



Desenvolvimento de emulsões tipo HIPE A/O em microcanais para uso alimentício

Palavras-Chave: microfluídica, processos, estabilidade, HIPEs

Autores/as:

Gabriel Trevisol, FEA, UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Rosiane Lopes da Cunha, FEA, UNICAMP

Larissa Ribas Fonseca FEA, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As emulsões são amplamente aplicadas à indústria de alimentos para a produção de uma diversa gama de produtos, incluindo cremes, margarinas, manteigas, molhos (e.g. maionese e molhos de salada), além de sobremesas, como sorvetes, chocolates e coberturas. Dessa forma, diferentes processos são desenvolvidos para promover a produção das emulsões quanto às propriedades tecnológicas e encapsulação de bioativos. A veiculação em emulsões permite que os componentes bioativos sejam mais resistentes à degradação química e, conseqüentemente, sejam mais biodisponíveis (BAI *et al.*, 2021; BERTON-CARABIN, SAGIS e SCHROEN, 2018).

O grande desafio no desenvolvimento de emulsões é a sua inerente instabilidade termodinâmica. Devido à alta tensão interfacial, este sistema coloidal tende a separar fases rapidamente (BOUYER *et al.*, 2012). Para contornar tal instabilidade característica das emulsões, emulsificantes, como o PGPR (polirricinoleato de poliglicerol) são adicionados à fase contínua das emulsões (NORN, 2014).

As emulsões do tipo HIPE (*High Internal Phase Emulsion*) são caracterizadas por apresentarem uma fase dispersa com teor mínimo de 74% do volume total da emulsão. Devido a esse valor tão alto as gotas ficam fortemente empacotadas, resultando em um gel viscoso (LEE *et al.*, 2020; OKURO *et al.*, 2019) com característica semissólida (GAO, *et al.*, 2021). Essas propriedades podem contribuir para a redução de sua instabilidade, já que, devido ao aumento da viscosidade, as gotas perdem, em parte, sua mobilidade (OKURO *et al.*, 2019).

Porém as HIPE A/O, convencionalmente, são obtidas através de métodos que promovem a homogeneização das fases por meio de intensos processos mecânicos que podem gerar emulsões com alto índice de polidispersão e instabilidade. Como alternativa, a microfluídica pode favorecer a formação de emulsões com maior homogeneidade quanto à distribuição do tamanho de gota e, conseqüentemente, a sua estabilidade. Além disso, essa tecnologia oferece uma série de vantagens, como a capacidade de utilizar pequenas quantidades de reagentes e amostras, permite avaliar a produção das gotas de modo individual e possibilita um maior controle do processo a partir do ajuste do *layout* do microdispositivo, a vazão dos componentes, a temperatura e a pressão (LIU *et al.*, 2021).

Assim, a microfluídica surge como uma tecnologia atrativa para a produção de HIPE A/O, pois permite, pelo manejo das variáveis de processo, a sua formação com distribuição de gotas mais homogêneas, por serem produzidas em regime laminar. Dessa forma, o objetivo desse projeto é estudar o processo de formação de emulsões tipo HIPE A/O em microcanais e investigar os *layouts* de microdispositivos mais adequados e, também, avaliar as diferentes condições de processo para propiciar a melhor formação das HIPE A/O que possuem propriedades tecnológicas complexas e atrativas para aplicação em alimentos.

METODOLOGIA:

Formação de emulsões por método convencional

Emulsões A/O estabilizadas por PGPR em concentração fixa de 1,5% (m/m) foram produzidas a partir de diferentes frações volumétricas, iniciando-se com a razão (fase dispersa: fase contínua) de 10:90

até 80:20 (m/m), esta última dentro da definição de emulsões tipo HIPE (GOMES *et al.*, 2016; OKURO, *et al.*, 2019). Emulsões foram produzidas em recipiente encamisado acoplado a um banho termostático a 25 °C. A fase aquosa foi adicionada gota-a-gota através de uma bomba peristáltica Masterflex L/S (Cole-Parmer Instrument Company, EUA), com vazão média de 2,5 mL/min, com homogeneização simultânea usando um rotor-estator (Ultra Turrax T18, IKA, Alemanha) a 14.000 rpm. Posteriormente, estas emulsões foram caracterizadas quanto ao comportamento reológico (reômetro Physica MCR 301- Anton Paar, Graz, Austria), distribuição do tamanho de gotas, pela técnica de espalhamento de luz (Mastersizer 2000-Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) e microscopia óptica e fluorescência (Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Germany). Vermelho do Nilo foi utilizado como corante para a fase contínua. A partir dos dados obtidos, a perda de carga foi avaliada em diferentes condições de processo na microfluídica.

