03

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$).

Médias ± desvio padrão.

* Sem qualidade de medida.

Fonte: Autoria própria (2023).

A avaliação do tamanho de partícula, potencial zeta e PDI é importante para entender as mudanças estruturais que ocorrem na proteína antes e após o processo de sonicação. É relevante notar que as medidas de diâmetro médio para o caso em que o ácido tânico foi utilizado como agente reticulante em pH 4 e 5 (Tabela 4) não apresentou qualidade nas medidas, significando que os valores medidos estavam fora da faixa de medição do equipamento, que é de até 1000 nm.

Avaliando as imagens de AFM (Figura 12), verifica-se houve a aglomeração de nanopartículas, o que deve ter ocasionado a dificuldade nas análises de DLS. Segundo Casanova *et al.* (2017), quando ocorre a formação de agregados, os sinais excedem o limite superior do equipamento, dificultando na determinação do diâmetro médio por DLS. Pelas análises de DLS e AFM foi possível observar que houve a formação de partículas com tamanhos nanométricos em todas as condições experimentais e com tamanhos heterogêneos entre si, demonstrando característica polidispersa, assim como a aglomeração das partículas. Chen *et al.* (2022a) verificaram que o ácido tânico promoveu a agregação de moléculas de amido de milho com tamanhos grandes de partículas na estrutura formada. Este achado corrobora com os resultados obtidos por AFM e DLS, posto que, foi possível observar a aglomeração das partículas nestas análises.

Foi possível verificar que o ultrassom não proporcionou alterações significativas nos parâmetros analisados (Tabela 2 e 3), tal fato pode ser devido ao tempo de exposição utilizado, que foi de 1 minuto, bem como, a intensidade utilizada (Zhang *et al.*, 2022). Outro fator que pode ocasionar alterações no tamanho é a potência do ultrassom utilizada, tal fato foi observado por Guo *et al.* (2023), onde complexos de WPI e rutina (WPI-R) tiveram aumento no tamanho médio quando este foi tratado com 150 W e conforme a potência ultrassônica foi aumentando, o tamanho de partícula diminuiu, sendo que, foi possível observar o menor tamanho em 600W. Isto foi correlacionado a destruição das interações entre as partículas resultantes da cavitação e o efeito de cisalhamento do ultrassom com alta intensidade, o que proporcionou uma diminuição no tamanho das partículas (Guo *et al.*, 2023).

Já em relação ao potencial zeta, que é um indicador de estabilidade de dispersões, todas as amostras se mostraram carregadas negativamente, o que significa que na superfície da partícula havia maior quantidade de aminoácidos carregados com carga negativa do que positiva (Nascimento *et al.*, 2023). Valores superiores a -30, podem indicar baixa estabilidade das partículas, visto que, quando os valores do potencial elétrico se aproximam de zero, as partículas tendem a se agregar. Se o potencial zeta (ζ) está entre ± 15 e 0 mV, ocorre a precipitação ou floculação devido a aglomeração das partículas. Diferentemente se o potencial for $> \pm 30$ mV, visto que a repulsão mútua existente entre as partículas é suficiente para impedir que ocorra a aglomeração e resulte então na estabilização do meio (Ochanda; Barnett, 2010; Suriyakalaa *et al.*, 2013). Valores de potencial acima de -30mV e +30mV indicam que o sistema é fortemente aniônico (possui cargas negativas) ou catiônico (possui cargas positivas). Maiores valor de potencial apontam maior tendência de separação entre as partículas e maior repulsão eletrostática, resultando em menor agregação e floculação e estabilidade superior (Kasprzak *et al.*, 2023).

Wouters *et al.* (2022) observaram agregação de partículas de WPI quando o tratamento térmico foi realizado em temperaturas acima de 70 °C. Os autores pontuaram que, quando as proteínas do soro do leite são dissolvidas em água em temperaturas altas (> 70 °C para a beta-lactoglobulina), ligações e/ou interações intermoleculares irreversíveis são formadas. Inicialmente, ocorre o processo reversível de desdobramento da proteína (a qual passa da sua forma globular para linear), fazendo com que grupos funcionais fiquem expostos e conseqüentemente se tornem mais reativos para a participação de interações intermoleculares, tais como, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Isso pode levar ao endurecimento parcial de nanopartículas de WPI e conseqüentemente a formação de agregados, devido à formação de complexos proteicos (Wijayanti *et al.*, 2014).

Nascimento *et al.* (2023) encontraram potencial zeta negativo para hidrogéis de micelas de caseína reticulados com transglutaminase para encapsular antocianinas do extrato de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). Os valores para todas as formulações de suspensões de caseína antes da gelificação variaram entre $-12,5 \pm 0,1$ e $-12,8 \pm 0,1$ tanto para as amostras controle como para as amostras reticuladas.

Von Staszewski *et al.* (2012) relataram que a combinação de soro do leite com polifenóis em pH 6, resultou na redução do tamanho das partículas, o que resultou em partículas de tamanhos em torno de 33 ± 16 nm e o PDI com valores baixos, o que indica uniformidade em suspensões. Diferentemente dos resultados obtidos, onde a adição de ácido tânico fonte de polifenóis proporcionou um aumento no tamanho das partículas, isto pode ser devido a aglomeração das partículas.

O PDI é um índice que indica a dispersibilidade de partículas e um valor abaixo de 0,3 sugere boa polidispersão das partículas, de modo que, quanto mais próximo de zero, mais homogênea é a dispersão (Liu *et al.*, 2020). Este está relacionado à eficiência do processo de homogeneização da dispersão, além de também ser utilizado como indicador da amplitude em relação à distribuição do tamanho das partículas (Rashed *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos de PDI indicam que tanto as nanopartículas antes e após a sonicação apresentaram uniformidade entre nanopartículas e sugere uma distribuição de tamanho relativamente estreita e com forte estabilidade física, exceto as nanopartículas reticuladas com ácido tânico após o processo de sonicação, que apresentaram um PDI alto, demonstrando heterogeneidade das nanopartículas, o que pode estar relacionada a uma ampla distribuição de tamanhos (Li *et al.*, 2022c; Nurul Fitri Marzaman *et al.*, 2022). Outro ponto, é que a sonicação não exerceu efeito sobre o PDI das nanopartículas do grupo sem reticulantes e as com o ácido cítrico como reticulante.

O pH influenciou no diâmetro das partículas para toda a faixa estudada, sendo que, as nanopartículas reticuladas com ácido tânico tiveram o maior diâmetro quando comparadas as amostras sem reticulantes. Em pH 4 foi encontrado o maior diâmetro ($1506 \pm 111,6348$) e em pH 8 o menor ($368 \pm 5,3113$). Estes resultados corroboram com os valores de PDI obtidos, uma vez que, em pH 4 ($0,591 \pm 0,0389$) o valor deste foi maior que em pH 8 ($0,4233 \pm 0,03$), o que pode indicar a presença de aglomerados e uma distribuição heterogênea no tamanho das partículas. Já para as amostras sem reticulantes, o maior tamanho de partículas foi em pH 4 ($337,63 \pm 4,8232$).

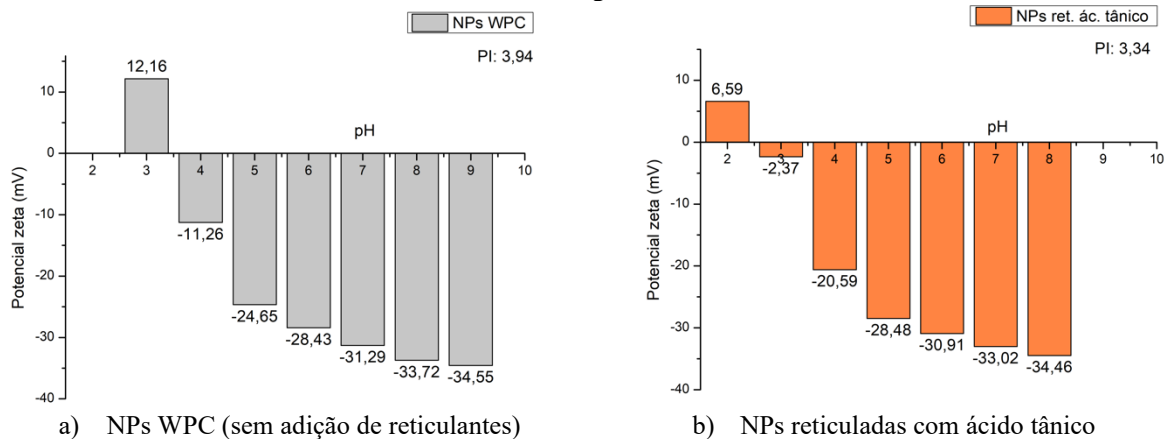
Os resultados em pH 4 podem ser devido a este ser próximo ao ponto isoelétrico (PI) da proteína, onde a repulsão eletrostática é mínima pelo fato de a carga da superfície ser menor,

isso faz com que a estrutura da proteína se torne desordenada resultado da extensão total e despolimerização da proteína, expondo os grupos hidrofóbicos e proporcionando interações mais fortes e ligações não covalentes. Isso resulta em um maior tamanho de partícula neste ponto de pH, além de, ocasionar uma agregação de proteínas de forma mais rápida. Justificando o valor de potencial zeta principalmente para as nanopartículas sem reticulantes, que foi de -11,26 (Li *et al.*, 2023c). Este PI é designado como o pH no qual a molécula é eletricamente neutra neste ponto, ou seja, onde não possui nenhuma carga (Kumar Dan *et al.*, 2022). Segundo observado por Zhang *et al.* (2023b), em um valor absoluto de potencial zeta (20 mV) próximo ao PI da proteína estudada, as nanopartículas de hordeína eram propensas à agregação devido à repulsão eletrostática insuficiente.

Ademais, o pH também influenciou no PDI das nanopartículas reticuladas com ácido tânico, tal maneira que, em pH 8 pode ser observado o menor valor quando comparado com os outros pH. Já para amostras de nanopartículas sem reticulantes, não houve diferença significativa entre a faixa de pH estudada.

O efeito do pH e da força iônica foram selecionados para analisar a estabilidade das nanopartículas com o intuito de observar como estas são influenciadas por estes fatores e quais as possíveis condições em sistemas alimentares elas podem ser aplicadas. A Figura 13 apresenta o efeito do pH sobre o potencial zeta das nanopartículas sem a adição de reticulantes e das nanopartículas reticuladas com ácido tânico.

Figura 13 - Efeito do pH sobre o potencial zeta das nanopartículas.



Fonte: Autoria própria (2023).

Nota-se que as cargas superficiais das nanopartículas se tornaram mais negativas com o aumento do pH (Figura 13a e 13b), ou seja, quando ocorreu o aumento da alcalinidade no meio,

estando de acordo com os resultados de Ji *et al.* (2022) onde o aumento do pH (6, 7 e 8) tornou os complexos de WPC e quercetina mais carregados negativamente.

Ambas as amostras apresentaram comportamento similar em meios mais alcalinos, de possuírem o potencial zeta carregado mais negativamente e apresentarem uma tendência ao equilíbrio na faixa de pH entre 7 a 9. Em contrapartida, houve diferença na faixa de pH 4, onde as NPs sem reticulantes (Figura 13a) apresentaram um valor mais próximo a 0 quando comparado as NPs reticuladas com ácido tânico (Figura 13b), outro fato é que, em pH 3 as NPs sem reticulantes apresentaram carga superficial positiva, diferentemente das NPs reticuladas com ácido tânico, as quais apresentaram carga negativa. Isso pode ser devido ao PI das mesmas, visto que, este foi de 3,94 para as NPs sem reticulantes e 3,34 para as NPs reticuladas com ácido tânico. Uma vez que, em pH maior que o PI, ocorre a perda de prótons dos grupos amino e carboxila das macromoléculas e conseqüentemente, as partículas se tornam carregadas negativamente (Menezes *et al.*, 2019).

Estes dados são importantes para indicar os parâmetros necessários para dispersar eletrostaticamente as NPs, demonstrando que, as regiões de pH mais interessantes é onde a carga superficial é maior, ou seja, mais longe do PI. Vale ressaltar que com estes dados foi possível concluir que o pH é um fator que influencia no valor do potencial zeta. As NPs em pH 8 apresentaram melhor estabilidade quando comparadas as NPs de WPC em pH 4 e que as NPs reticuladas com ácido tânico em pH 3. Em pH onde as NPs não foram estáveis, pode ser devido à coagulação isoelétrica das partículas (Liang; Tang, 2014). Dessa forma, as NPs apresentaram boa estabilidade em faixas de pH mais alcalinas do que ácidas.

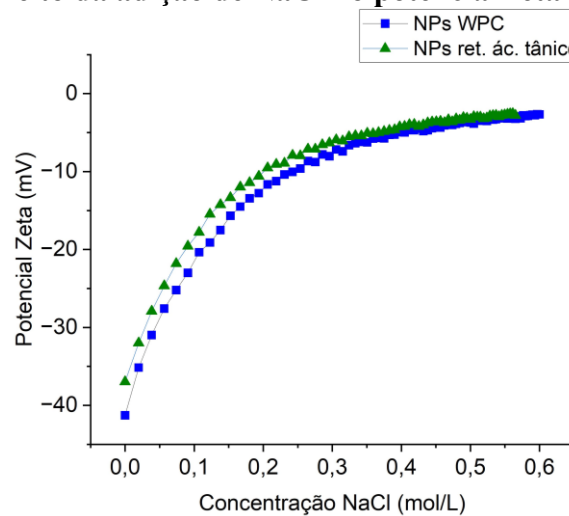
Segundo a literatura, o PI da proteína do soro de leite é próximo a 4,5-5 (Khem *et al.*, 2016), e o PI encontrado foi diferente destes. Tal fato também foi observado por Feng; Lee (2016), onde nanocomplexos de zeína e caseinato de sódio tiveram um PI que não coincidiu com o descrito pela literatura. Isto foi atribuído ao rearranjo molecular do caseinato na superfície coloidal da zeína, o que gerou em uma distribuição de carga superficial do caseinato de forma desigual entre os lados adsorvidos e expostos do mesmo.

Isto pode ter sido ocasionado pelas reticulações feitas nas nanopartículas, tanto a por meio de reticulante, como a por meio da reticulação térmica. Petker *et. al* (2021), relataram que o endurecimento de nanopartículas de gliadina com glutaraldeído reduziu o ponto isoelétrico desta proteína (de 7,1 para 6,5), pois, este reage com os resíduos de lisina da proteína, e a formação de ligações covalentes formadas reduz a carga positiva da superfície da partícula e assim, desloca o ponto isoelétrico para um pH mais baixo.

Em princípio, o potencial zeta não deveria mudar, mas, o tamanho das nanopartículas pode afetar o PI da superfície da mesma, e isto pode alterar o potencial zeta em um determinado pH, proporcionando então resultados diferentes dos encontrados. Mas para tal teoria ser verificada, estudos aprofundados quanto à relação potencial zeta e pH das nanopartículas devem ser realizados (William *et al.*, 2021).

Na Figura 14 é apresentado o efeito da adição de NaCl no potencial zeta das nanopartículas (efeito da força iônica) das nanopartículas sem a adição de reticulantes e das nanopartículas reticuladas com ácido tânico.

Figura 14 - Efeito da adição de NaCl no potencial zeta das nanopartículas.



Fonte: Autoria própria (2023).

Uma desvantagem já relatada em nanopartículas à base de proteínas é a sua baixa estabilidade em relação à força iônica, e isto pode ser observado na Figura 14 (Zhang *et al.*, 2019). A magnitude do potencial zeta diminuiu frente ao aumento das concentrações de sal. Similarmente com Li *et al.* (2023b), onde este comportamento foi observado em nanopartículas de WPI/glucana linear curto com curcumina, tal como, para amostras de nanopartículas somente com WPI e curcumina. Isso também foi observado por Zhang *et al.* (2019) em nanopartículas de resveratrol revestidas com isolado de proteína de soja com e sem alginato de sódio. Igartúa *et al.* (2022) relataram que à medida que a concentração de sal (NaCl) aumentou (de 0 a 100 mM), o módulo de potencial zeta de WPI diminuíram, este fato foi relacionado a neutralização mais eficaz dos íons de cloreto carregados positivamente sob as proteínas do que a neutralização por íons de sódio com grupos de cargas negativas.

5.1.4 Caracterização térmica e espectroscópica das nanopartículas

A Figura 15 apresenta as curvas obtidas por Análise Térmica Diferencial (DTA) para (a) a amostra de WPC sem reticulantes, (b) com adição de ácido cítrico e (c) adição de ácido tânico. Na Figura 16 estão apresentados os termogramas obtidos na Análise Termogravimétrica bem como a derivada das curvas termogravimétricas.

Figura 15 - Curvas de DTA para as nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) com e sem adição de ácido cítrico ou tânico.

