UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LETÍCIA DOS SANTOS FERREIRA

Desenvolvimento de géis de isolado proteico de soja carregados com emulsões de óleo de castanha do Brasil para veiculação de vitamina D₃

Pirassununga

2020

LETÍCIA DOS SANTOS FERREIRA

Desenvolvimento de géis de isolado proteico de soja carregados com emulsões de óleo de castanha do Brasil para veiculação de vitamina D₃

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestra em Ciências do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Samantha Cristina de Pinho

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383d Ferreira, Letícia dos Santos
Desenvolvimento de géis de isolado proteico de
soja carregados com emulsões de óleo de castanha do
Brasil para veiculação de vitamina D3 / Letícia dos
Santos Ferreira ; orientadora Samantha Cristina de
Pinho. -- Pirassununga, 2020.
107 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. isolado proteico de soja. 2. gel carregado.
3. encapsulação. 4. colicalciferol. 5. óleo de
castanha do Brasil. I. Pinho, Samantha Cristina de
, orient. II. Título.

Data de aprovação 20/02/2020

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Samantha Cristina de Pinho

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP)

Presidente da Banca Examinadora

Profª. Drª. Gisele Lourenço da Aparecida Makishi

Instituição: Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES)

Prof. Dr. Luiz Henrique Fasolin

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Profª. Drª. Izabel Cristina Freitas Moraes

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Sandra, por todo amor, esforço, apoio e sacrifícios para que eu chegasse até aqui. Por me ensinar valores e princípios para a vida.

Muito obrigada.

Ao meu irmão Vinícius, pela amizade e por sempre me incentivar a seguir em frente.

Dedico tudo isso a vocês

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a Deus por ser meu sustento e me guiar ao longo destes anos.

À Prof^a Samantha Cristina de Pinho, minha orientadora, por acreditar e confiar em mim desde o tempo das iniciações científica, pela paciência e todos os ensinamentos que você me transmitiu. Você é minha inspiração e exemplo de profissional. Uma mulher maravilhosa, com um coração enorme. Muito obrigada!

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, em especial ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado. Também à CAPES (financiamento 001) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos do Laboratório de Encapsulação e Alimentos Funcionais, em especial: Ivana, Marluci, Ricardo, Nayla, Thaís, Matheus e Pedro. E aos colegas da pós-graduação, Giselle e Paulo. Obrigada pelos inúmeros momentos bons que compartilhamos, pelas conversas, risadas, e também choros, vocês tornaram essa jornada mais leve.

À Prof^a Izabel C. F. Moraes, pela imensa e essencial ajuda nas análises reológicas.

À Prof^a Izabel C. F. Moraes e Prof Gustavo C. Dacanal por me aceitarem como aluna PAE, agradeço toda ajuda e ensinamentos.

Ao Marcelo Thomazini pela paciência e sua disposição a ajudar. E a todos profissionais: Carla Mônaco, Camila Molina, Ana Mônica Quinta Barbosa Bittante, Arina Rochetti pela ajuda com os ensaios realizados na USP/FZEA.

Ao INFABIC (UNICAMP) pela realização das análises de microscopia confocal.

Às minhas companheiras de casa, Nayla, Isa e Carol por tornarem meus dias mais alegres e pela amizade que construímos.

À minha família, pela presença, amor, paciência, conselhos e apoio.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional ao longo destes anos.

Obrigada.

RESUMO

FERREIRA, L. S. Desenvolvimento de géis de isolado proteico de soja carregados com emulsões de óleo de castanha do Brasil para veiculação de vitamina D₃. 2020. 107p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

Atualmente, os consumidores estão buscando cada vez mais alimentos saudáveis, bem como com apelo funcional. Desta forma, torna-se necessário o contínuo desenvolvimento de novas tecnologias de processamento visando atender tal demanda. Processos que possibilitem a adição de ingredientes funcionais em matrizes alimentícias é uma grande necessidade da indústria de alimentos. Nesse contexto, o presente Mestrado objetivou o desenvolvimento de géis veiculadores de vitamina D₃, produzidos a quente com isolado proteico de soja, carregados com emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja como tensoativo. Para produção da emulsão, foi necessário submeter o IPS a tratamento térmico usando diferentes binômios tempo vs temperatura, para aumentar sua capacidade emulsificante. As emulsões foram produzidas com a fase aquosa (contendo IPS tratado termicamente) e a fase lipídica (óleo de castanha do Brasil) dispersas através de ultra-agitação mecânica, e monitoradas quanto ao diâmetro médio e distribuição do tamanho das gotas utilizando difração a laser. As emulsões se apresentaram estáveis com diâmetros médios da ordem de 3 µm, por 30 dias de armazenagem sob refrigeração. A emulsão mais estável (produzida com 1,0% IPS e 0,2% goma xantana como espessante) foi utilizada para encapsular vitamina D₃. Este bioativo foi quantificado apresentou retenção de 49,2 ± 2,5% durante o período analisado, e sua estabilidade oxidativa também foi considerada como bastante alta. Devido a baixa solubilidade conhecida do IPS comercial, para a produção dos géis proteicos, primeiramente determinou-se os parâmetros da agitação mecânica que foram utilizados para hidratação do IPS na etapa de pré-gelificação, através de análises de solubilidade proteica, tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas. As formulações tratadas com agitação mecânica de 800 rpm por 20 e 30 min apresentaram as maiores solubilidades, 46 e 57%, respectivamente, e tamanho médio de 64 e 58 µm. Tais IPS pré-tratados por