Formação de emulsões por método microfluídico

Os microdispositivos foram produzidos através da técnica de litografia macia (MCDONALD *et al.*, 2000). O *design* dos microcanais foi produzido em programa AutoCad 2000 (AutoDesk). Os microdispositivos foram conectados a sistemas de pressão controlada (Fluigent LineUP Flow EZ™ - FR) para alimentação das fases da emulsão, que foram produzidas utilizando água deionizada e óleo de girassol contendo PGPR 1,5% (m/m).

Os testes foram realizados em diferentes microdispositivos, alterando condições de processo, como a vazão total, a razão das vazões, os diâmetros e o *design* dos microcanais. A HIPE A/O produzida também foi caracterizada quanto à microscopia óptica e fluorescência e distribuição de tamanho de gota.

Caracterização das fases e emulsões

A determinação da densidade da fase oleosa foi realizada através de picnometria a 25°C.

O ângulo de contato das fases das emulsões, água e óleo com diferentes concentrações do emulsificante, foi avaliado através de um tensiômetro Tracker-S (Teclis, França) e foi medido durante o tempo de 45s de análise, para a padronização e estabilização de todas as amostras avaliadas (GOMES *et al.*, 2016). A tensão interfacial foi caracterizada entre as fases com diferentes concentrações do emulsificante, pelo método de gota pendente (ROUMPEA *et al.*, 2019) durante 2000s.

As curvas de escoamento das fases da emulsão foram obtidas usando um reômetro de tensão-controlada com uma varredura de taxa de cisalhamento entre 0 e 300 s⁻¹ (AR1500ex, TA Instruments, England). Já as curvas de escoamento das emulsões produzidas pelo método convencional, foram obtidas usando um reômetro de tensão-controlada a uma taxa de cisalhamento entre 0 e 1000 s⁻¹ (MCR Type 301, Anton Paar, Austria). Os dados foram ajustados ao modelo Herschel-Bulkley (OKURO *et al.*, 2019).

A microscopia das emulsões produzidas pelo método microfluídico também foi observada por microscopia óptica e de fluorescência (Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Germany). As imagens foram capturadas com o software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Germany) (OKURO *et al.*, 2019). O corante fluorescente Vermelho do Nilo foi usado para corar o óleo (OKURO *et al.*, 2019).

A avaliação da fração dispersa aquosa contida nas HIPE A/O, foram avaliadas por meio da análise de umidade, à 105 °C (instrumento de umidade MOC63u, Shimadzu Corporation, Japão).

Tratamento de dados

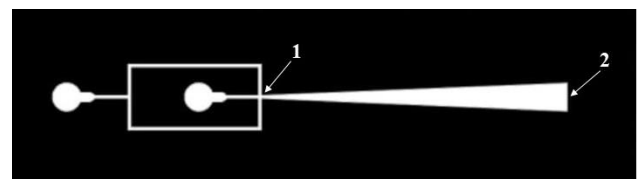
Balço de energia mecânica e perda de carga do processo

A partir do balanço de energia mecânica, tomando como volume de controle os pontos de entrada, cisalhamento para a formação da gota (1) e saída gota produzida (2) (Figura 1) dos microdispositivos e considerando regime laminar, foi possível estimar a perda de carga e as vazões do processo através da Equação 1.

$$P_B - P_f = 32 \cdot \eta \cdot \frac{L}{D_H^2} \cdot \frac{4 \cdot \dot{V}}{\pi \cdot D_H^2} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde P_B e P_f são as pressões de bombeamento e pressão final (no ponto 2) (Pa), η é a viscosidade da fase avaliada (Pa.s), L é o comprimento do canal (m), D_H^2 é o diâmetro hidráulico do canal (m) e \dot{V} é a vazão da fase avaliada (m³.s⁻¹).

Figura 1 – Fronteiras do sistema para cálculo da perda de carga.



Fonte: Autores (2023).