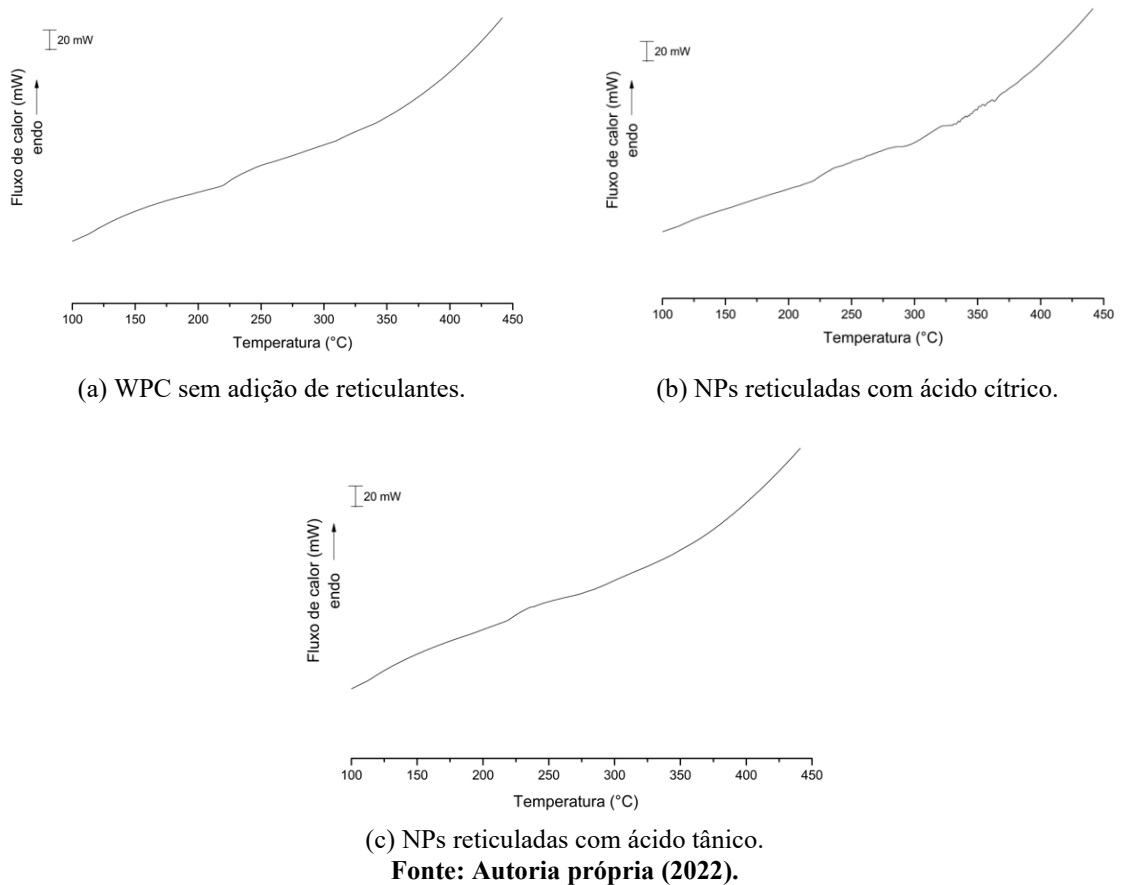
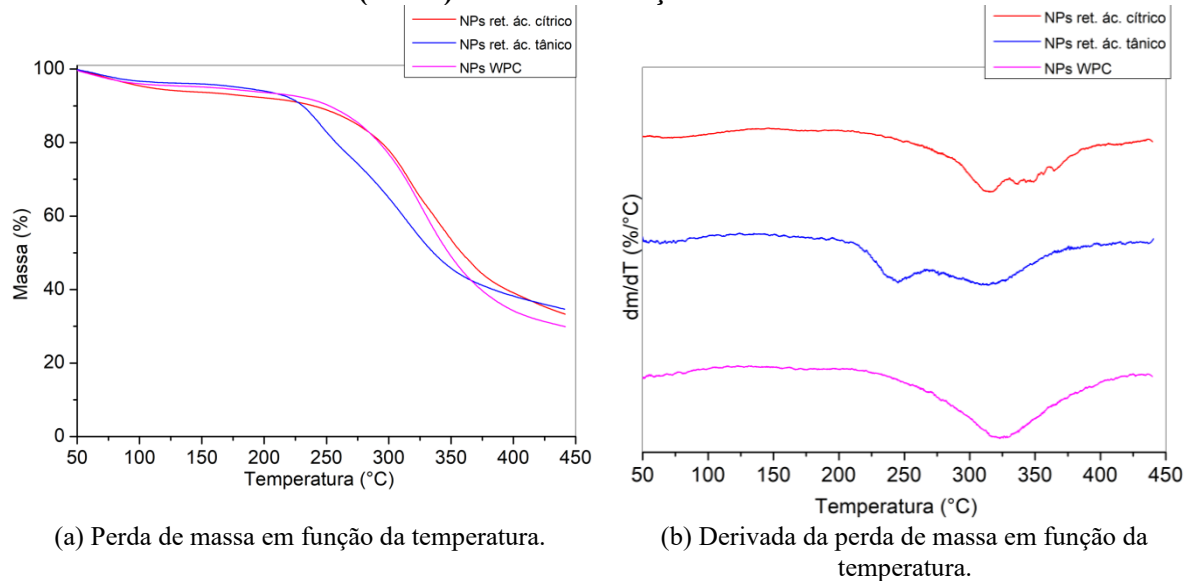


Figura 16 - Curvas termogravimétricas para as nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) com e sem adição de ácido cítrico ou tânico.



Fonte: Autoria própria (2022).

A partir dos resultados obtidos com as curvas de DTA, foi possível verificar que os reticulantes não influenciaram nas propriedades do WPC, não apresentando variações significativas. Winkler *et al.* (2015) também não observaram pontos de fusão ou transições vítreas na segunda varredura de aquecimento para amostra de WPI. Bell; Hageman (1996) e Burin *et al.* (2000), apontaram que em proteínas globulares as temperaturas de transição vítrea são difíceis de detectar pelo fato de sua complexa estrutura secundária e terciária, o que proporciona incremento gradual na capacidade de calor durante a transição vítrea.

Na análise termogravimétrica foi possível observar um comportamento similar entre as amostras no primeiro estágio que ocorre próximo a 50 a 225 °C, que pode estar relacionado a perda de umidade das amostras e desnaturação das proteínas. O estágio de perda de massa que ocorre de 50 a 110 °C normalmente refere-se a perda de umidade das amostras, já acima de 110 °C indica a decomposição dos constituintes das partículas, tais como, carboidratos e proteínas (Carmo *et al.*, 2018). A partir desta temperatura, iniciou-se a decomposição térmica, acima de 225 °C houve perda sucessiva de massa em todas as amostras, com perda total menor na amostra contendo ácido tânico. Picos na região de 220 – 225 °C correspondem ao início da degradação térmica das proteínas (Azevedo *et al.*, 2017; Henao Ossa *et al.*, 2020). O pico próximo a 230 °C no termograma do ácido tânico pode indicar a decomposição do ácido, que segundo Hu *et al.* (2020) ocorre entre 200-360 °C (Nam *et al.*, 2019).

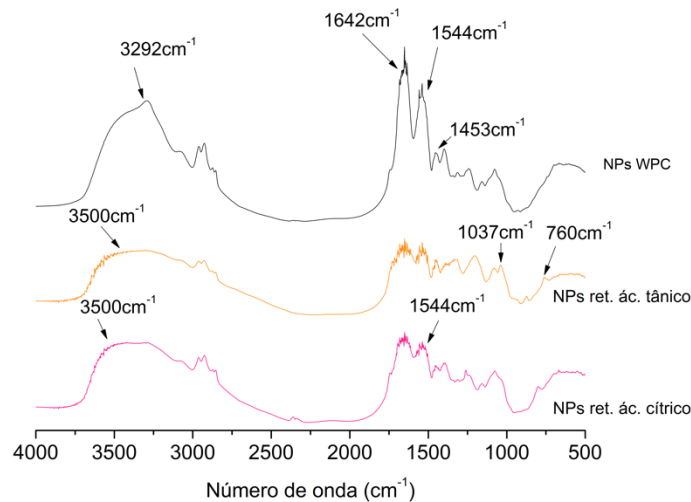
As amostras com os reticulantes apresentaram menor perda de massa ao final da análise em aproximadamente 441,56 °C, a perda total para a amostra com ácido cítrico foi de 66,67%,

para ácido tânico foi de 65,30% e para WPC foi de 70,09%, indicando que a adição de reticulantes diminuiu a perda de massa das nanopartículas. A massa residual foi de 33,32%, 34,69% e 29,90% respectivamente, uma vez que, a massa residual encontrada em temperaturas acima de 400 °C, pode estar relacionada a parte de compostos orgânicos não degradados, tal como, à fração inorgânica dos compostos presentes nas amostras (Cassol; Noreña, 2021).

Conforme relatado por Wang *et al.* (2023), a adição de ácido cítrico como agente reticulante aumentou a estabilidade de filmes de compostos de ovotransferrina-quitosana. Bem como, segundo Guo *et al.* (2022) a reticulação de microcápsulas carregadas de carvacrol com complexos de coacervados de WPI e pectina com alto teor de metoxila por meio de ácido tânico aumentou a estabilidade térmica destas, bem como diminuiu o tamanho das partículas obtidas.

Na Figura 17 estão apresentados os espectros obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) para as amostras.

Figura 17 - Espectros de FTIR para as nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) sem reticulação e com reticulação por ácido cítrico ou ácido tânico.



Fonte: Autoria própria (2022).

Em relação às principais bandas do espectro de FTIR, a banda próxima a 3292 cm^{-1} no espectro de nanopartículas sem reticulantes pode ser atribuída ao alongamento do grupamento N-H. A intensidade diminuída da banda relacionada à amida II (1544-1542 cm^{-1}) no espectro de nanopartículas reticuladas com ácido cítrico pode ser atribuída à reação de reticulação entre os grupos N-H das proteínas do soro do leite e os grupos carboxila do ácido cítrico, que resultou na diminuição da quantidade de grupos N-H, bem como a redução da amida I (1642 cm^{-1}) relacionada a vibração C=O. Contudo, o espectro das nanopartículas reticuladas com ácido cítrico se mostrou similar ao das nanopartículas sem reticulantes, o que sugere que a estrutura

em geral das proteínas foi preservada (Silva *et al.*, 2021). As bandas em 1544 cm^{-1} estão associadas à amida II, que correspondem à flexão de N-H acoplada com C-N, característicos de estruturas proteicas (Anvari; Chung, 2016; Uranga *et al.*, 2019).

Abaee *et al.* (2017) sugeriram que alterações nas bandas de amidas após a reticulação podem estar associadas à novas ligações amida entre o ácido cítrico e as proteínas do soro, que resultam em características distintas quando comparadas às ligações amida que ocorrem naturalmente nas proteínas do soro (ligações peptídicas). Outro ponto é que a largura da banda nesta região se apresentou de forma mais larga, o que pode sugerir a formação de pontes de hidrogênio por grupos O-H provenientes do ácido cítrico (banda próxima a $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) (Farjami *et al.*, 2015b). Ainda, observou-se no espectro das amostras reticuladas o alargamento da banda em virtude da provável formação de ligações de hidrogênio pelos grupos O-H das moléculas dos ácidos, como relatado por Miller (2004).

Para amostras com nanopartículas reticuladas com ácido tânico, foram observadas bandas em 1037 e 760 cm^{-1} . Bandas próximas a 1038 cm^{-1} que podem indicar a presença do grupamento C–O (Camparotto *et al.*, 2023). As bandas próximas a 754 cm^{-1} são atribuídas à vibração C=C em anéis benzênicos (Castro; Rodríguez, 2012), estando provavelmente relacionada com a estrutura terciária relacionada à reação entre os grupos hidroxila do ácido tânico e os grupos amida da proteína do soro de leite (Silva *et al.*, 2021). Tais bandas não foram encontradas no espectro das amostras de nanopartículas sem reticulantes, assim, indicando a incorporação do ácido tânico na formulação das nanopartículas. Além do mais, estes achados podem indicar que a principal força de ligação intermolecular entre a proteína do soro de leite e o ácido tânico foi a ligação de hidrogênio (Chen *et al.*, 2022a).

5.2 Caracterização do óleo de chia

A composição e os teores dos ácidos graxos do óleo de chia são apresentados na Tabela 5, os ácidos graxos foram divididos segundo sua classificação em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados.

Tabela 5 – Caracterização da composição do óleo de chia.

Composição de ácidos graxos	Média (%) e desvio padrão
Ácidos graxos saturados (SFA)	
Ácido palmítico (C _{16:0})	10,23 ± 0,03
Ácido esteárico (C _{18:0})	4,70 ± 0,04
Ácido araquídico (C _{20:0})	0,48 ± 0,01
Ácido lignocérico (C _{24:0})	0,18 ± 0,01
Ácido beênico (C _{22:0})	0,17 ± 0,01
Ácido tetradecanóico (C _{14:0})	0,06 ± 0,01
Total	15,82
Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs)	
Ácido oleico (C _{18:1} ω-9)	8,99 ± 0,09
Ácido eicosenóico (C _{20:1})	0,18 ± 0,01
Ácido palmitoleico (C _{16:1} ω-9)	0,09 ± 0,01
Total	9,26
Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)	
Ácido linolênico (C _{18:3} ω-3)	53,59 ± 0,01
Ácido linoleico (C _{18:2} ω-6)	20,97 ± 0,15
Total	74,56
Compostos não identificados (NI)	
Não identificados (NI)	0,30 ± 0,01

Fonte: Autoria própria (2023).

O principal ácido graxo encontrado no óleo de chia analisado foi o ácido linolênico (53,59 ± 0,01) seguido do ácido linoleico (20,97 ± 0,15), demonstrando que o óleo de chia é uma boa fonte para a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (Inácio *et al.*, 2018). O perfil dos ácidos graxos avaliados está de acordo com aquele relatado por Zanqui *et al.* (2014), uma vez que, os principais ácidos graxos encontrados no óleo de chia foram os ácidos α-linolênico, linoleico, oleico, palmítico e esteárico, respectivamente. Bem como os teores aproximados segundo Ghafoor *et al.* (2020), que encontraram teores de 59,84% ± 1,76 de ácido linolênico, 20,57% ± 0,65 de ácido linoléico, 10,09% ± 0,57 de ácido oleico e 7,08% ± 0,21 de ácido palmítico no óleo de sementes de chia. Rojas *et al.* (2019) analisaram que entre os ácidos graxos saturados presentes no óleo de chia, o com maior teor foi o ácido palmítico (4,46 ± 0,02), e em relação ao ácido graxo monoinsaturado foi o ácido oleico (4,02 ± 0,01), como observado nesta caracterização, porém, com menores teores. Estas diferenças encontradas quanto aos teores de ácidos graxos podem ser atribuídas a questões genéticas, agrônômicas, geográficas, climáticas

e aos métodos de produção e manejo pós colheita das sementes, bem como, a fatores relacionados à extração do óleo (Di Marco *et al.*, 2020; Ghafoor *et al.*, 2018).

Os benefícios que os PUFAs (ω -3 e ω -6) exercem sob a saúde humana estão sendo cada vez mais estudados, um exemplo é a importância destes ácidos graxos na sinalização neuronal na depressão e nos processos cognitivos. Proporções inadequadas ou deficiência de PUFA no tecido cerebral pode estar associado ao comprometimento cognitivo e a transtornos depressivos (Liu *et al.*, 2015; Stachowicz, 2023). Os PUFAs também desempenham papel significativo em doenças crônicas, cardiovasculares e diabetes mellitus. Ademais, são precursores de mediadores lipídicos como, docosanóides e eicosanóides que possuem atividades anti-inflamatórias (Czumaj; Śledziński, 2020).

Segundo alguns estudos, existe uma proporção na relação de n-3 e n-6 que deve ser ingerida, porém, a proporção mais apropriada ainda não foi definida de maneira única para a nutrição humana, alguns estimam a proporção de n-6:n-3 de aproximadamente 1:4,1, uma vez que, os ácidos n-3 possuem principalmente efeito anti-inflamatório e o n-6 possui efeito antagônico, ou seja, pró-inflamatório. Em contrapartida, estes efeitos também não são tão claros, uma vez que, o n-6 também pode desempenhar funções anti-inflamatórias por meio de moléculas específicas, como por exemplo, o ácido gama linolênico (Johnson; Fritsche, 2012; Poli *et al.*, 2023; Rizzo, *et al.*, 2023). Como demonstrado no estudo realizado por Bjermo *et al.* (2012), uma dieta enriquecida com n-6 em indivíduos com obesidade abdominal proporcionou melhora no estado metabólico, menor índice de gordura hepática e melhora moderada nos níveis de insulina em jejum e nos lipídios sanguíneos, sem sinais de estresse oxidativo ou inflamação quando comparado a uma dieta enriquecida em ácidos graxos saturados (SFA).

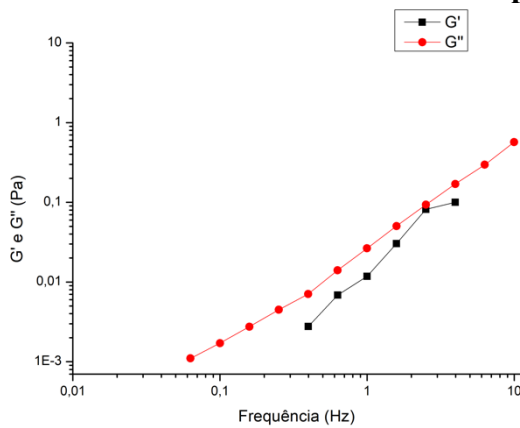
Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) também estão presentes no cotidiano dos seres humanos, um exemplo, é o ácido oleico encontrado em várias fontes vegetais. Há estudos sobre os efeitos destes ácidos graxos sob o sistema cardiovascular, porém, os resultados são inconsistentes quanto ao risco de mortalidade. Um estudo recente indicou que os MUFAs provenientes de alimentos à base de plantas foram correlacionados a um menor risco de doença cardíaca coronária (Zong *et al.*, 2018). Ao contrário dos SFA, onde pesquisas indicam que dietas ricas com estes ácidos podem ocasionar efeitos prejudiciais no organismo, principalmente em relação aos riscos para com a saúde cardiovascular (Gillingham; Harris-Janz; Jones, 2011; Liu *et al.*, 2022).

5.3 Caracterização das emulsões de Pickering

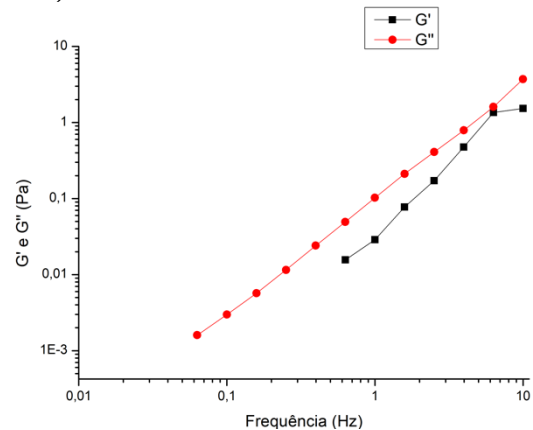
5.3.1 Reologia

Na Figura 18 são apresentados os gráficos de varreduras de frequência das emulsões obtidas com as nanopartículas de WPC reticuladas com ácido tânico (NPs AT), reticuladas termicamente (NPs WPC) e emulsão sem adição de nanopartículas (branco). É apresentado o gráfico com o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') em função da frequência (Hz).

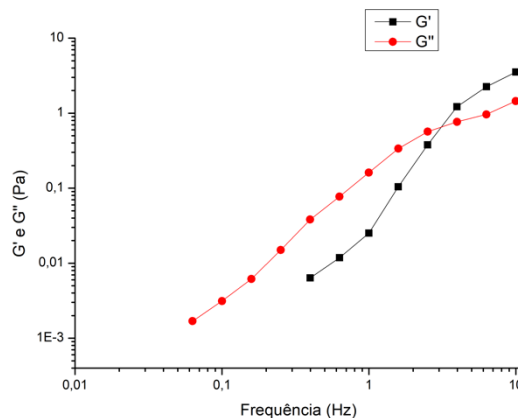
Figura 18 - Varredura de frequência (80:20 w/o, 2% de nanopartículas e sem a adição de nanopartículas).



(a) Emulsão sem adição de nanopartículas (Branco).