agitação mecânica foram utilizados para produção dos géis proteicos a quente, em concentrações de 11, 13 e 15 g IPS/100 g gel e géis carregados, em que houve substituição da fase aquosa do gel proteico pela emulsão de castanha do Brasil. Os géis foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas, reológicas e morfológicas, através de análise de capacidade de retenção de água, ensaios de compressão uniaxial, ensaios oscilatórios de pequena amplitude e microscopia confocal a laser. A solubilidade do IPS pareceu não afetar as propriedades mecânicas nem reológicas dos géis. Foi verificado que nos géis carregados, as gotas de emulsão mostraram-se como partículas ativas, fortalecendo a estrutura proteica. Além disso, verificou-se que o bioativo encapsulado apresentou alta retenção nos géis de IPS ao longo de 30 dias de armazenamento.

Palavras-chaves: isolado proteico de soja, gel carregado, encapsulação, colicalciferol, óleo de castanha do Brasil

ABSTRACT

FERREIRA, L. S. **Development of soy protein isolate gels loaded with Brasil nut oil emulsions for delivery of vitamin D₃**. 2020. 107p. Dissertation (Master). Faculty of Animal Science and Food Engineering - University of São Paulo, Pirassununga, 2020.

Nowadays, consumers are increasingly looking for healthy foods, as well as functional products. Thus, it is necessary to continuously develop new processing technologies to meet this demand. Processes that enable the addition of functional ingredients in food matrices are an urgent need of the food industry. In this context, the present Master thesis aimed at the development of vitamin D₃ carrier heat-set gels, produced with soy protein isolate, incorporated with Brazil nut oil emulsions stabilized with soy protein isolate as surfactant. For the production of the emulsions, it was necessary to subject the IPS to heat treatments using different binomials time vs. temperature, to increase its emulsifying capacity. The emulsions were produced with the aqueous phase (containing thermally treated IPS) and the lipid phase (Brazil nut oil) dispersed through mechanical ultra-agitation, and monitored for the average diameter and droplet size distribution. The emulsion were had average diameters of the order of 3 µm, for 30 days of storage under refrigeration. The most stable emulsion (produced with 1.0% IPS and 0.2% xanthan gum as a thickener) was used to encapsulate vitamin D₃. This bioactive was quantified and showed $49.2 \pm 2.5\%$ retention during the storage period, and its oxidative stability was also considered to be quite high. Due to the low solubility of commercial IPS, for the production of protein gels, the mechanical agitation parameters that were used to hydrate the IPS in the pre-gelation step were first determined, through analysis of protein solubility, average size and distribution of particle size. The formulations treated with mechanical agitation of 800 rpm for 20 and 30 min showed the highest solubilities, 46 and 57%, respectively and the average size of 64 and 58 µm. Such IPS pre-treated by mechanical stirring were used for the production of hot protein gels, in concentrations of 11, 13 and 15 g / 100 g gel and emulsion-filled gels, in which the aqueous phase of the protein gel was replaced by the emulsion of Brazil nut oil. The gels were characterized for mechanical, rheological and morphological properties,

through analysis of water retention capacity, uniaxial compression tests, small amplitude oscillatory tests and laser confocal microscopy. The solubility of the IPS did not appear to affect the mechanical or rheological properties of the gels. It was verified that in the emulsion-filled the emulsion droplets acted as active particles, strengthening the protein structure. In addition, it was found that the encapsulated bioactive showed high retention in the IPS gels over 30 days of storage.