Avaliação do processo microfluídico na formação das HIPEs

O processo microfluídico na formação das HIPE A/O foram avaliados através do cálculo dos números adimensionais de Reynolds (Equação 2), Weber (Equação 3) e Capilar (Equação 4) (COSTA *et al.*, 2017).

$$Re_c = \frac{(\rho_c \cdot v_c \cdot D_H)}{\eta_c} \quad \text{Eq. 2}$$

$$We_d = \frac{(\rho_d \cdot v_d^2 \cdot D_H)}{\gamma_0} \quad \text{Eq. 3}$$

$$Ca = \frac{(3+2R)}{(1+R)} \cdot \frac{(\eta_c \cdot v_c)}{\gamma_0} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde os subíndices c e d correspondem às fases contínua e dispersa, respectivamente. As variáveis ρ , v e η são, respectivamente, a densidade ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), velocidade característica (m/s) e viscosidade (Pa.s). D_H é o diâmetro hidráulico do microcanal (m), $R = \frac{\eta_c}{\eta_d}$ e γ_0 é a tensão interfacial após estabilização do sistema ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Caracterização das fases da emulsão

A Tabela 1 exibe os resultados obtidos para o ângulo de contato, viscosidade e densidade das fases das emulsões, assim como a Figura 2 exibe a tensão interfacial analisada entre as fases das emulsões, com e sem a adição do emulsificante PGPR.

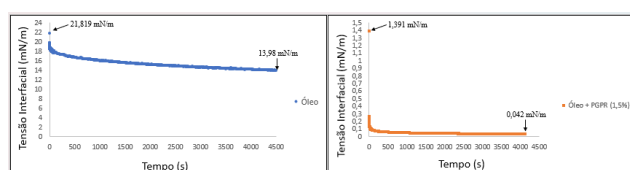
Tabela 1 - Ângulo de contato entre diferentes fluidos e PDMS e densidade dos fluidos.

Fluido	Ângulo de contato (°)	Densidade (g/cm^3)	Viscosidade (Pa.s)
Água	$97,47 \pm 0,19$	0,997	0,001
Óleo*	$45,60 \pm 3,47$	0,923	0,053
Óleo* + PGPR 1,5% (m/m)	$57,03 \pm 1,77$	0,915	0,055

* Óleo de girassol.

Fonte: Autores (2023).

Figura 2 - Tensão interfacial entre as fases das emulsões sem e com adição do emulsificante.



Fonte: Autores (2023).

A partir dos valores obtidos do ângulo de contato foi observado que, dentre os fluidos puros

analisados, a água foi a que obteve o maior ângulo de contato, enquanto o óleo de girassol obteve o menor, indicando assim a maior afinidade do PDMS pelo segundo fluido. Essa baixa afinidade do material com a água é desejável para a produção de emulsões A/O em microcanais, uma vez que se as gotas aderissem ao material devido a uma alta afinidade, o sistema estaria mais propenso a coalescer (DOS SANTOS, 2021), sendo necessário realizar diferentes tratamentos no microdispositivo para a produção das HIPE A/O.

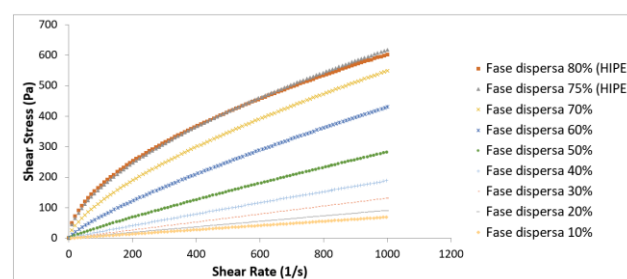
A tensão interfacial entre a água e o óleo foi superior à tensão obtida quando há a adição do PGPR no sistema. Além disso, a partir da Figura 1, é possível notar que o equilíbrio não foi atingido no sistema água e óleo, mesmo após 4000 s. Já com a adição do emulsificante foi notado o alcance do equilíbrio próximo aos 2500 s. Vale ressaltar que a tensão inicial no sistema sem a adição do emulsificante foi de 21,819 mN/m, enquanto que com a adição foi de 1,391 mN/m. A tensão de equilíbrio com emulsificante foi bastante baixa (0,042 mN/m).