(b) Emulsão com adição nanopartículas sem reticulantes.



(c) Emulsão com adição nanopartículas reticuladas com ácido tânico.

Fonte: Autoria própria (2023).

O comportamento viscoelástico de um material pode ser analisado através de varreduras de frequência através de ensaios oscilatórios dinâmicas, variações quanto aos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') permitem caracterizar a estrutura de rede de uma amostra. O

módulo de armazenamento corresponde a energia armazenada na amostra, e o módulo de perda, define a perda de energia devido à dissipação viscosa da amostra. Estes módulos podem ser utilizados para analisar a estabilidade de formulações (Nesterenko *et al.*, 2014).

Foi possível verificar que (Figura 18), as emulsões estabilizadas com nanopartículas reticuladas com ácido tânico apresentaram um ponto em que os valores de G' foram iguais aos de G'' (3,10 Hz). Acima desta frequência há um predomínio do módulo elástico em altas frequências (Torres *et al.*, 2007). Este comportamento é característico de soluções viscoelásticas.

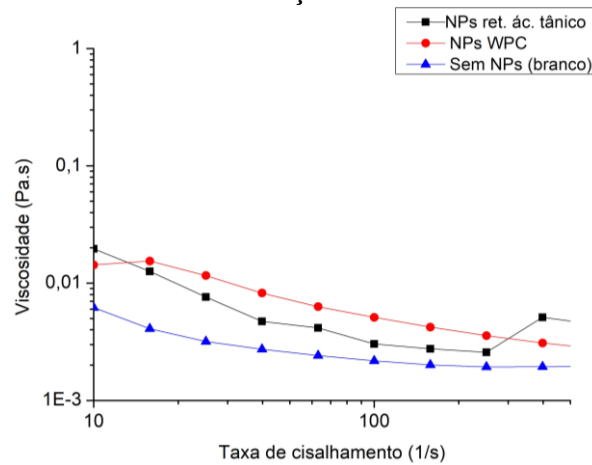
Já para as demais emulsões, o G'' foi maior em toda a faixa de frequência e os valores deste módulo foram superiores em toda a faixa para as amostras com nanopartículas de WPC, indicando predomínio do módulo viscoso. As emulsões sem nanopartículas apresentaram valores de G' e G'' baixos, sendo os valores de G' inicialmente eram negativos. Além disso, todas as emulsões apresentaram módulos dependentes da frequência.

Segundo Maia Filho *et al.* (2012), emulsões relativamente estáveis apresentam comportamento elástico predominante, e que quanto maior o valor de G' maior é a estabilidade da emulsão. Ademais, o módulo G' é visto como um bom indicador da reticulação e interação de moléculas interfaciais, o que pode estar relacionando ao maior valor inicialmente de G' nas emulsões com nanopartículas reticuladas com ácido tânico (L *et al.*, 2019).

Quando a emulsão apresenta valores de G'' maiores que G' , a emulsão demonstra comportamento viscoelástico líquido (Kaganyuk; Mohraz, 2019). Como observado, soluções diluídas apresentam $G'' \gg G'$ e comportamento acentuadamente dependente da frequência de medição (Ross-Murphy, 1995; Torres *et al.*, 2007). Quando G' é maior que G'' e ambos são independentes da frequência, existe a presença de uma estrutura de rede, e quando G' é menor ou igual G'' e estes são dependentes da frequência, isso indica que os sistemas são semelhantes à líquidos viscosos e com nenhuma ou pouca estrutura de rede. Isso se deve à distância entre as gotículas da fase dispersa que são incapazes de interagir (Torres *et al.*, 2007).

A Figura 19 apresenta as curvas de fluxo das emulsões obtidas com 2% de nanopartículas de WPC reticuladas com ácido tânico (NPs ret. ác. tânico) e reticuladas termicamente (NPs WPC) na proporção de 80:20 w/o. A curva de fluxo para a emulsão sem adição de nanopartículas (branco) também é apresentada.

Figura 19 - Curvas de fluxo das emulsões com e sem a adição de nanopartículas nas concentrações de 2%.



Fonte: Autoria própria (2023).

A curva de fluxo (Figura 19) obtida indica que as emulsões apresentaram comportamento reológico não newtoniano mostrado como pseudoplástico, uma vez que, a viscosidade do sistema diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento. Tal comportamento é típico de emulsões estabilizadas por meio de partículas sólidas (Nesterenko *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2007). Segundo Liu *et al.* (2021), o efeito de cisalhamento de alta velocidade quebra a fraca força de interação que mantêm a flocculação estável. A força de cisalhamento rompe a ponte existente entre as gotas emulsionadas, interrompendo as forças de interação que mantêm a estabilidade da emulsão, ocasionando um afinamento por cisalhamento (Wang *et al.*, 2023a). Outro fato é que este comportamento é comum para a maioria das emulsões alimentícias, dado que, a aplicação de cisalhamento pode resultar nesta pseudoplasticidade (Couto, 2014).

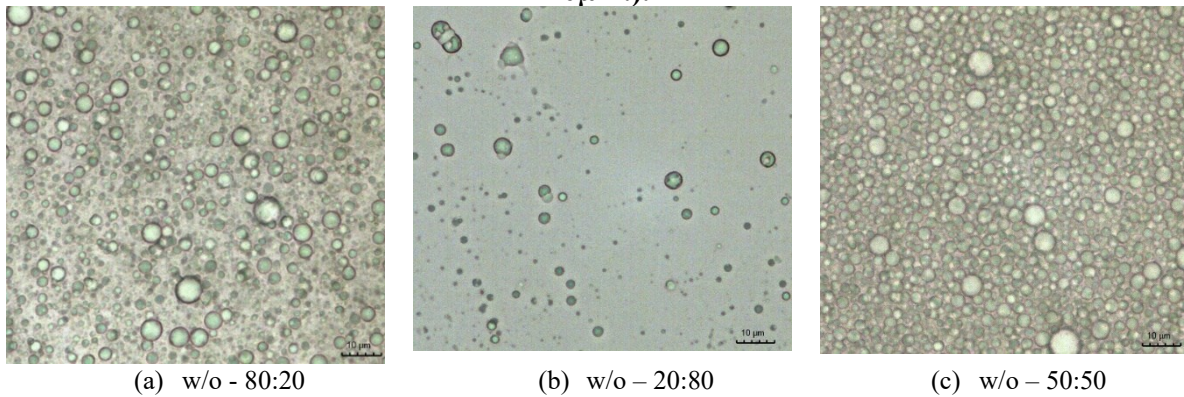
O comportamento reológico refletiu as propriedades de fluxo das emulsões, e indicam que as emulsões sem a adição de NPs são menos viscosas em comparação com as emulsões com a adição de NPs (Nesterenko *et al.*, 2014). Todas as emulsões apresentaram diminuição na viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Em contrapartida, a viscosidade das emulsões em altas taxas de cisalhamento tendeu a atingir um efeito platô newtoniano, principalmente para a amostra com NPs WPC e a sem adição de NPs (branco), onde, a viscosidade diminuiu gradualmente para próximo a zero (W *et al.*, 2017).

Wang *et al.* (2023a) formularam nanoemulsões preparadas com conjugados de proteína do soro de leite-carboximetilquitosana que apresentaram comportamento pseudoplástico. Taylor *et al.* (2012), observaram uma diminuição da viscosidade de gomas de gelana após o tratamento com ultrassom, que foi relacionado a redução do peso molecular das amostras.

5.3.2 Análise microscópica

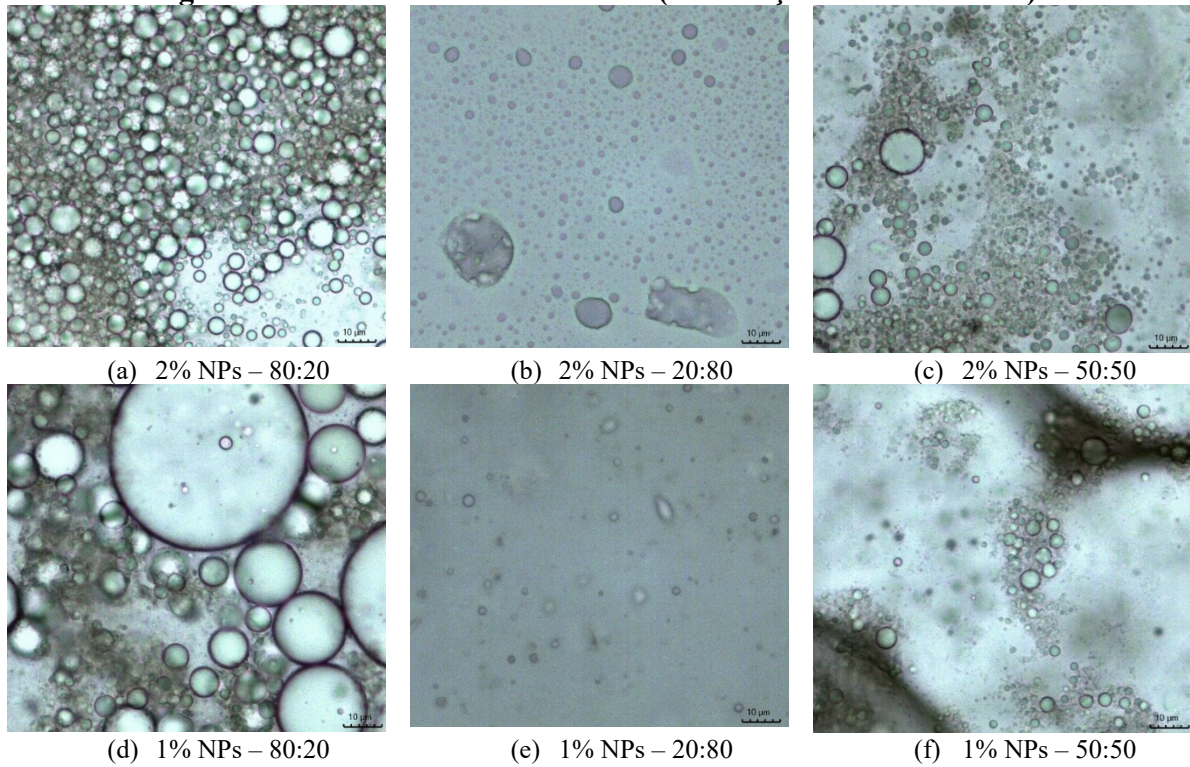
Nas Figuras 20, 21 e 22 estão apresentadas as micrografias das emulsões em todas as concentrações e frações de óleo estudadas e nas Figuras 23, 24 e 25 os histogramas de distribuição de frequências das estimativas do diâmetro de algumas gotas de emulsões.

Figura 20 - Emulsões sem adição de nanopartículas (NPs) (branco) (barra representa 10 μ m.).



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 21 - Emulsões com NPs WPC (sem adição de reticulantes).



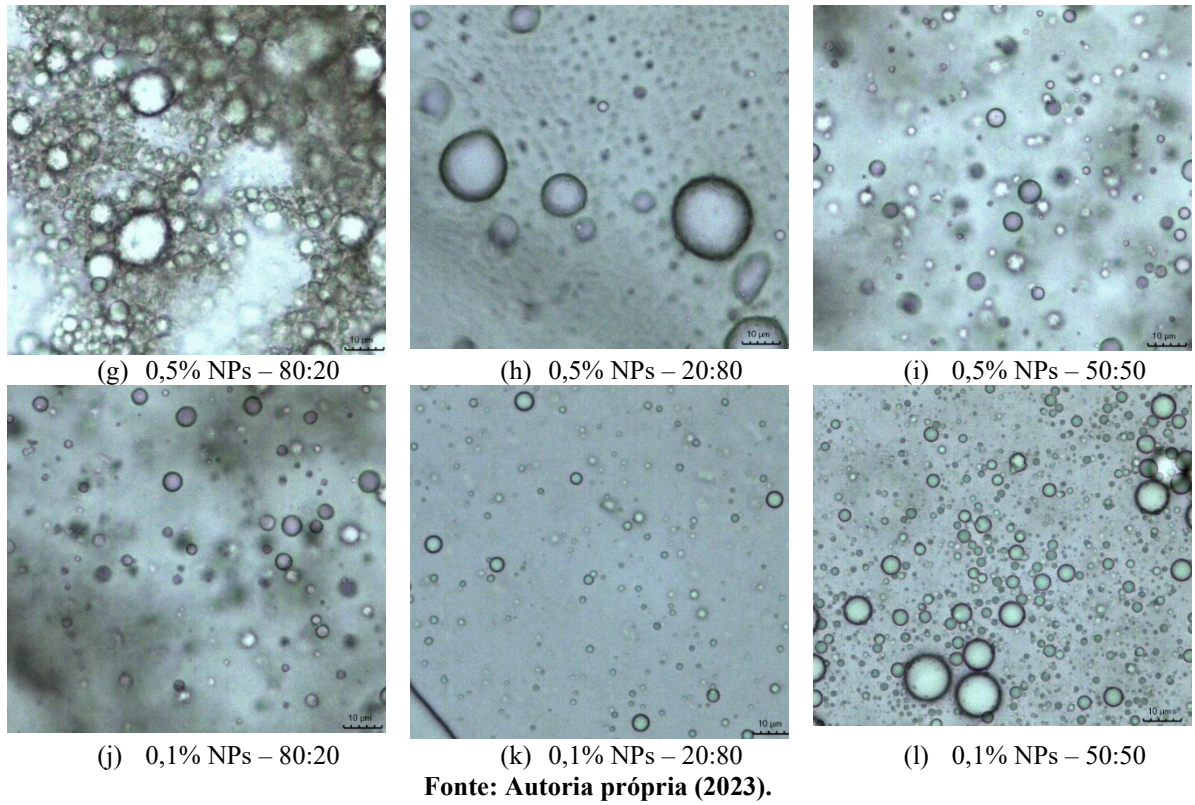
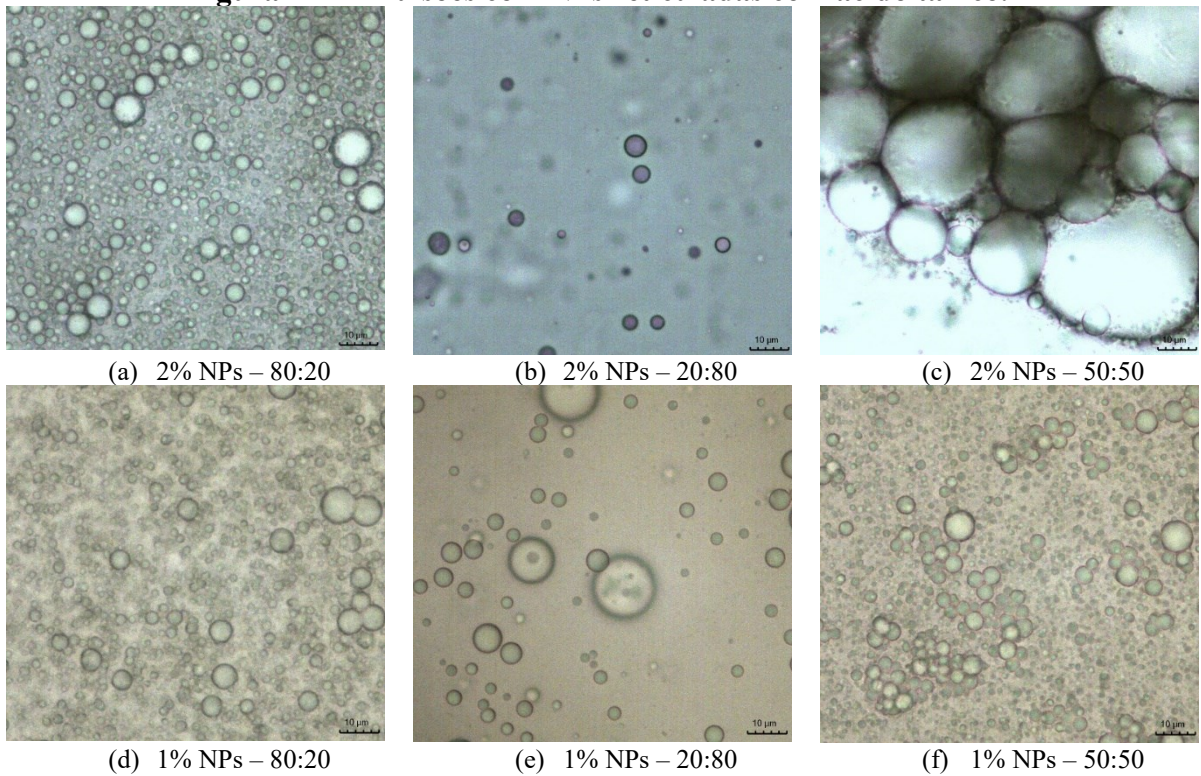
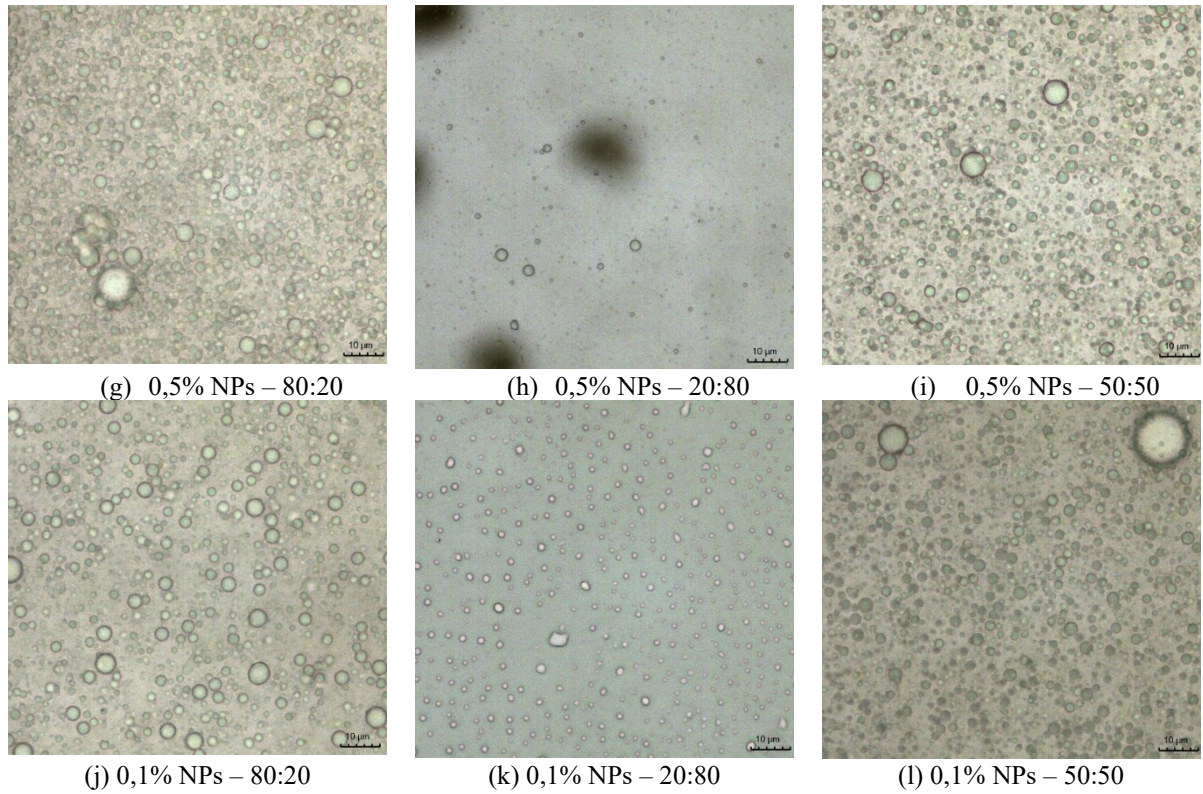