Key words: soy protein isolate, loaded gel, encapsulation, colicalciferol, Brazil nut oil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões.....	19
Figura 2 Representação esquemática da distribuição das gotículas em um emulsão óleo em água em que há formação de creme: (I) H_T – Altura da emulsão; (II) H_C : altura do creme, H_E : altura da emulsão, H_S : altura da fase aquosa; (III) Separação total da emulsão em duas fases, creme (H_C) e soro (H_S).	20
Figura 3 Representação esquemática de gelificação por indução térmica de géis proteicos.	24
Figura 4 Ligações envolvidas no processo de gelificação de proteínas globulares.....	24
Figura 5 Exemplos de estrutura de géis carregados de emulsão observadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser. As setas indicam as gotas lipídicas imersas na rede proteica de isolado proteico de soro de leite.	25
Figura 6 Comportamento reológico das partículas ativas e inativas incorporadas em sistemas gelificados	26
Figura 7 Imagem do fruto da castanheira e castanhas.....	27
Figura 8 Estruturas químicas da vitamina D_2 e D_3	29
Figura 9 Esquema ilustrativo da produção das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja.....	35
Figura 10 Comportamento do potencial zeta das dispersões de isolado proteico de soja submetidas aos tratamentos térmicos	46
Figura 11 Análise da solubilidade proteica do IPS em diferentes condições de pH.	47
Figura 12 Diâmetros médios, em volume, das emulsões estabilizadas com isolado proteico de soja tratado termicamente utilizando diferentes binômios de tempo e temperatura.....	49
Figura 13 Índice de cremeação para as emulsões produzidas com diferentes binômios de tempo e temperatura de tratamento térmico do isolado proteico de soja.	51
Figura 14 Aspecto visual das emulsões preparadas com isolado proteico de soja submetido a diferentes condições de tratamento térmico.....	52
Figura 15 Distribuição de tamanho de partículas das amostras de IPS tratado termicamente	55
Figura 16 Valores de tamanho médio, em volume. Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).....	56
Figura 17 Microscopia ótica do isolado proteico de soja tratado termicamente.....	57

Figura 18 Diâmetro médio das gotas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja, utilizando diferentes concentrações de goma xantana, em volume. Concentrações de goma xantana (% m/v): (A) 0,1 %; (B) 0,2 %; (C) 0,3%.....	59
Figura 19 Distribuição de tamanho de partículas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja e goma xantana 0,1 % (m/v).....	60
Figura 20 Distribuição de tamanho de partículas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja e goma xantana 0,2 % (m/v).....	61
Figura 21 Distribuição de tamanho de partículas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja e goma xantana 0,3 % (m/v).....	62
Figura 22 Diâmetro médio de gota, em volume, das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja, encapsulando vitamina D ₃	63
Figura 23 Perfil temporal de concentração de vitamina D ₃ nas emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja.	65
Figura 24 Micrografias ótica de fluorescências. Fase oleosa corada com corante Red Nile e imagem do microscópio ótico. Barra de escala = 100µm.	69
Figura 25 Avaliação visual das dispersões/géis de IPS obtidos com diferentes concentrações de proteína (IPS), após 24 horas de produção, para determinação da mínima concentração de gelificação (MCG).	70
Figura 26 Solubilidade das dispersões de isolado proteico de soja de 10 a 15g IPS/100 g de dispersão.	71
Figura 27 Solubilidade das dispersões de isolado proteico de soja de 11, 13 e 15g IPS/100 g de dispersão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si (p<0,05).	72
Figura 28 Tamanho médio, em volume, de agregados nas dispersões de proteínas de 11, 13 e 15g IPS/100 g de dispersão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	73
Figura 29 Distribuição de tamanho de partículas das amostras de dispersões de isolado proteico de soja: (A) 11g IPS/100 g; (B) 13g IPS/100 g e (C) 15g IPS/100 g.	74
Figura 30 Aspecto visual das amostras dos géis de isolado proteico se soja não-carregados.	77
Figura 31 Aspecto visual das amostras dos géis carregados de isolado proteico de soja. ...	77
Figura 32 Morfologia dos géis não-carregados de isolado proteico de soja visualizada por microscopia de varredura confocal a laser.....	78
Figura 33 Morfologia dos géis carregados de isolado proteico de soja visualizada por microscopia de varredura confocal a laser.....	79