Assim, a partir dos resultados de tensão interfacial obtidos, é possível concluir que o emulsificante PGPR em uma concentração de 1,5% (m/m) é capaz de atuar na estabilização e formação de gotas em HIPE A/O.

Caracterização das emulsões produzidas por métodos convencionais

A Figura 3 exibe as curvas de escoamento das emulsões com diferentes concentrações de fase dispersa aquosa avaliadas. Foi possível observar que as HIPE A/O, com maior concentração da fase dispersa, apresentaram comportamento pseudoplástico e maior viscosidade (a taxa de 1000 s^{-1}) entre as emulsões produzidas - 1,234 Pa.s e 1,649 Pa.s, para HIPE com 80% e 75% de fase aquosa dispersa, respectivamente.

Figura 2 - Curvas de escoamento das emulsões produzidas.

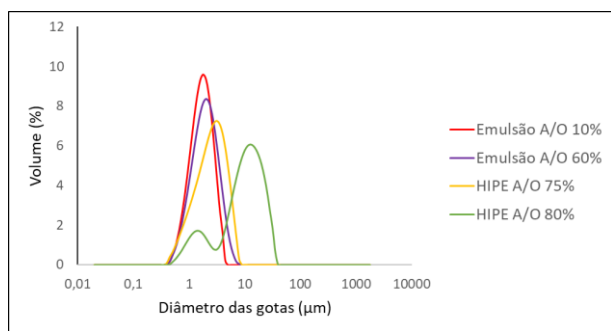


Fonte: Autores (2023).

A Figura 4 exibe os resultados obtidos a partir da análise de distribuição do tamanho de gotas da HIPE A/O. O sistema com fase dispersa aquosa de 75% (m/m) apresentou comportamento semelhante

às emulsões convencionais com distribuição unimodal e com diâmetro médio de $2,082 \pm 0,31 \mu\text{m}$. Em contrapartida, com a fase dispersa de 80% (m/m), distribuição bimodal foi observada com picos próximos de $1 \mu\text{m}$ e $10 \mu\text{m}$, e com valor de d_{32} de $5,493 \pm 1,48 \mu\text{m}$. Esse comportamento pode ser resultado do processo de desestabilização de emulsões como a coalescência, ocasionando a formação de gotas com diâmetros maiores ou até mesmo a dificuldade na medida devido sua maior viscosidade e ao maior empacotamento das gotas (GOMES, *et al.*, 2016).

Figura 4 - Distribuição do tamanho de gotas.



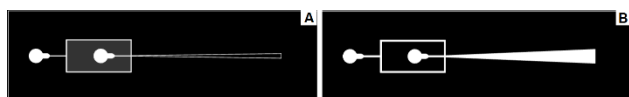
Fonte: Autores (2023).

Produção de HIPE A/O por método microfluídico

A fim de produzir emulsões tipo HIPE A/O, foram testados diferentes *layouts* de microdispositivos – em Y e *flow-focusing* retos e cônicos – variando as pressões de bombeamento das fases entre 0 a 400 mbar para o óleo e 0 a 345 mbar para a água.

Dentre os sistemas testados, os que demonstraram melhores resultados, para as HIPE A/O foram os microdispositivos com *layout flow-focusing* cônicos (Figura 5). Em condições de bombeamento de 160 mbar/200 mbar (Figura 6A) e 300 mbar/ 400 mbar (Figura 6B) (água/óleo) para ambos os canais citados. Na Figura 6, é apresentada a microscopia ótica e de fluorescência das emulsões após uma semana, o que evidencia a formação de gotas de água em óleo em ambos os microcanais e condições de bombeamento.

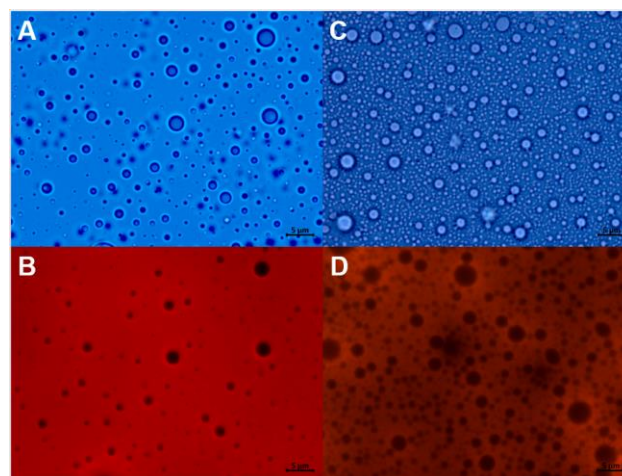
Figura 5 – Microdispositivos testados.