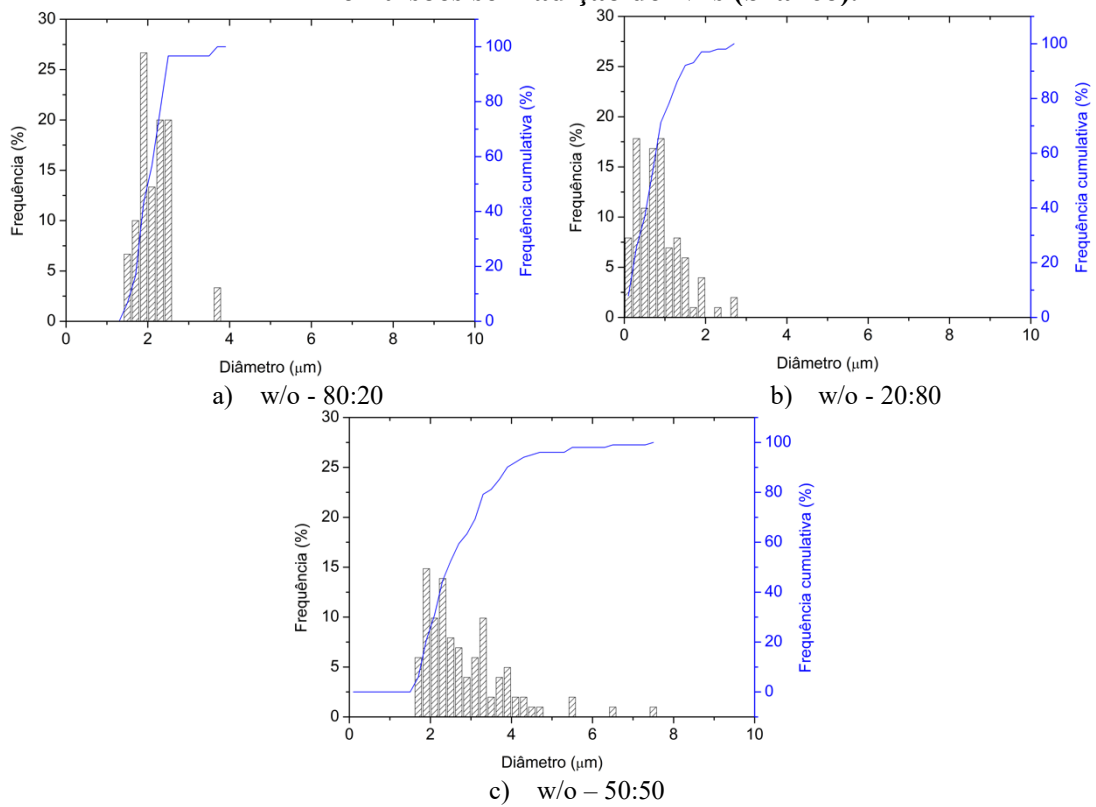
Figura 22 - Emulsões com NPs reticuladas com ácido tânico.





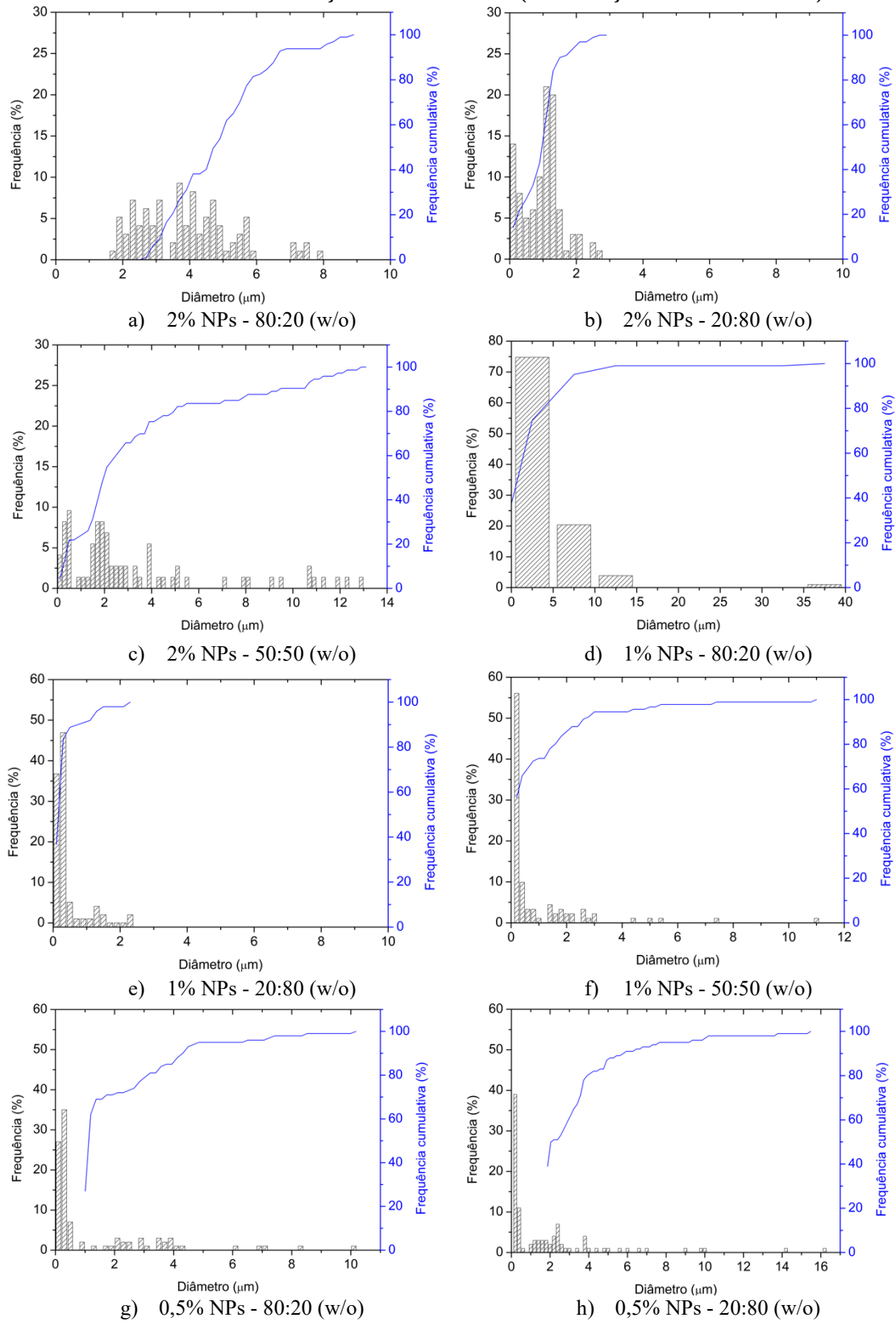
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 23 - Histogramas obtidos através dos dados de distribuição de tamanhos para emulsões sem adição de NPs (branco).



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 24 - Histogramas obtidos através dos dados de distribuição de tamanhos para emulsões com adição de NPs WPC (sem adição de reticulantes).



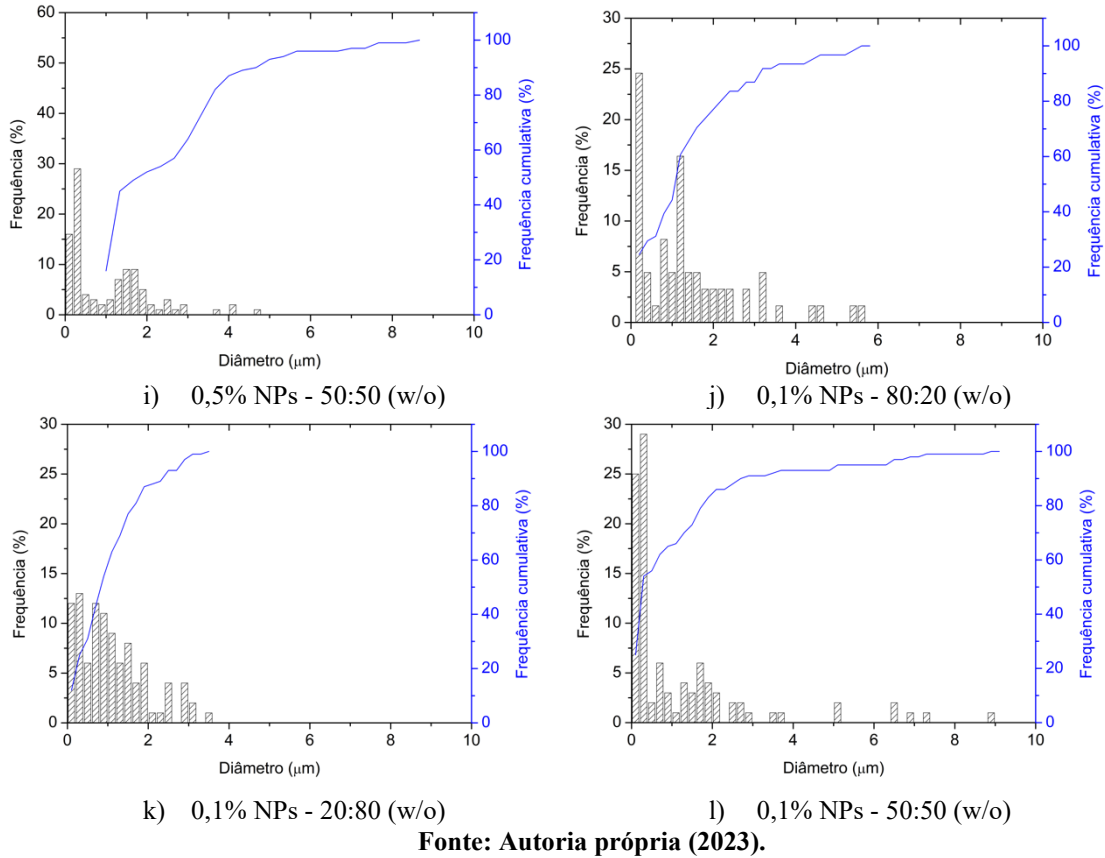
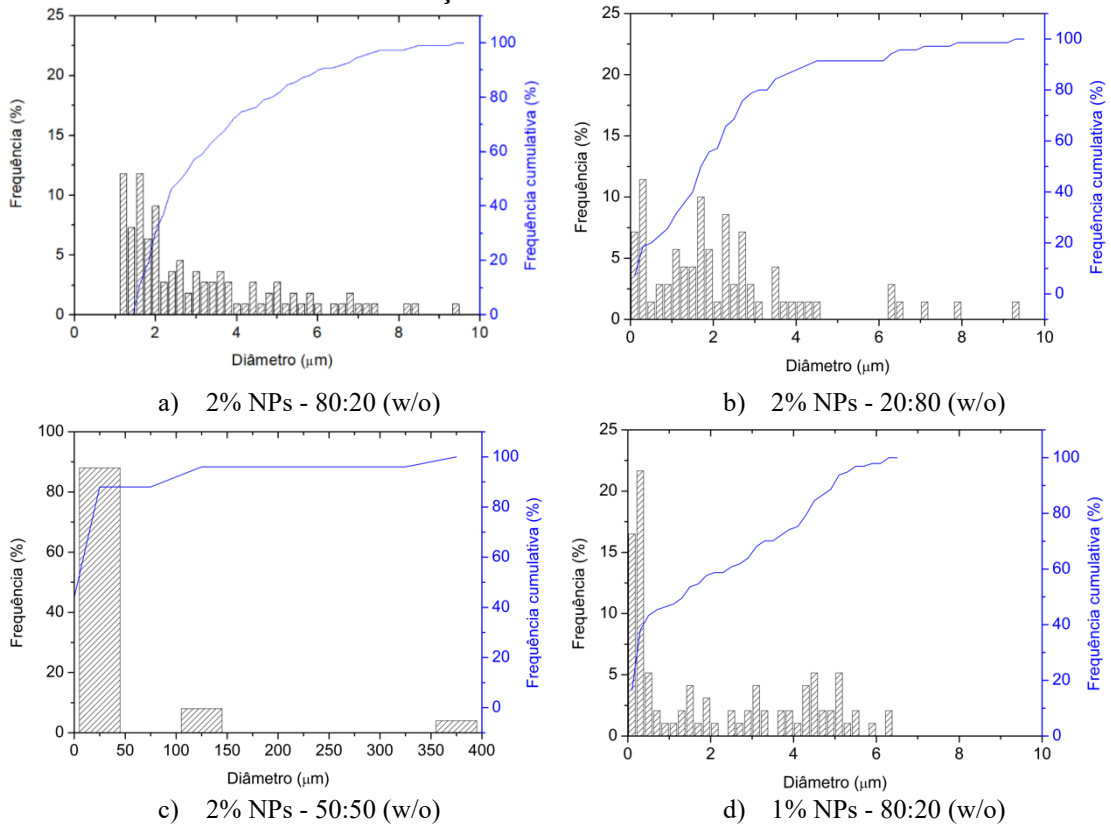
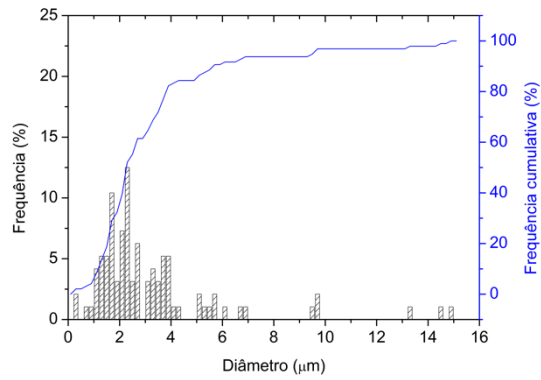
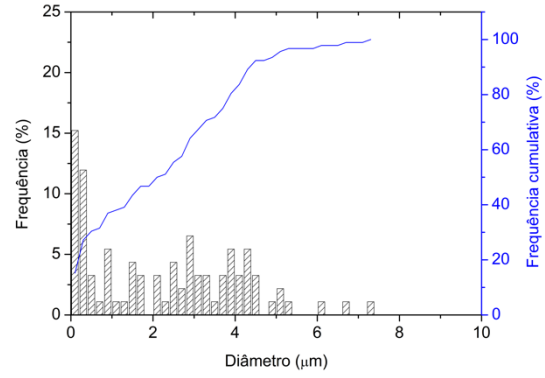


Figura 25 - Histogramas obtidos através dos dados de distribuição de tamanhos para emulsões com adição de NPs reticuladas com ácido tânico.

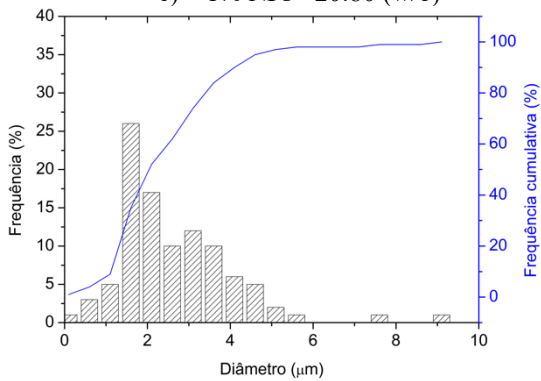




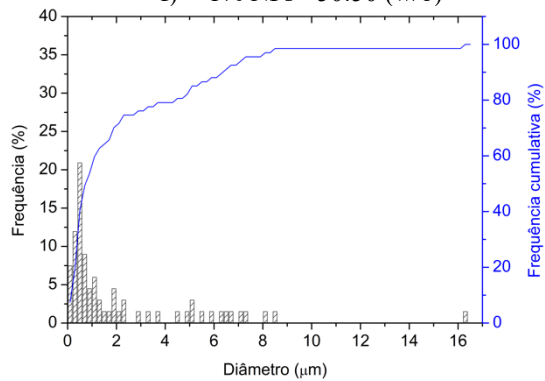
e) 1% NPs - 20:80 (w/o)



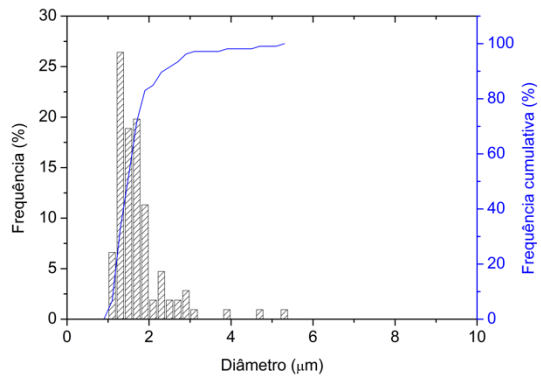
f) 1% NPs - 50:50 (w/o)



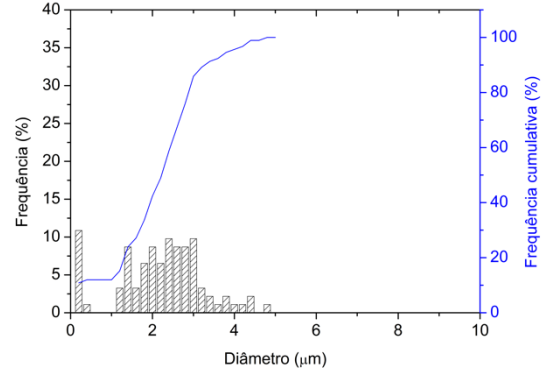
g) 0,5% NPs - 80:20 (w/o)



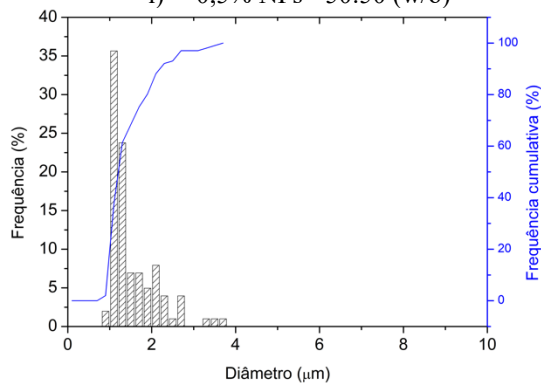
h) 0,5% NPs - 20:80 (w/o)



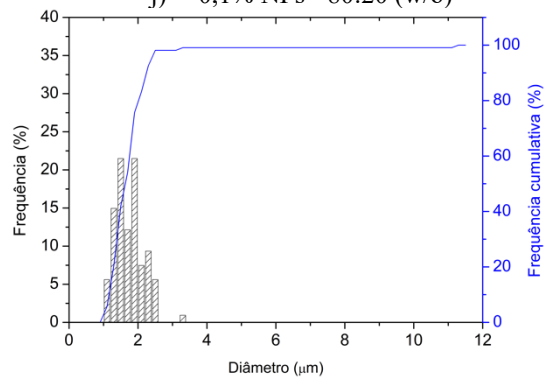
i) 0,5% NPs - 50:50 (w/o)



j) 0,1% NPs - 80:20 (w/o)



k) 0,1% NPs - 20:80 (w/o)



l) 0,1% NPs - 50:50 (w/o)

Fonte: Autoria própria (2023).