A - Comprimento da primeira entrada até interseção igual a 0,655 cm; comprimento da interseção até o final do canal igual a 2,74 cm; diâmetro inicial $100 \mu\text{m}$, diâmetro final $1000 \mu\text{m}$. B - Comprimento da primeira entrada até interseção igual a 0,645 cm; comprimento da interseção até o final do canal igual a 2,74 cm; diâmetro inicial $300 \mu\text{m}$, diâmetro final $3000 \mu\text{m}$.

Fonte: Autores (2023).

Figura 6 – Microscopias ótica e de fluorescência das emulsões HIPE A/O produzidas pelo método microfluídico.

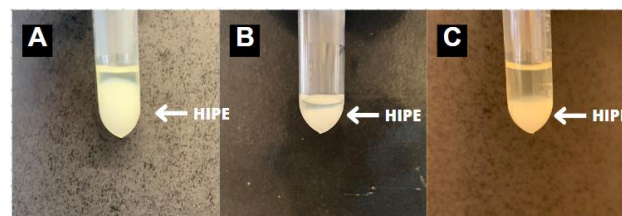


A e B – Condição: 300A/400O (75% fase dispersa); C e D – Condição: 160A/200O (75% fase dispersa).

Fonte: Autores (2023).

Na Figura 7 são mostradas emulsões produzidas durante 6h de processo. É possível observar que em maiores pressões de bombeamento há um aumento da produção de emulsão, uma vez que as vazões das fases dispersa e contínua são diretamente proporcionais às pressões de bombeamento das fases.

Figura 7 – HIPE A/O produzidas em diferentes condições de processo.



A – Microdispositivo A; condição: 300/400 (mbar de água/ mbar de óleo). B – Microdispositivo A; condição: 160/200. C – Microdispositivo B; condição: 160/200.

Fonte: Autores (2023).

Caracterização das HIPE A/O produzidas por método microfluídico

Através do balanço de energia mecânica, foi possível calcular a vazão de processo de cada fase da emulsão nos microdispositivos e, com a vazão determinada, foi possível calcular a velocidade característica de escoamento, o que permite o cálculo dos adimensionais Re_c , We_d e Ca (Tabela 2).

Por fim, foi realizada a análise de umidade das emulsões produzidas com os microdispositivos citados, obtendo ao menos 75% para as duas condições mencionadas em ambos os microcanais

apresentados na Figura 4, caracterizando, assim, as emulsões como HIPE A/O.

Tabela 2 – Caracterização das emulsões HIPE A/O produzidas pelo método microfluídico.

Canal	Condição (mbar)	Vazão (m ³ /s)	Velocidade (m/s)	Re_c	We_d	Ca
A	160A*/200O*	A - $2,73 \cdot 10^{-1}$ O - $3,96 \cdot 10^{-3}$	A - $1,37 \cdot 10^{-1}$ O - $1,98 \cdot 10^{-3}$	$2,20 \cdot 10^{-3}$	$2,96 \cdot 10^{-5}$	$6,13 \cdot 10^{-6}$
	300A/400O	A - $2,29 \cdot 10^{-1}$ O - $2,98 \cdot 10^{-3}$	A - $1,14 \cdot 10^{-1}$ O - $1,49 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$	$2,07 \cdot 10^{-5}$	$4,62 \cdot 10^{-6}$
B	160A/200O	A - $4,55 \cdot 10^{-1}$ O - $6,62 \cdot 10^{-3}$	A - $7,58 \cdot 10^{-2}$ O - $1,10 \cdot 10^{-3}$	$1,57 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$	$3,41 \cdot 10^{-6}$
	300A/400O	A - $3,80 \cdot 10^{-1}$ O - $4,99 \cdot 10^{-3}$	A - $6,33 \cdot 10^{-2}$ O - $8,32 \cdot 10^{-4}$	$1,19 \cdot 10^{-3}$	$8,16 \cdot 10^{-6}$	$2,57 \cdot 10^{-6}$

A – Água; O – Óleo de girassol.

Fonte: Autores (2023).

CONCLUSÕES:

O presente projeto demonstrou a viabilidade da produção de emulsões HIPE A/O por meio da microfluídica. De acordo com os processos avaliados, verificou-se que para a formação de tais emulsões foi necessário o uso de microdispositivos de *layout flow-focusing* e pressões de bombeamento de 160 mbar de água em combinação com 200 mbar de óleo + PRPG 1,5% (m/m) e 300 mbar de água para 400 mbar de óleo + PGPR 1,5% (m/m). Além disso, verificou-se que o uso de microdispositivos de diferentes *layouts* e pressões maiores ou menores de bombeamento, influenciam diretamente na distribuição de tamanho de gota e conseqüentemente na viscosidade e estabilidade da HIPE. Os resultados mostram a necessidade de um estudo aprofundado do processo para promover sua aplicação. No entanto, os resultados foram bastante promissores pois mostraram que é possível a formação de HIPE A/O através da microfluídica.

BIBLIOGRAFIA:

BAI, L.; HUAN, S.; ROJAS, O. J.; MCCLEMENTS, D. J. Recent Innovations in Emulsion Science and Technology for Food Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 32, p. 8944–8963, 18 ago. 2021.
BERTON-CARABIN, C. C.; SAGIS, L.; SCHROËN, K. Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. 2018.
BOUYER, E.; MEKHOULFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field. **International Journal of Pharmaceutics**, 15 out. 2012.
COSTA, A. L. R.; GOMES, A.; USHIKUBO, F. Y.; CUNHA, R. L. Gellan microgels produced in planar microfluidic devices. **Journal of Food Engineering**, v. 209, p. 18–25, 2017.
DOS SANTOS, Tatiana Porto; CEJAS, Cesare M.; CUNHA, Rosiane Lopes. Microfluidics as a tool to assess and induce

emulsion destabilization. **Soft Matter**, v. 18, n. 4, p. 698–710, 2022.

GAO, H.; MA, L.; CHENG, C.; LIU, J.; LIANG, R.; ZOU, L.; LIU, W.; MCCLEMENTS, D. J. Review of recent advances in the preparation, properties, and applications of high internal phase emulsions. **Trends in Food Science and Technology**. Elsevier Ltd., 1 jun. 2021.

GOMES, A.; COSTA, A. L. R.; ASSIS PERRECHIL, F. DE; CUNHA, R. L. Role of the phases composition on the incorporation of gallic acid in O/W and W/O emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 205–214, 2016.
Hartman L, Lago R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract.* 1973; 22:475-476.

LEE, M. C.; DADMOHAMMADI, Y.; TAN, C.; ABBSPOURRAD, A. Mitigating the Astringency of Acidified Whey Protein in Proteinaceous High Internal Phase Emulsions. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 12, p. 8438–8445, 21 dez. 2020.

LIU, H.; SINGH, R. P.; ZHANG, Z.; HAN, X.; LIU, Y.; HU, L. Microfluidic Assembly: An Innovative Tool for the Encapsulation, Protection, and Controlled Release of Nutraceuticals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry American Chemical Society**, 17 mar. 2021.

MCDONALD, J. C.; DUFFY, D. C.; ANDERSON, J. R.. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Electrophoresis**, v. 21, n. 1, p. 27–40, 2000.

ROUMPEA, E.; KOVALCHUK, N. M.; CHINAUD, M. Experimental studies on droplet formation in a flow-focusing microchannel in the presence of surfactants. **Chemical Engineering Science**, v. 195, p. 507–518, 2019.

NORN, V. **Emulsifiers in food technology**. John Wiley & Sons, 2014.

OKURO, P. K.; GOMES, A.; COSTA, A. L. R.; ADAME, M. A.; CUNHA, R. L. Formation and stability of W/O-high internal phase emulsions (HIPEs) and derived O/W emulsions stabilized by PGPR and lecithin. **Food Research International**, v. 122, p. 252–262, 1 ago. 2019.

OKURO, P. K.; GOMES, A.; COSTA, A. L. R.; ADAME, M. A.; CUNHA, R. L. Formation and stability of W/O-high internal phase emulsions (HIPEs) and derived O/W emulsions stabilized by PGPR and lecithin. **Food Research International**, v. 122, p. 252–262, 1 ago. 2019.