Na Tabela 6 são apresentados os diâmetros médios das gotas para as emulsões estabilizadas por meio de nanopartículas WPC (sem adição de reticulantes) e nanopartículas reticuladas com ácido tânico em diferentes frações de óleo.

Tabela 6 – Diâmetro médio de gotas das emulsões.

	Concentração de nanopartículas (%)	Emulsão (água:óleo)	Diâmetro médio (μm)
Branco (sem NPs)	-	80:20	$4,47 \pm 16,03$
		20:80	$0,82 \pm 0,55$
		50:50	$2,81 \pm 1,04$
NPs WPC	2,0	80:20	$3,91 \pm 1,43$
		20:80	$1 \pm 0,60$
		50:50	$2,88 \pm 3,06$
	1,0	80:20	$3,97 \pm 5,13$
		20:80	$0,36 \pm 0,41$
		50:50	$0,51 \pm 0,83$
	0,5	80:20	$0,83 \pm 1,54$
		20:80	$1,48 \pm 3,11$
		50:50	$0,82 \pm 1,16$
	0,1	80:20	$1,16 \pm 0,97$
		20:80	$0,95 \pm 0,76$
		50:50	$1,22 \pm 1,74$
NPs ret. ác. tânico	2,0	80:20	$2,99 \pm 1,92$
		20:80	$2,51 \pm 2,15$
		50:50	$13,04 \pm 9,00$
	1,0	80:20	$2,078 \pm 1,99$
		20:80	$3,16 \pm 2,74$
		50:50	$2,15 - 1,83$
	0,5	80:20	$2,66 \pm 1,35$
		20:80	$1,58 \pm 2,93$
		50:50	$1,73 \pm 0,68$
	0,1	80:20	$2,04 \pm 1,17$
		20:80	$1,52 \pm 0,56$
		50:50	$1,76 \pm 0,40$

Valor expresso em média mais desvio padrão.

Fonte: Autoria própria (2023).

Ambos os grupos de emulsões com nanopartículas em todas as concentrações de nanopartículas e frações de óleo (Tabela 6) apresentaram faixa de diâmetros médios sem diferença significativa ($>0,05$). As emulsões com nanopartículas sem reticulantes (NPs WPC) apresentaram faixa entre $0,087$ a $35,85 \mu\text{m}$, e as nanopartículas reticuladas com ácido tânico entre $0,087$ - $31,16 \mu\text{m}$. Diferentemente das emulsões sem a adição de nanopartículas (w/o), que apresentaram uma faixa de diâmetro de $0,12$ a $149,041 \mu\text{m}$. As gotas das emulsões com proporção água:óleo igual a $80:20$ apresentaram um perfil semelhante para todas as formulações

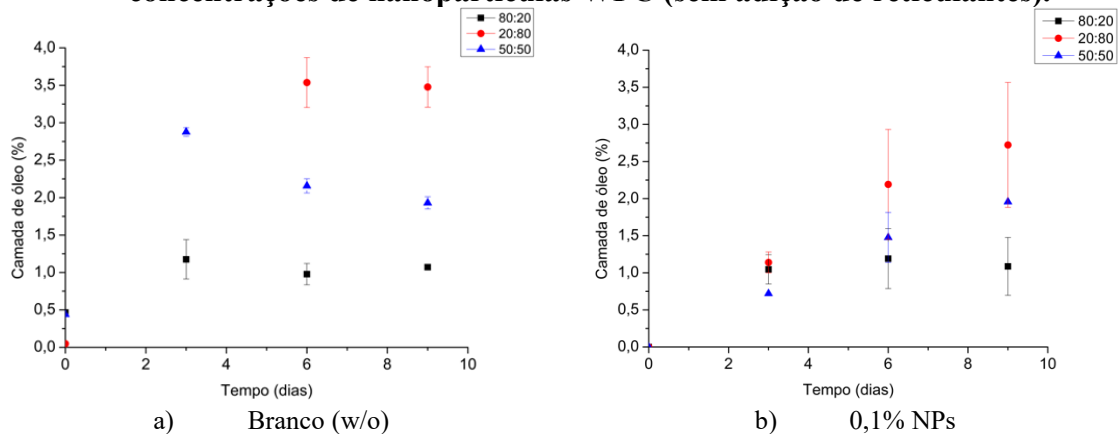
(formato esférico bem definido). As emulsões com 2% (50:50 – água:óleo) de nanopartículas reticuladas com ácido tânico (Figura 22 c) apresentaram tamanhos de gotas maiores com formatos irregulares e com a área toda recoberta por gotas de óleo. As emulsões com 1% (80:20 – água:óleo) de nanopartículas WPC sem adição de reticulantes (Figura 21 d) também apresentaram maiores tamanhos de gotas.

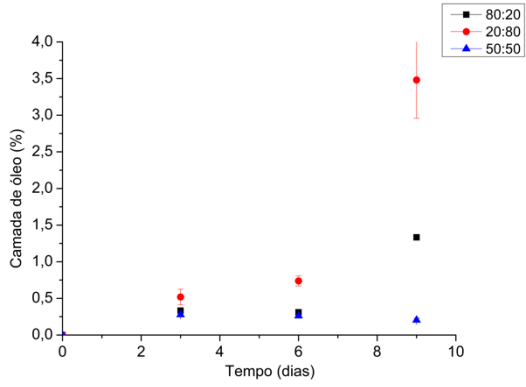
Emulsões que possuem tamanhos de gotas menores têm uma área de superfície maior e normalmente são mais estáveis, posto que as partículas conseguem facilmente adsorverem na interface O/A, proporcionando uma adequada cobertura da superfície para estabilizar a emulsão (SU *et al.*, 2023). Em contrapartida, um maior tamanho de gota da emulsão está associado à uma maior taxa de cremação (Yang *et al.*, 2021). Foi possível observar agregados de gotículas pequenas próximos às gotas grandes, esta agregação e floculação de pequenas gotículas auxilia na criação de uma camada de proteção para as gotas de tamanhos maiores (Nesterenko *et al.*, 2014).

5.3.3 Análise macroscópica das emulsões

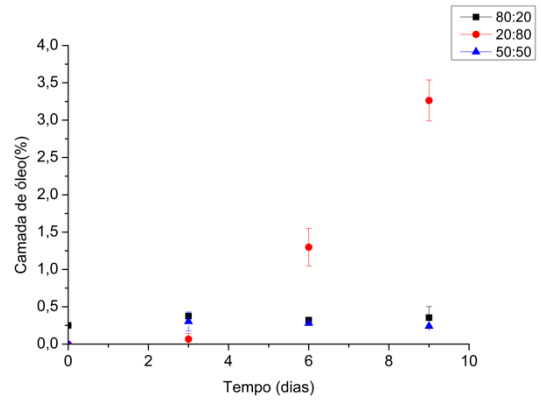
Nas Figuras 26 e 27 estão apresentados os gráficos relativos à estabilidade das emulsões ao longo do tempo. Nas Figuras 28, 29 e 30 estão apresentadas as imagens das emulsões em diferentes concentrações e tempos. (As amostras denominadas O+A refere-se à mistura de óleo e água na proporção de 50:50 (w/o) sem a adição de nanopartículas e sem a homogeneização com o ultrassom, somente a homogeneização manualmente).

Figura 26 - Estabilidade ao longo do tempo para diferentes frações de óleo e água e concentrações de nanopartículas WPC (sem adição de reticulantes).

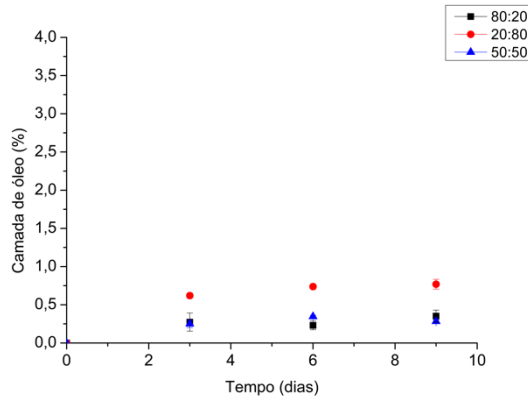




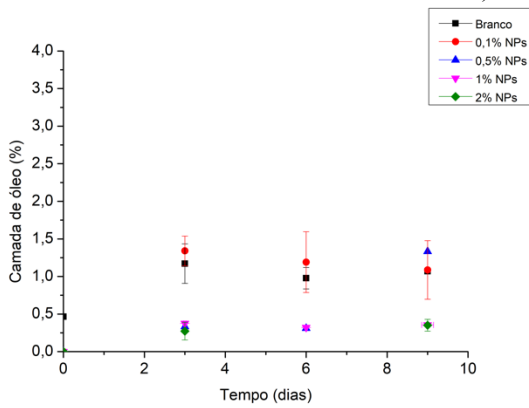
c) 0,5% NPs



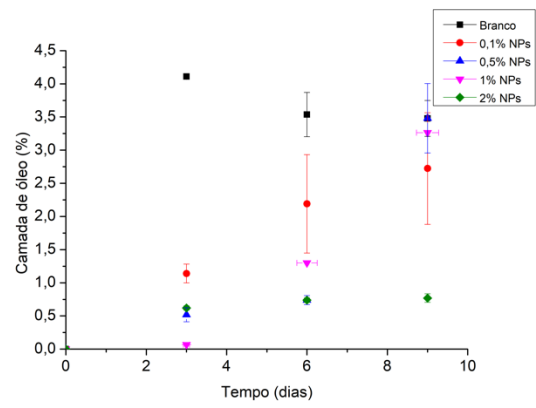
d) 1% NPs



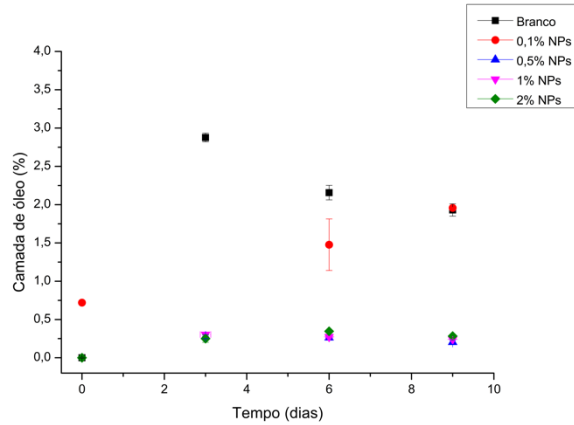
e) 2% NPs



f) Fração de óleo 80:20 (w/o).



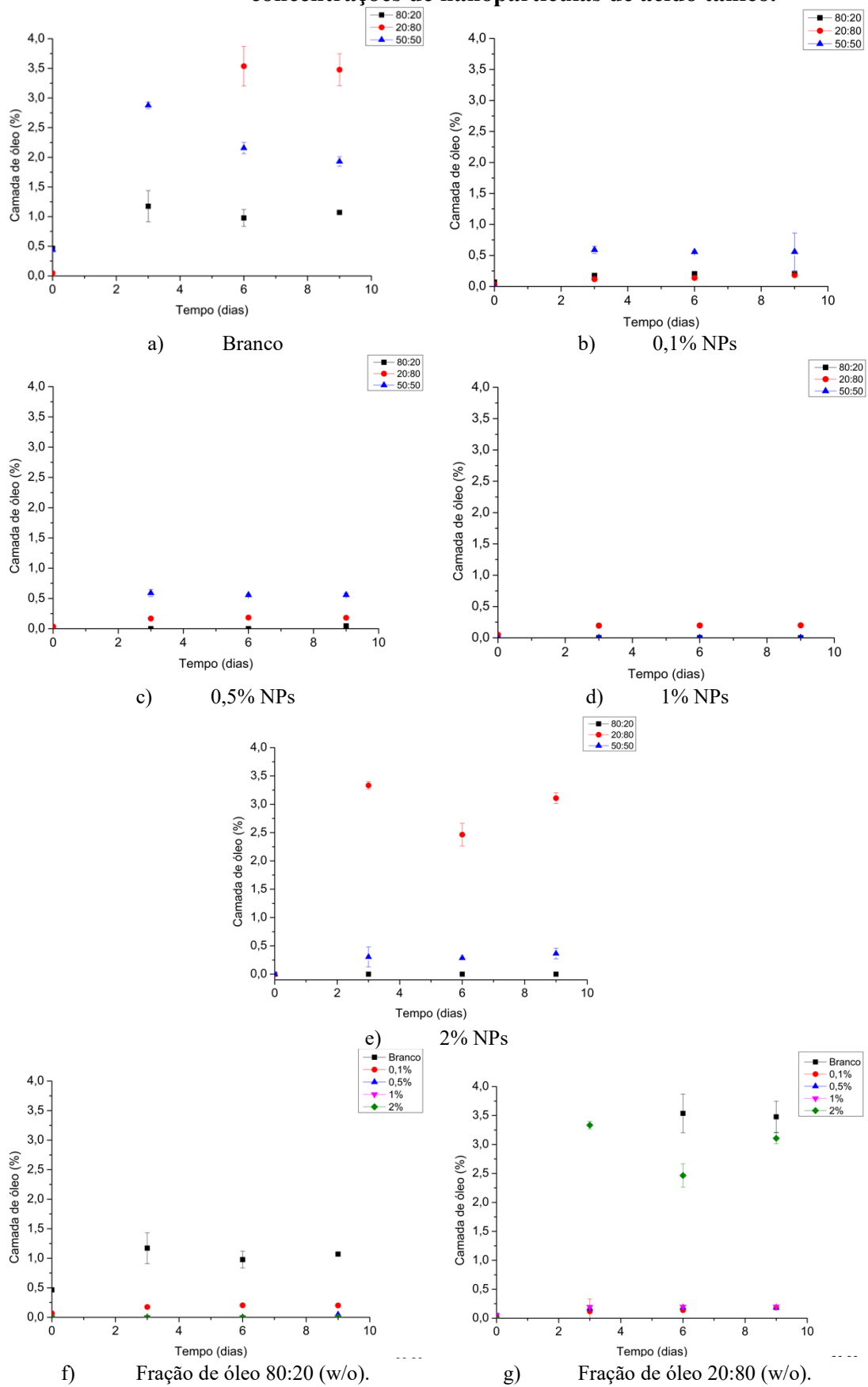
g) Fração de óleo 20:80 (w/o).

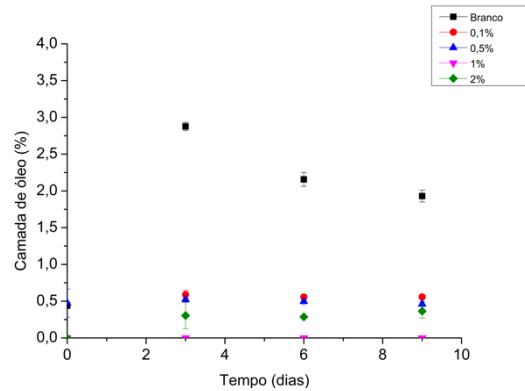


h) Fração de óleo 50:50 (w/o).

Fonte: Autoria própria (2023).

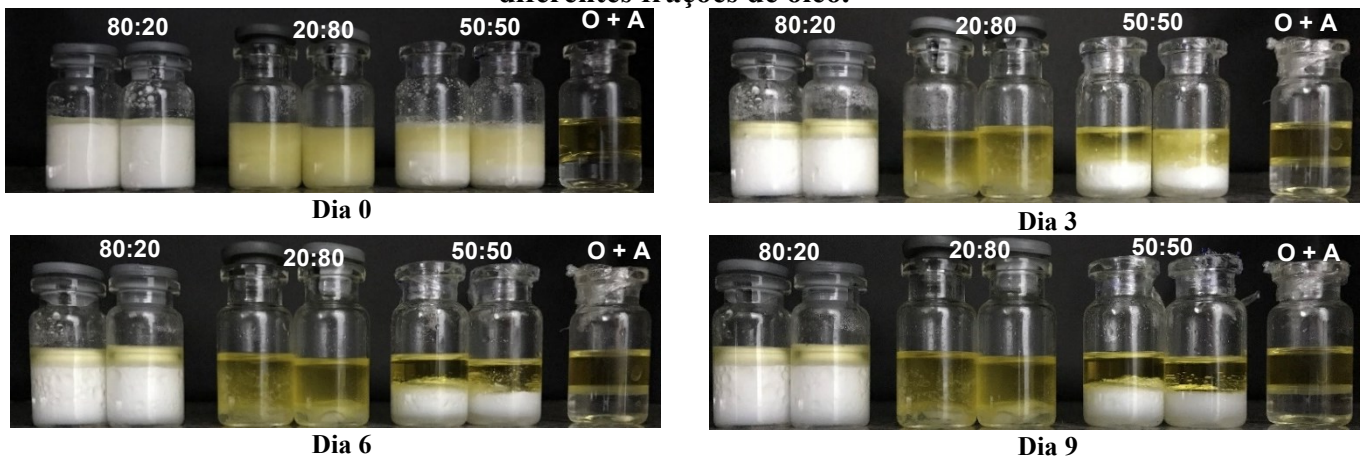
Figura 27 - Estabilidade ao longo do tempo para diferentes frações de óleo e água e concentrações de nanopartículas de ácido tânico.





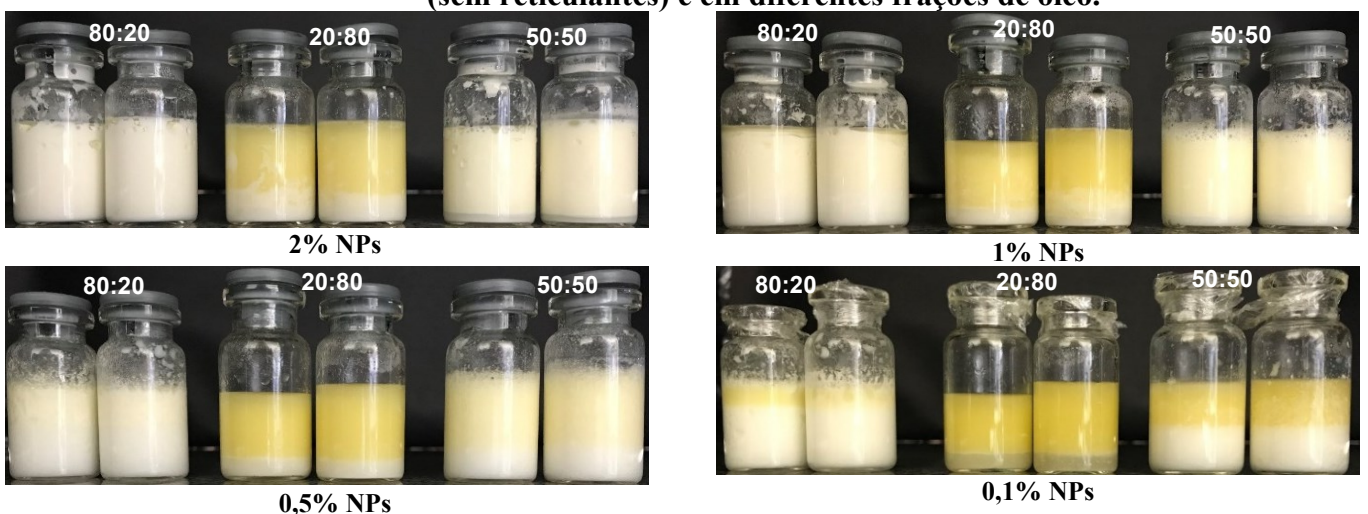
h) Fração de óleo 50:50 (w/o).
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 28 - Imagens das emulsões branco (água e óleo) ao longo do tempo com diferentes frações de óleo.

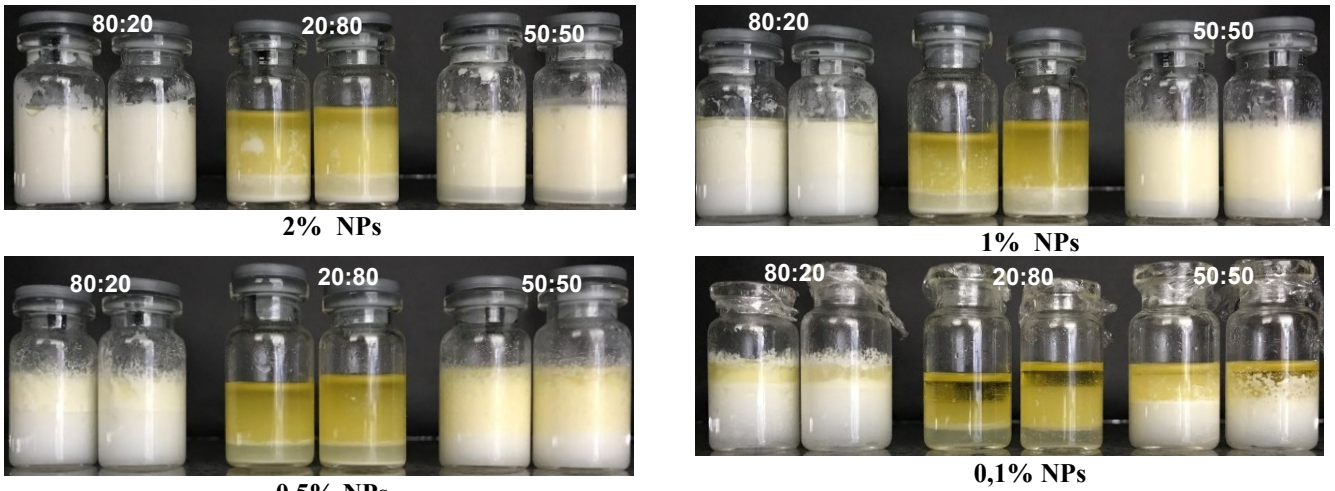


Fonte: Autoria própria (2022).

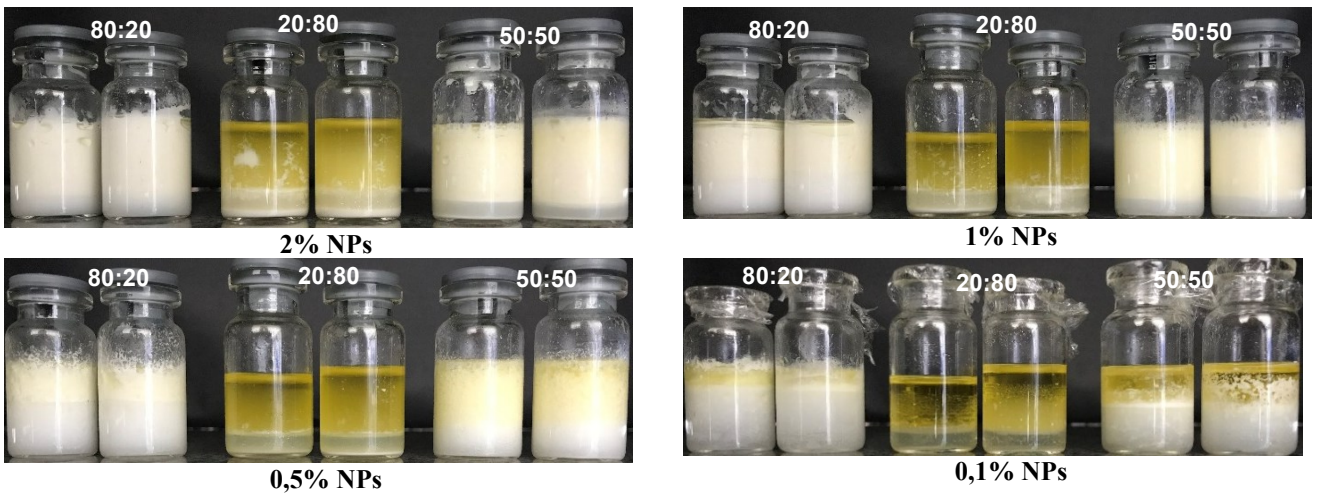
Figura 29 - Imagens das emulsões ao longo do tempo com diferentes concentrações de nanopartículas (NP (sem reticulantes) e em diferentes frações de óleo.



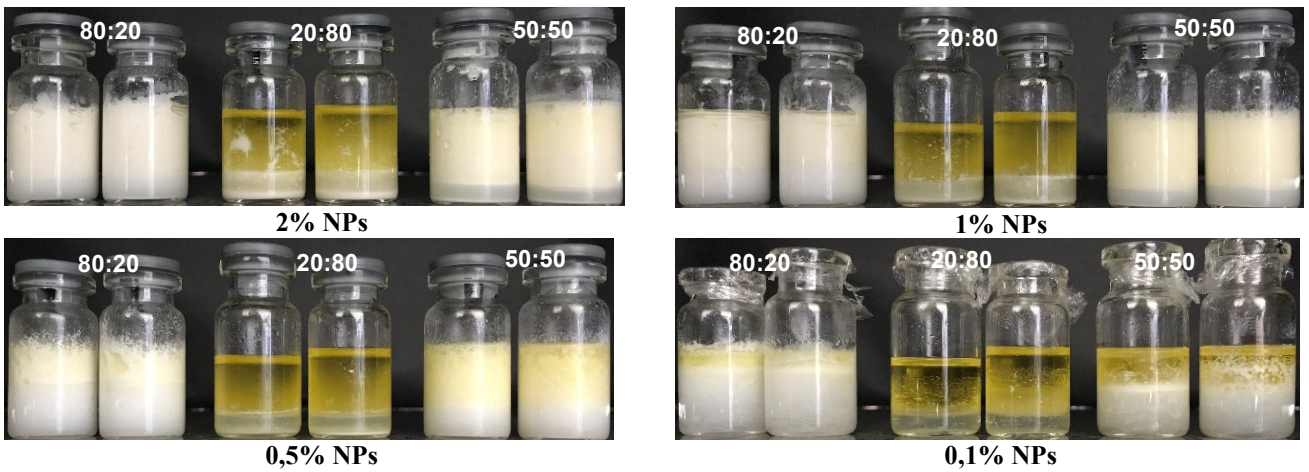
(a) Emulsões no dia 0.



(b) Emulsões no dia 3.



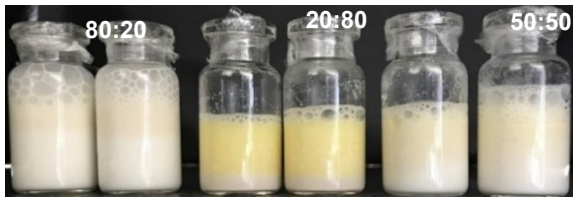
(c) Emulsões no dia 6.



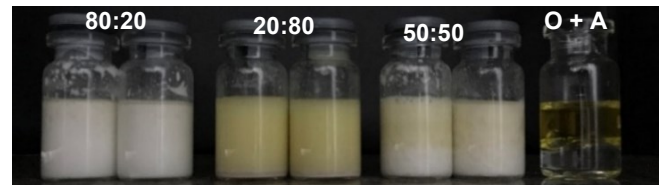
(d) Emulsões no dia 9.

Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 30 - Imagens das emulsões ao longo do tempo com diferentes concentrações de nanopartículas (NPs) de ácido tânico e em diferentes frações de óleo.



2% NPs



1% NPs



0,5% NPs

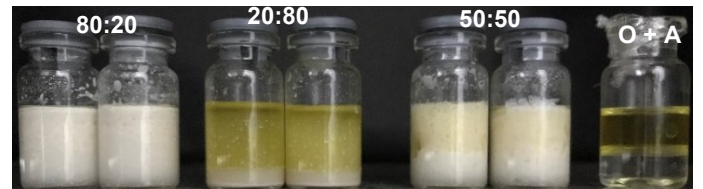


0,1% NPs

(a) Emulsões no dia 0.



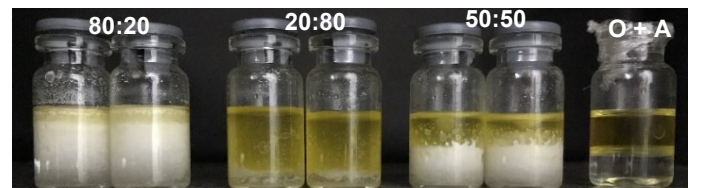
2% NPs



1% NPs



0,5% NPs

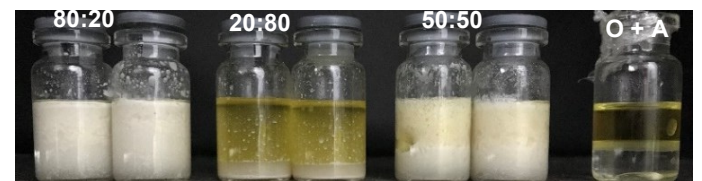


0,1% NPs

(b) Emulsões no dia 3.



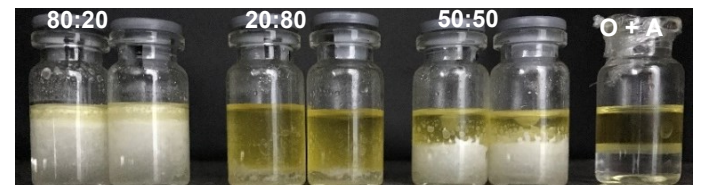
2% NPs



1% NPs

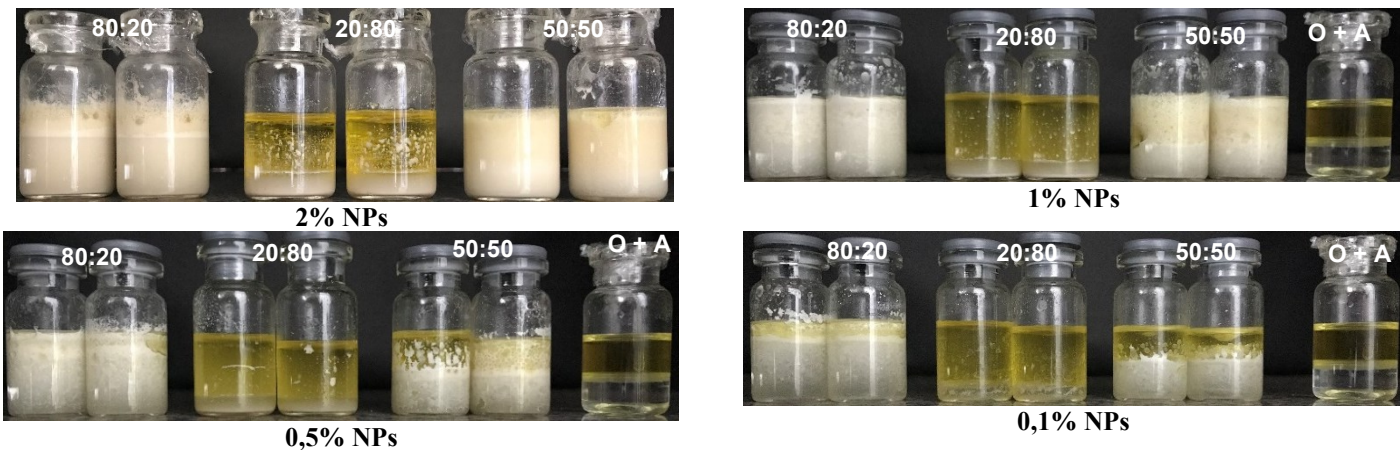


0,5% NPs



0,1% NPs

(c) Emulsões no dia 6.



(d) Emulsões no dia 9.

Fonte: Autoria própria (2023).

As amostras branco (sem adição de nanopartículas, Figura 28) tiveram a separação macroscópica total de fase em todas as frações de óleo. As amostras com 0,1% de nanopartículas reticuladas com ácido tânico (Figura 30) tiveram um comportamento similar as amostras branco, demonstrando que a concentração de nanopartículas não foi suficiente para a estabilização das amostras, provavelmente devido ao fato de que a quantidade de nanopartículas foi insuficiente para garantir o efeito Pickering, ou seja, insuficiente para cobrir toda a gotícula de óleo e formar uma barreira de proteção contra aos mecanismos de desestabilização.

A estabilização de emulsões por meio das proteínas do leite proporciona comumente estabilidade à coalescência ao passar do tempo. Entretanto, há uma maior susceptibilidade dessas emulsões sofrerem distintos tipos de floculação, o que acarreta a separação do soro ou a maior formação de creme (Singh, 2011). Foi possível observar este evento de separação do soro (característica branco leitoso) acentuada na parte inferior do tubo, nas emulsões contendo 0,1% de nanopartículas na proporção 80:20, de maneira que, e no 3º dia foi possível observar a formação e sua intensificação até o 9º dia de armazenamento. Isso indica que todos os agregados e gotículas de proteínas se movimentaram para cima, em contraste com o que foi relatado por Yan *et al.* (2021), onde ocorreu a separação de camada de creme na parte superior e camada de soro na parte inferior de emulsões estabilizadas com 0,1% de zeína/alginate de sódio, que foi atribuído à floculação em ponte das gotas de óleo revestidas com zeína e/ou a agregados desta, devido a capacidade das moléculas de promover floculação.

Também foi possível verificar uma floculação intensa nas amostras contendo 1% de nanopartículas reticuladas com ácido tânico na proporção 50:50 (Figura 30), indicando que ainda ocorreu algum tipo de movimento ascendente das gotículas, o que pode ser devido a diferença de densidade entre as fases, permanecendo a floculação na parte superior do frasco.

As emulsões estabilizadas com nanopartículas sem reticulantes (Figura 29), na concentração de 1% na fração 80:20, apresentaram na parte superior uma pequena camada de óleo livre, bem como a diminuição da turbidez na parte inferior, este último achado também foi visto nas emulsões com 0,5 e 0,1% de nanopartículas nas frações 80:20 e 50:50, sendo que, observou-se uma maior diminuição na turbidez da parte inferior da emulsão nas amostras com 0,1% na fração 80:20 e nas emulsões com 1% na fração 50:50. As emulsões estabilizadas com ácido tânico também tiveram redução acentuada da turbidez na parte inferior, principalmente onde foi utilizado 0,1% de nanopartículas na fração 80:20.

As amostras com 0,5% de nanopartículas reticuladas com ácido tânico (Figura 30) apresentaram uma proteção maior na proporção 80:20 quando comparado as anteriores, porém, ainda não proporcionou a proteção como as amostras com 1% de nanopartículas reticuladas com ácido tânico. Nestas, não houve a separação de fases das emulsões nas proporções de 80:20 e 50:50, o que é possível identificar pelos gráficos e macroscopicamente.

Entre as propriedades da proteína do soro de leite, encontra-se a capacidade de formação de espuma, devido à camada adsorvida na interface ar-água que as proteínas formam. Tal característica foi observada durante as análises, nas emulsões estabilizadas com 2% de nanopartículas reticuladas com ácido tânico, a formação de espuma foi superior em comparação com as outras amostras (Eevans *et al.*, 2010; Levin; Burrington; Hartel, 2016).

Silva *et al.* (2021) estabilizaram emulsões com microgéis de WPI reticulados com ácido tânico, as quais foram estáveis à separação de fases, sem apresentar sedimentação e formação de creme durante 7 dias de armazenamento. Em contrapartida, emulsões estabilizadas com microgéis de WPI sem reticulantes, onde houve uma formação considerável de creme.

Yang *et al.* (2007) relataram que o aumento da concentração de partículas melhorou a estabilidade de emulsões de Pickering, pelo fato de mais partículas estarem disponíveis para serem adsorvidas na interface óleo-água. Wu *et al.* (2015) observaram instabilidade em emulsões de Pickering estabilizadas com 0,2% de nanopartículas de WPI preparadas por reticulação térmica, devido a cobertura incompleta das gotículas, ocasionando a formação de uma camada branca de agregados de gotas de óleo na parte superior. Já na concentração de 1%, a camada de creme observada anteriormente foi reduzida. Porém, foi com a concentração de 2% que emulsões homogêneas e estáveis foram obtidas, demonstrando que esta concentração foi suficiente para proporcionar a cobertura total das gotículas de óleo.

Em contrapartida, deve-se atentar a concentração de proteínas utilizada para a estabilização de emulsões, posto que, o aumento da concentração de proteína, aumenta a concentração da mesma na interface de forma não adsorvida, levando a um aumento na

floculação e separação física da emulsão, bem como, o aumento da taxa de separação do soro no fundo da amostra (Taherian *et al.*, 2011).

Em altas concentrações de proteínas, uma reduzida estabilidade de formação de creme pode ser observada, uma vez que, as proteínas presentes no meio que não foram adsorvidas nas emulsões pode formar agregados e estes causam a floculação de depleção das gotas em emulsões, a floculação por depleção ocorre quando há excesso substancial de proteína no meio aquoso (Dickinson, 2010; Dickinson; Golding; Povey, 1997; Euston; Hirst, 1999). Este comportamento também foi observado por Song *et al.* (2015), que verificaram que o aumento da concentração de partículas de amido para a estabilização de emulsões resultou em um aumento do volume de creme, dado que, a viscosidade da fase aquosa aumentou com o aumento da concentração de partículas.

Segundo a análise macroscópica e para as condições estudadas, foi possível observar que as emulsões com proporção de 80:20 (água:óleo) com 2% e 1% de nanopartículas reticuladas com ácido tânico foram as que apresentaram maior estabilidade macroscópica, não ocorrendo separação de fases durante o armazenamento. Outro ponto é que as nanopartículas estabilizaram de maneira mais eficiente as emulsões óleo em água que as água em óleo, o que pode ser devido a uma interação maior das nanopartículas com a fase aquosa.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o presente estudo foi possível obter partículas em escala nanométrica e com propriedades melhoradas a partir da reticulação. A reticulação por meio do ácido tânico se mostrou mais eficiente que aquela por ácido cítrico, demonstrando que este reticulante pode ser promissor para a reticulação através de ácidos orgânicos. Ainda, foi possível verificar que o pH exerce efeitos sob o tamanho, PDI e potencial zeta das nanopartículas, demonstrando que a faixa de pH para a aplicação deve ser levada em consideração. Além, de ser necessário avaliar a matriz alimentar quanto a presença de sais, visto que, o NaCl causou efeitos na estabilização das mesmas. Na análise termogravimétrica, verificou-se que os ácidos reticulantes contribuíram para uma menor perda de massa final das amostras, com menor perda nas reticuladas com ácido tânico. O FTIR indicou a reticulação das nanopartículas por meio de bandas que sugerem a reação entre os grupos hidroxilas do ácido tânico com os grupos amida da proteína do soro de leite. Outro ponto relevante, é que a caracterização do óleo de chia demonstra que este é uma fonte com teores satisfatórios de ômega 3 e 6. Nas condições avaliadas, as nanopartículas obtidas demonstraram possuir capacidade de estabilização de emulsões nas concentrações de 1% e 2% e com maior estabilização das emulsões do tipo água:óleo na proporção 80:20. Uma vez que, estas emulsões obtiveram estabilidade macroscópica no período de tempo estudado. Logo, os resultados encorajam o uso dessas nanopartículas como agentes emulsificantes.

Para futuros trabalhos, sugere-se acrescentar mais técnicas para a caracterização das nanopartículas, como verificar o ângulo de contato das mesmas. A avaliação do óleo de chia após a obtenção das emulsões. Quanto as emulsões, realizar a microscopia de fluorescência para verificar o efeito Pickering e avaliar as emulsões em diferentes faixas de pH, bem como a influência de sais nestas. Além da aplicação destas emulsões em produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

- ABAE, A.; MADADLOU, A.; SABOURY, A. A. The formation of non-heat-treated whey protein cold-set hydrogels via non-toxic chemical cross-linking. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 43–49, 1 fev. 2017.
- ABDEL-WAHHAB, M. A. *et al.* Synthesis of encapsulated fish oil using whey protein isolate to prevent the oxidative damage and cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats. **Heliyon**, v. 7, n. 11, p. e08456, nov. 2021.
- AHMED, J.; BASU, S. Food rheology: Scientific development and importance to the food industry. Em: **Advances in Food Rheology and Its Applications**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. xxi–xxvi.
- ALAVARSE, A. C. *et al.* Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 202, p. 558–596, 31 mar. 2022.
- AMARAL, L. F. M. DO *et al.* Oil-in-oil Pickering emulsions stabilized by shigaite-like layered double hydroxide particles. **Applied Clay Science**, v. 238, p. 106947, jun. 2023.
- ANDRADE, R. G. *et al.* The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 437, n. 1, p. 1–9, 1 maio 2005.
- ANVARI, M.; CHUNG, D. Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin – Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 516–524, 1 out. 2016.
- AYERZA H, R. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 9, p. 1079–1081, set. 1995.
- AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 109–122, 1 jun. 2016.
- AZEVEDO, V. M. *et al.* Effect of replacement of corn starch by whey protein isolate in biodegradable film blends obtained by extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 971–980, 10 fev. 2017.
- BELL, L. N.; HAGEMAN, M. J. Glass Transition Explanation for the Effect of Polyhydroxy Compounds on Protein Denaturation in Dehydrated Solids. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 2, p. 372–375, mar. 1996.
- BINKS, B. P.; HOROZOV, T. S. Colloidal particles at liquid interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 48, p. 6298–6299, 21 nov. 2007.

BIST, Y.; KUMAR, Y.; SAXENA, D. C. Enhancing the storage stability of Pickering emulsion using esterified buckwheat starch with improved structure and morphology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 161, p. 113329, 1 maio 2022.

BJERMO, H. *et al.* Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 1003–1012, maio 2012.

BOUYER, E. *et al.* Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 359–378, 15 out. 2012.

BRASIL. **PORTARIA Nº 540, DE 27 DE OUTUBRO DE 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.** Brasil, 27 out. 1997. Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1997/prt0540_27_10_1997.html>

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 28, DE 26 DE JULHO DE 2018. Diário Oficial da União.** Brasil, 27 jul. 2018. Disponível em:

<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_COMP.pdf/db9c7460-ae66-4f78-8576-dfd019bc9fa1>. Acesso em: 16 fev. 2023

BRASIL; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira.** Brasília, 5 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/VOLUME1FB6at2Erratappdfcomcapa.pdf>>. Acesso em: 4 set. 2023

BURIN, L. *et al.* Color Formation in Dehydrated Modified Whey Powder Systems As Affected by Compression and T_g . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5263–5268, 1 nov. 2000.

CAMPAROTTO, N. G. *et al.* Hydrophobization of aerogels based on chitosan, nanocellulose and tannic acid: Improvements on the aerogel features and the adsorption of contaminants in water. **Environmental Research**, v. 220, p. 115197, 1 mar. 2023.

CARMO, E. L. DO *et al.* Stability of spray-dried beetroot extract using oligosaccharides and whey proteins. **Food Chemistry**, v. 249, p. 51–59, 30 maio 2018.

CARMO, E. L. DO; FERNANDES, R. V. DE B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 1, n. 2, p. 30–44, 18 nov. 2015.

CARPENTER, J.; GEORGE, S.; SAHARAN, V. K. A comparative study of batch and recirculating flow ultrasonication system for preparation of multilayer olive oil in water emulsion stabilized with whey protein isolate and sodium alginate. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 125, p. 139–149, 1 mar. 2018.

- CASANOVA, F. *et al.* Stability of casein micelles cross-linked with genipin: A physicochemical study as a function of pH. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 70–74, maio 2017.
- CASSOL, L.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation and accelerated stability testing of bioactive compounds of Hibiscus sabdariffa. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1599–1610, 26 abr. 2021.
- CASTRO, M. A. P.; RODRÍGUEZ, H. G. Study by infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis of Tannins and Tannic acid. **Rev. latinoam. quím**, v. 39, n. 3, p. 107–112, fev. 2012.
- CAVALLI, J. *et al.* Chia oil prevents chemical and immune-mediated inflammatory responses in mice: Evidence for the underlying mechanisms. **Food Research International**, v. 149, p. 110703, nov. 2021.
- CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 272–283, maio 2006.
- CHEN, N. *et al.* Influence of structure complexity of phenolic compounds on their binding with maize starch. **Food Structure**, v. 33, p. 100286, jul. 2022a.
- CHEN, P. *et al.* Regulate the interfacial characteristic of emulsions by casein/butyrylated dextrin nanoparticles and chitosan based on ultrasound-assisted homogenization: Fabrication and characterization. **Food Hydrocolloids**, p. 107983, 19 jul. 2022b.
- CHENG, Y. *et al.* Rheology of edible food inks from 2D/3D/4D printing, and its role in future 5D/6D printing. **Food Hydrocolloids**, v. 132, p. 107855, nov. 2022.
- CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M.-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 23–34, 20 dez. 2013.
- COPADO, C. N.; IXTAINA, V. Y.; TOMÁS, M. C. Chia Oil Microcapsules Obtained by Different Drying Methods. **Biology and Life Sciences Forum**, v. 8, n. 1, p. 2–5, 25 jan. 2022.
- CZUMAJ, A.; ŚLEDZIŃSKI, T. Biological Role of Unsaturated Fatty Acid Desaturases in Health and Disease. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 356, 29 jan. 2020.
- DI MARCO, A. E.; IXTAINA, V. Y.; TOMÁS, M. C. Inclusion complexes of high amylose corn starch with essential fatty acids from chia seed oil as potential delivery systems in food. **Food Hydrocolloids**, v. 108, p. 106030, nov. 2020.
- DICKINSON, E. Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 130–140, nov. 2010.
- DICKINSON, E.; GOLDING, M.; POVEY, M. J. W. Creaming and Flocculation of Oil-in-Water Emulsions Containing Sodium Caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 185, n. 2, p. 515–529, jan. 1997.

ESCAMILLA-GARCÍA, M. *et al.* Effect of Transglutaminase Cross-Linking in Protein Isolates from a Mixture of Two Quinoa Varieties with Chitosan on the Physicochemical Properties of Edible Films. **Coatings**, v. 9, n. 11, p. 736, 6 nov. 2019.

EUSTON, S. R.; HIRST, R. L. Comparison of the concentration-dependent emulsifying properties of protein products containing aggregated and non-aggregated milk protein. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 693–701, out. 1999.

EVANS, J. *et al.* Comparison of composition and sensory properties of 80% whey protein and milk serum protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 5, p. 1824–1843, maio 2010.

FARJAMI, T.; MADADLOU, A.; LABBAFI, M. Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 159–165, 1 ago. 2015.

FENG, Y.; LEE, Y. Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 292–302, maio 2016.

FINGAS, M.; FIELDHOUSE, B.; WANG, Z. The Long Term Weathering of Water-in-Oil Emulsions. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 137–143, abr. 2003.

FIRTIN, B. *et al.* Encapsulation of chia seed oil with curcumin and investigation of release behaviour & antioxidant properties of microcapsules during in vitro digestion studies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 134, p. 109947, dez. 2020.

FISCHER, P.; WINDHAB, E. J. Rheology of food materials. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 1, p. 36–40, fev. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21**. Disponível em: <<https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-E/part-582/subpart-B?toc=1>>. Acesso em: 23 abr. 2023.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê Proteínas. **Revista FIB**, n. 28, p. 30–58, 2014.

FRANKLIN, D. S.; GUHANATHAN, S. Synthesis and characterization of citric acid-based pH-sensitive biopolymeric hydrogels. **Polymer Bulletin**, v. 71, n. 1, p. 93–110, 4 jan. 2014.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. A Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. **Polímeros**, v. 25, p. 1–9, 2015.

GALVÃO, A. C. *et al.* Experimental study and modeling of citric acid solubility in alcohol mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 237, p. 96–102, 1 nov. 2018.

GE, S. *et al.* Pickering emulsion stabilized by zein/Adzuki bean seed coat polyphenol nanoparticles to enhance the stability and bioaccessibility of astaxanthin. **Journal of Functional Foods**, v. 88, p. 104867, 1 jan. 2022.

GENG, S. *et al.* Fabrication and characterization of novel edible Pickering emulsion gels stabilized by dihydromyricetin. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128486, maio 2021.

GHAFOOR, K. *et al.* Effects of roasting on bioactive compounds, fatty acid, and mineral composition of chia seed and oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 10, p. jfpp.13710, 30 out. 2018.

GHAFOOR, K. *et al.* An evaluation of bioactive compounds, fatty acid composition and oil quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seed roasted at different temperatures. **Food Chemistry**, v. 333, p. 127531, dez. 2020.

GILLINGHAM, L. G.; HARRIS-JANZ, S.; JONES, P. J. H. Dietary Monounsaturated Fatty Acids Are Protective Against Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease Risk Factors. **Lipids**, v. 46, n. 3, p. 209–228, 10 mar. 2011.

GONZALEZ, S. L. *et al.* Continuous Catalyst-Free Production of Biodiesel through Transesterification of Soybean Fried Oil in Supercritical Methanol and Ethanol. **Energy & Fuels**, v. 27, n. 9, p. 5253–5259, 19 set. 2013.

GRAND VIEW RESEARCH. **Whey Protein Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (WPI, WPC, WPH), By Application (Sports Nutrition, Dietary Supplements, Beverages), By Region, And Segment Forecasts, 2022 - 2030. Grand View Research**, out. 2022. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/whey-protein-market>>. Acesso em: 23 mar. 2023

GUIMARÃES-INÁCIO, A. *et al.* Evaluation of the oxidative stability of chia oil-loaded microparticles by thermal, spectroscopic and chemometric methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 498–506, jan. 2018.

GUO, N. *et al.* Effect of ultrasound treatment on interactions of whey protein isolate with rutin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 95, p. 106387, maio 2023.

GUO, Q. *et al.* Formulation and characterization of microcapsules encapsulating carvacrol using complex coacervation crosslinked with tannic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 165, p. 113683, 1 ago. 2022.

GUTIÉRREZ, S.; SVAHN, S. L.; JOHANSSON, M. E. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5028, 11 out. 2019.

HA, H.-K. *et al.* Development and Characterization of Whey Protein-Based Nano-Delivery Systems: A Review. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3254, 6 set. 2019.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. DE; PAULA, H. DE. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479–488, ago. 2006.

HASHEMI, B.; MADADLOU, A.; SALAMI, M. Functional and in vitro gastric digestibility of the whey protein hydrogel loaded with nanostructured lipid carriers and gelled via citric acid-mediated crosslinking. **Food Chemistry**, v. 237, p. 23–29, 15 dez. 2017.

HENAO OSSA, J. S.; WAGNER, J. R.; PALAZOLO, G. G. Influence of chemical composition and structural properties on the surface behavior and foam properties of tofu-

wey concentrates in acid medium. **Food Research International**, v. 128, p. 108772, 1 fev. 2020.

HONG, S. *et al.* Nanoencapsulation of apigenin with whey protein isolate: Physicochemical properties, in vitro activity against colorectal cancer cells, and bioavailability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 154, p. 112751, jan. 2022.

HU, S. *et al.* Development of tannic acid cross-linked hollow zein nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 821–831, 1 dez. 2016a.

HU, X. *et al.* Microwave-assisted synthesis of nutgall tannic acid-based salean polysaccharide hydrogel for tunable release of β -lactoglobulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1431–1439, 15 out. 2020.

HU, Y.-Q. *et al.* Fabrication and characterization of novel Pickering emulsions and Pickering high internal emulsions stabilized by gliadin colloidal particles. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 300–310, 1 dez. 2016b.

IGARTÚA, D. E.; CABEZAS, D. M.; PALAZOLO, G. G. Effects of pH, protein:polysaccharide ratio, and NaCl-added concentration on whey protein isolate and soluble soybean polysaccharides electrostatic-complexes formation. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100123, out. 2022.

JAFARI, S. M. *et al.* Phytoparticles for the stabilization of Pickering emulsions in the formulation of novel food colloidal dispersions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 98, p. 117–128, abr. 2020.

JI, W.; YANG, F.; YANG, M. Effect of change in pH, heat and ultrasound pre-treatments on binding interactions between quercetin and whey protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132508, ago. 2022.

JIA, C. *et al.* Tannic acid-assisted cross-linked nanoparticles as a delivery system of eugenol: The characterization, thermal degradation and antioxidant properties. **Food Hydrocolloids**, v. 104, p. 105717, 1 jul. 2020.

JOHNSON, G. H.; FRITSCHKE, K. Effect of Dietary Linoleic Acid on Markers of Inflammation in Healthy Persons: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 7, p. 1029- 1041.e15, jul. 2012.

JULIO, L. M. *et al.* Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of ω -3 fatty acids. **Journal of Food Engineering**, v. 162, p. 48–55, out. 2015.

KAGANYUK, M.; MOHRAZ, A. Role of particles in the rheology of solid-stabilized high internal phase emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 540, p. 197–206, mar. 2019.

KASPRZAK, M. M. *et al.* Effects of fibre addition and processing on the stability, rheology and in vitro gastric digestion of whey protein-xanthan gum stabilised emulsions with high oil phase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 178, p. 114465, mar. 2023.

KERAMAT, M.; KHEYNOOR, N.; GOLMAKANI, M.-T. Oxidative stability of Pickering emulsions. **Food Chemistry**, v. 14, p. 100279, 30 jun. 2022.

KHEM, S. *et al.* Comparative influence of pH and heat on whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* A17 during spray drying. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 162–169, mar. 2016.

KIBBELAAR, H. V. M. *et al.* Ethyl cellulose nanoparticles as stabilizers for Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 641, p. 128512, maio 2022.

KIM, W.; WANG, Y.; SELOMULYA, C. Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 105, p. 261–272, 1 nov. 2020.

KUMAR DAN, A. *et al.* Sericin nanoparticles: Future nanocarrier for target-specific delivery of chemotherapeutic drugs. **Journal of Molecular Liquids**, v. 368, p. 120717, dez. 2022.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 975–984, 15 nov. 2013.

LEVIN, M. A.; BURRINGTON, K. J.; HARTEL, R. W. Composition and functionality of whey protein phospholipid concentrate and delactosed permeate. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 6937–6947, 1 set. 2016.

LI, J. *et al.* Fabrication and characterization of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate/phloridzin/sodium alginate ternary complex. **Food Hydrocolloids**, v. 129, p. 107625, 1 ago. 2022a.

LI, K.-Y. *et al.* Preparation of powdered oil by spray drying the Pickering emulsion stabilized by ovalbumin – Gum Arabic polyelectrolyte complex. **Food Chemistry**, v. 391, p. 133223, 15 out. 2022b.

LI, M. *et al.* Effects of the molecular weight of hyaluronan on the conformation and release kinetics of self-assembled 5-fluorouracil-loaded lysozyme-hyaluronan colloidal nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 223, p. 87–99, dez. 2022c.

LI, S. *et al.* Development of Zein/tannic acid nanoparticles as antioxidants for oxidation inhibition of blackberry seed oil emulsions. **Food Chemistry**, v. 403, p. 134236, 1 mar. 2023a.

LI, X. *et al.* Fabrication and characterization of self-assembled whey protein isolate/short linear glucan core–shell nanoparticles for sustained release of curcumin. **Food Chemistry**, v. 407, p. 135124, maio 2023b.

LI, X. *et al.* Construction of whey protein gels prepared by three methods to stabilize high internal phase Pickering emulsions loaded with CoQ10 under different pH. **Food Chemistry**, v. 421, p. 136192, set. 2023c.

LI, Z. *et al.* Practical Modification of Tannic Acid Polyether Demulsifier and Its Highly Efficient Demulsification for Water-in-Aging Crude Oil Emulsions. **ACS Omega**, v. 4, n. 24, p. 20697–20707, 10 dez. 2019.

LIANG, H.-N.; TANG, C. Pea protein exhibits a novel Pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 463–469, out. 2014.

LIANG, X. *et al.* Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion gels: Effects of double cross-linking with transglutaminase and calcium ions. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 105569, 1 maio 2020.

LIANG, X. *et al.* Tannic acid-fortified zein-pectin nanoparticles: Stability, properties, antioxidant activity, and in vitro digestion. **Food Research International**, v. 145, p. 110425, 1 jul. 2021.

LIU, F.; OU, S.-Y.; TANG, C.-H. Ca²⁺-induced soy protein nanoparticles as pickering stabilizers: Fabrication and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 175–186, abr. 2017.

LIU, J. J. *et al.* Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: Implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. **Brain Research**, v. 1597, p. 220–246, fev. 2015.

LIU, M. *et al.* Nanoencapsulation of lutein within lipid-based delivery systems: Characterization and comparison of zein peptide stabilized nano-emulsion, solid lipid nanoparticle, and nano-structured lipid carrier. **Food Chemistry**, v. 358, p. 129840, out. 2021.

LIU, Q. *et al.* Fabrication of low environment-sensitive nanoparticles for cinnamaldehyde encapsulation by heat-induced gelation method. **Food Hydrocolloids**, v. 105, p. 105789, ago. 2020.

LIU, Q. *et al.* Development of whey protein nanoparticles as carriers to deliver soy isoflavones. **LWT - Food Science and Technology**, v. 155, p. 112953, fev. 2022.

LIU, X. *et al.* Whole cereal protein-based Pickering emulsions prepared by zein-gliadin complex particles. **Journal of Cereal Science**, v. 87, p. 46–51, maio 2019.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 73–83, 1 abr. 2010.

LU, Z. *et al.* Micronized apple pomace as a novel emulsifier for food O/W Pickering emulsion. **Food Chemistry**, v. 330, p. 127325, nov. 2020.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1197–1211, 1 dez. 2007.

- MAIA FILHO, D. C. *et al.* Aging of water-in-crude oil emulsions: Effect on rheological parameters. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 405, p. 73–78, jul. 2012.
- MARINELI, R. DA S. *et al.* Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1304–1310, dez. 2014.
- MARINELI, R. DA S. *et al.* Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. **Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 740–748, maio 2015.
- MARTÍNEZ, M. L. *et al.* Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 78–82, 1 jun. 2012.
- MATSUMIYA, K.; MURRAY, B. S. Soybean protein isolate gel particles as foaming and emulsifying agents. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 206–215, out. 2016.
- MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. **Advanced Dairy Chemistry**. 4. ed. New York: Springer Science & Business Media, 2013. v. 1
- MENEZES, M. DO L. L. R. *et al.* Effect of tannic acid as crosslinking agent on fish skin gelatin-silver nanocomposite film. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 7–15, mar. 2019.
- MILLER, F. A. Spectra of X-H Systems (with Emphasis on O-H and N-H Groups). Em: **Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 163–178.
- MOGHADDAM, N. *et al.* Application of whey protein-alginate particles coated by black seed oil as a biocompatible carrier of quercetin at treating non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Functional Foods**, v. 86, p. 104728, nov. 2021.
- MOHD ALI, N. *et al.* The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–9, 2012.
- MUÑOZ, L. A. *et al.* Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. **Food Reviews International**, v. 29, n. 4, p. 394–408, 2 out. 2013.
- MUÑOZ-TÉBAR, N. *et al.* Enrichment of sheep cheese with chia (*Salvia hispanica* L.) oil as a source of omega-3. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 407–415, 1 jul. 2019.
- NAM, S. *et al.* A reinforced thermal barrier coat of a Na–tannic acid complex from the view of thermal kinetics. **RSC Advances**, v. 9, n. 19, p. 10914–10926, 2019.
- NASCIMENTO, L. G. L. *et al.* High-intensity ultrasound treatment on casein: Pea mixed systems: Effect on gelling properties. **Food Chemistry**, v. 422, p. 136178, out. 2023.

- NAYAK, A. *et al.* Impact of process and physico-chemical conditions on the formation of curcumin-whey protein composite particles capable to stabilize food-compatible oil in water emulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, p. 112421, jan. 2022.
- NESTERENKO, A. *et al.* Influence of a mixed particle/surfactant emulsifier system on water-in-oil emulsion stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 457, p. 49–57, set. 2014.
- NEVES, M. T. *et al.* Uso da tecnologia de lipossomas no encapsulamento de compostos bioativos - Revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 7, n. 4, 18 out. 2021.
- NIIZAWA, I.; SIHUFÉ, G. A.; ZORRILLA, S. E. Design of whey protein aggregates towards microgel-stabilized emulsion generation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 152, p. 112324, 1 dez. 2021.
- NOELLO, C. *et al.* Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition. **Food Research International**, v. 89, p. 549–557, 1 nov. 2016.
- NURUL FITRI MARZAMAN, A. *et al.* Development of chloramphenicol whey protein-based microparticles incorporated into thermoresponsive in situ hydrogels for improved wound healing treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 628, p. 122323, nov. 2022.
- OCHANDA, F. O.; BARNETT, M. R. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles and Titanium Oxide Nanofibers: Toward Multifibrous Nanocomposites. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 93, n. 9, p. 2637–2643, 24 mar. 2010.
- OLIVEIRA-ALVES, S. C. *et al.* Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. **Food Chemistry**, v. 232, p. 295–305, 1 out. 2017.
- PAPALAMPROU, E. M.; DOXASTAKIS, G. I.; KIOSSEOGLOU, V. Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 304–313, 30 jan. 2010.
- PELLEGRINI, M. *et al.* Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 47–53, 29 mar. 2018.
- PETKER, K.; ROGERS, M. A.; JOYE, I. J. Chemical hardening of gliadin nanoparticles alters their oil-water interfacial behaviour. **Food Structure**, v. 30, p. 100218, out. 2021.
- PIRES, C. **Emulsões água-em-água estabilizadas com nanocristais de celulose.** Dissertação—Curitiba: Universidade Federal do Paraná, fev. 2020.
- POLI, A.; AGOSTONI, C.; VISIOLI, F. Dietary Fatty Acids and Inflammation: Focus on the n-6 Series. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4567, 26 fev. 2023.

PU, X. *et al.* Development and characterization of acid-induced whey protein concentrate and egg white protein composite gel. **LWT - Food Science and Technology**, v. 164, p. 113624, 15 jul. 2022.

QIN, X. *et al.* Preparation of camellia oil pickering emulsion stabilized by glycated whey protein isolate and chitoooligosaccharide: Effect on interfacial behavior and emulsion stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, p. 112515, jan. 2022.

RAMALHO, F. C.; LELIS, G. H. de S. DE H. S. de. **Alterações químicas e físicas em leite evaporado estocado em diferentes temperaturas**. Ouro Preto, 2021.

RASHED, M. M. A. *et al.* Techno-functional properties and sustainable application of nanoparticles-based *Lavandula angustifolia* essential oil fabricated using unsaturated lipid-carrier and biodegradable wall material. **Industrial Crops and Products**, v. 136, p. 66–76, set. 2019.

RAVERA, F. *et al.* Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102344, 1 fev. 2021.

REENA, R. *et al.* Insight into citric acid: A versatile organic acid. **Fuel**, v. 327, p. 125181, 1 nov. 2022.

REIS, D. R.; AMBROSI, A.; LUCCIO, M. DI. Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. **Future Foods**, v. 5, p. 100126, 1 jun. 2022.

RIZZO, G.; BARONI, L.; LOMBARDO, M. Promising Sources of Plant-Derived Polyunsaturated Fatty Acids: A Narrative Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 3, p. 1683, 17 jan. 2023.

ROBLES, H. Tannic Acid. Em: **Encyclopedia of Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 474–475.

ROJAS, V. M. *et al.* Formulation of mayonnaises containing PUFAs by the addition of microencapsulated chia seeds, pumpkin seeds and baru oils. **Food Chemistry**, v. 274, p. 220–227, fev. 2019.

ROSS-MURPHY, S. B. RHEOLOGICAL CHARACTERISATION OF GELS. **Journal of Texture Studies**, v. 26, n. 4, p. 391–400, nov. 1995.

SAINZ-URRUELA, C. *et al.* Fluorescence study of the influence of centrifugation on graphene oxide dispersions in water and in tannic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 278, p. 121302, 5 out. 2022.

SCOPEL, E. ; C. P. P. ; D. C. J. ; DA S. V. C. Extração de Ácido Cítrico do Limão e sua Utilização para a Remoção da Dureza da Água: Um Método Alternativo para Aulas de Química. **Rev. Virtual Quim**, v. 9, n. 3, p. 912–923, 5 jun. 2017.

SHAKOURY, N. *et al.* Encapsulation of propolis extract in whey protein nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 158, p. 113138, mar. 2022.

- SIEBEN, P. G.; WYPYCH, F.; DE FREITAS, R. A. Oleic acid as a synergistic agent in the formation of kaolinite-mineral oil Pickering emulsions. **Applied Clay Science**, v. 216, p. 106378, 1 jan. 2022.
- SILVA, J. T. DO P. *et al.* Whey Protein Isolate Microgel Properties Tuned by Crosslinking with Organic Acids to Achieve Stabilization of Pickering Emulsions. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 4 jun. 2021.
- SINGH, H. Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1938–1944, dez. 2011.
- SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695–704, 1 jul. 2008.
- SONG, X. *et al.* Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 256–263, mar. 2015.
- STACHOWICZ, K. The role of polyunsaturated fatty acids in neuronal signaling in depression and cognitive processes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 737, p. 109555, mar. 2023.
- SU, D. *et al.* Soy protein/ β -glucan/tannic acid complex coacervates with different microstructures play key roles in the rheological properties, tribological properties, and the storage stability of Pickering high internal phase emulsions. **Food Chemistry**, v. 401, p. 134168, fev. 2023.
- SUN, Z. *et al.* Pickering emulsions stabilized by colloidal surfactants: Role of solid particles. **Particuology**, v. 64, p. 153–163, maio 2022.
- SURIYAKALAA, U. *et al.* Hepatocurative activity of biosynthesized silver nanoparticles fabricated using *Andrographis paniculata*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 189–194, fev. 2013.
- SYNGENE RESEARCH LLP. **Global Food Emulsifiers Market Analysis 2022**. Disponível em: <<https://www.marketresearch.com/Syngene-Research-LLP-v4190/Global-Food-Emulsifiers-31907870/>>. Acesso em: 23 abr. 2023.
- TAHERIAN, A. R. *et al.* Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 868–878, 1 jul. 2011.
- TAI, Z. *et al.* Utility of Pickering emulsions in improved oral drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 11, p. 2038–2045, nov. 2020.
- TALELE, P. *et al.* Hydroquinone loaded solid lipid nanoparticles comprised of stearic acid and ionic emulsifiers: Physicochemical characterization and in vitro release study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 368, p. 120590, dez. 2022.
- TAN, Y. *et al.* Fabrication of starch-based nanospheres to stabilize pickering emulsion. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1358–1363, maio 2012.

- TATAR TURAN, F.; CENGIZ, A.; KAHYA OGLU, T. Evaluation of ultrasonic nozzle with spray-drying as a novel method for the microencapsulation of blueberry's bioactive compounds. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 32, p. 136–145, 1 dez. 2015.
- TAVARES TOSCANO, L. *et al.* Chia induces clinically discrete weight loss and improves lipid profile only in altered previous values. **Nutr Hosp**, v. 31, n. 3, p. 1176–1182, 2015.
- TAYLOR, D. L. *et al.* Characterization of Gellan Gum by Capillary Electrophoresis. **Australian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1156, 2012.
- TIMILSENA, Y. P. *et al.* Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 554–563, 1 jan. 2016.
- TORRES, L. G. *et al.* Preparation of o/w emulsions stabilized by solid particles and their characterization by oscillatory rheology. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 302, n. 1–3, p. 439–448, jul. 2007.
- ULLAH, R. *et al.* Tannic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in adult mice by targeting multiple pathological features. **International Immunopharmacology**, v. 110, p. 108970, 1 set. 2022.
- URANGA, J. *et al.* Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 86, p. 95–103, 1 jan. 2019.
- VAN DEN BERG, L. *et al.* Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 5–6, p. 961–976, 1 jul. 2007.
- VANCIN, F. R. *et al.* Effects of different concentrations of sodium azide and chloramphenicol on the preservation of raw milk samples. **Ciência Rural**, v. 50, n. 2, 2020.
- VANDENBERGHE, L. P. S. *et al.* Production and Application of Citric Acid. Em: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 557–575.
- VON STASZEWSKI, M. *et al.* Nanocomplex formation between β -lactoglobulin or caseinomacropéptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 800–809, out. 2012.
- WANG, J.-S. *et al.* Physical and oxidative stability of functional avocado oil high internal phase emulsions collaborative formulated using citrus nanofibers and tannic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 248–257, 1 set. 2018.
- WANG, L. *et al.* The rheological/interfacial behavior and stability properties of nanoemulsions prepared using whey protein-carboxymethyl chitosan conjugates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 662, p. 130924, abr. 2023a.
- WANG, Y. *et al.* Effects of citric acid crosslinking on the structure and properties of ovotransferrin and chitosan composite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 229, p. 268–281, 28 fev. 2023b.

WEI, Y. *et al.* A novel Pickering emulsion system as the carrier of tocopheryl acetate for its application in cosmetics. **Materials Science and Engineering: C**, v. 109, p. 110503, abr. 2020.

WIJAYANTI, H. B.; BANSAL, N.; DEETH, H. C. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1235–1251, nov. 2014.

WILLIAM, N. *et al.* Tuning stable noble metal nanoparticles dispersions to moderate their interaction with model membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 594, p. 101–112, jul. 2021.

WINKLER, H.; VORWERG, W.; SCHMID, M. Synthesis of hydrophobic whey protein isolate by acylation with fatty acids. **European Polymer Journal**, v. 62, p. 10–18, 1 jan. 2015.

WOUTERS, A. G. B. *et al.* Heat treatment as a food-grade strategy to increase the stability of whey protein particles under food system relevant conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107254, mar. 2022.

WU, J. *et al.* Pickering emulsions stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 127, p. 96–104, mar. 2015.

WU, J. *et al.* Thermal behavior of collagen crosslinked with tannic acid under microwave heating. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 135, p. 2329–2335, 2018.

WU, X. *et al.* Ethyl cellulose nanodispersions as stabilizers for oil in water Pickering emulsions. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12079, 21 set. 2017.

XIAO, F.; GUO, F. Impacts of essential amino acids on energy balance. **Molecular Metabolism**, v. 57, p. 101393, 1 mar. 2022.

XU, H. *et al.* Controlled delivery of hollow corn protein nanoparticles via non-toxic crosslinking: in vivo and drug loading study. **Biomedical Microdevices**, v. 17, n. 1, p. 8, 28 fev. 2015.

XU, W. *et al.* Stabilization and microstructural network of pickering emulsion using different xanthan gum/lysozyme nanoparticle concentrations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 160, p. 113298, abr. 2022.

YAN, J. *et al.* Design and characterization of double-cross-linked emulsion gels using mixed biopolymers: Zein and sodium alginate. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106473, abr. 2021.

YANG, F. *et al.* Effect of dispersion pH on the formation and stability of Pickering emulsions stabilized by layered double hydroxides particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 306, n. 2, p. 285–295, fev. 2007.

YANG, F. *et al.* Tannic acid enhanced the physical and oxidative stability of chitin particles stabilized oil in water emulsion. **Food Chemistry**, v. 346, p. 128762, jun. 2021.

YI, X. *et al.* High internal phase Pickering emulsions prepared by globular protein-tannic acid complexes: A hydrogen bond-based interfacial crosslinking strategy. **Journal of Molecular Liquids**, v. 370, p. 121025, jan. 2023.

YUAN, Y. *et al.* The covalent crosslinking of dialdehyde glucomannan and the inclusion of tannic acid synergistically improved physicochemical and functional properties of gelatin films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 30, p. 100747, 1 dez. 2021.

YUE, M. *et al.* Effect of ultrasound assisted emulsification in the production of Pickering emulsion formulated with chitosan self-assembled particles: Stability, macro, and micro rheological properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 154, p. 112595, jan. 2022.

ZANQUI, A. B. *et al.* Subcritical Extraction of *Salvia hispanica* L. Oil with *N*-Propane: Composition, Purity and Oxidation Stability as Compared to the Oils Obtained by Conventional Solvent Extraction Methods. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2014.

ZHANG, L. *et al.* Alginate-shelled SPI nanoparticle for encapsulation of resveratrol with enhanced colloidal and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 313–320, maio 2019.

ZHANG, P. *et al.* Ultrasonic pretreatment improved the physicochemical properties and riboflavin delivery ability of transglutaminase-catalyzed soy protein isolate gel. **Food Hydrocolloids**, v. 131, p. 107782, out. 2022.

ZHANG, W. *et al.* Tannic acid: A green crosslinker for biopolymer-based food packaging films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 136, p. 11–23, jun. 2023a.

ZHANG, X. *et al.* Preparation of core–shell hordein/pectin nanoparticles as quercetin delivery matrices: Physicochemical properties and colon-specific release analyses. **Food Research International**, v. 170, p. 112971, ago. 2023b.

ZHOU, S. *et al.* Whey protein isolate–phytosterols nanoparticles: Preparation, characterization, and stabilized food-grade pickering emulsions. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132486, ago. 2022.

ZHU, X.-F. *et al.* Freeze-thaw stability of pickering emulsions stabilized by soy and whey protein particles. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 173–184, 1 ago. 2017.

ZONG, G. *et al.* Monounsaturated fats from plant and animal sources in relation to risk of coronary heart disease among US men and women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 107, n. 3, p. 445–453, mar. 2018.