Figura 34 Capacidade de retenção de água dos géis de isolado proteico de soja não-carregados.....	80
Figura 35 Capacidade de retenção de água dos géis de isolado proteico de soja carregados.	81
Figura 36 Dados obtidos através dos ensaios de compressão uniaxial dos géis de isolado proteico de soja não-carregados e carregados. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).	82
Figura 37 Resultados dos testes de varredura de frequência para os géis de isolado proteico de soja não-carregados: (A) hidratação manual; (B) 800 rpm por 20 min e (C) 800 rpm por 30 min.....	85
Figura 38 Resultados dos testes de varredura de frequência para os géis de isolado proteico de soja carregados: (A) hidratação manual; (B) 800 rpm por 20 min e (C) 800 rpm por 30 min.	86
Figura 39 Perfil temporal de concentração de vitamina D ₃ nos géis. Valores teóricos: 178, 174 e 170 µg D ₃ /g gel para os géis com 11, 13 e 15 g IPS/100 g gel respectivamente. Tratamentos com médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ao longo dos dias. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas não se diferem entre si ($p < 0,05$).	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidade de vitamina D ₃ em alguns alimentos.....	30
Tabela 2 Condições testadas para solubilização do IPS através do tratamento térmico.....	34
Tabela 3 Condições testadas para produção das emulsões de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja como tensoativo e goma xantana como espessante.	36
Tabela 4 Formulações testadas para produção das emulsões encapsuladas com vitamina D ₃	37
Tabela 5 Valores de <i>span</i> das amostras das dispersões de isolado proteico de soja tratados termicamente.	56
Tabela 6 Valores de <i>span</i> das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja encapsulando vitamina D ₃	64
Tabela 7 Índice de peróxido das amostras em mEq de oxigênio/kg óleo.	67
Tabela 8 Análise de TBARS (Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico) em mg MDA/kg	68
Tabela 9 Formulações empregadas para produção dos géis de isolado proteico de soja não-carregados e carregados.	76
Tabela 10 Parâmetros das equações tipo lei de potência dos géis de isolado proteico de soja não-carregados.(G1, G2 e G3: hidratação manual; G4, G5 e G6: 800 rpm por 20 min; G7, G8 e G9: 800 rpm por 30 min e nas concentrações de 11, 13 e 15 % m/v respectivamente)	87
Tabela 11 Parâmetros das equações tipo lei de potência dos géis de isolado proteico de soja carregados. (G10, G11 e G12: hidratação manual; G13, G14 e G15: 800 rpm por 20 min; G16, G17 e G18: 800 rpm por 30 min e nas concentrações de 11, 13 e 15 % m/v respectivamente).....	87
Tabela 12 Concentração de vitamina D ₃ nos géis de isolado proteico de soja carregados, após 30 dias de armazenamento sob refrigeração.....	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. EMULSÕES: DEFINIÇÃO E ESTABILIDADE	17
2.2. ISOLADO PROTEICO DE SOJA (IPS)	21
2.2.1. Gelificação proteica	23
2.2.2. Géis carregados com emulsão.....	25
2.3. ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL.....	27
2.4. ESTRUTURA E FUNÇÕES BIOLÓGICAS DA VITAMINA D.....	28
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. MATERIAL.....	33
4.1.1. Produção e caracterização das emulsões.....	33
4.1.2. Produção e caracterização dos géis	33
4.2. MÉTODOS.....	34
4.2.1. Encapsulação da vitamina D ₃ em emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja (IPS)	34
4.2.2. Produção e caracterização dos géis proteicos de isolado proteico de soja a quente .	41
4.2.3. Análises Estatísticas	45
5. RESULTADOS	46
5.1. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DAS EMULSÕES DE ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL ESTABILIZADA COM ISOLADO PROTEICO DE SOJA.....	46
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE SOJA TRATADO TERMICAMENTE: MICROSCOPIA E TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA.....	54
5.3. EMULSÕES DE ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL ESTABILIZADAS COM ISOLADO PROTEICO DE SOJA E GOMA XANTANA	58

5.4. ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA D ₃ NAS EMULSÕES E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA.....	63
5.4.1. Determinação do tamanho médio e distribuição do tamanho de gotas	63
5.4.2. Estabilidade da vitamina D ₃ encapsulada	64
5.4.3. Avaliação da oxidação lipídica	66
5.4.4. Microscopia ótica de fluorescência.....	69
5.5. PRODUÇÃO DOS GÉIS DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA	70
5.5.1. Mínima concentração de gelificação (MCG).....	70
5.5.2. Determinação das condições do processamento pré-gelificação dos géis de IPS: avaliação da solubilidade proteica, tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas.....	71
5.5.3. Caracterização dos géis de isolado proteico de soja não carregados e carregados...	75
5.5.4. Microestrutura dos géis.....	78
5.5.5. Capacidade de retenção de água (CRA).....	80
5.5.6. Caracterização mecânica dos géis.....	81
5.5.7. Caracterização reológica dos géis por ensaios oscilatórios de baixa deformação.....	84
5.5.8. Estabilidade da vitamina D ₃ encapsulada nos géis proteicos	88
6. CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
APÊNDICES.....	101
ANEXOS.....	106

1. INTRODUÇÃO

Dada a ausência de vitamina D₃ na maior parte dos alimentos, cada vez mais produtos alimentícios fortificados com esse nutriente vêm sendo desenvolvidos, com o intuito de suplementar a dieta dos consumidores. O interesse nesses tipos de produtos enriquecidos aumenta a cada dia, pois é sabido que a deficiência de vitamina D₃ no organismo provoca graves complicações de saúde como maior propensão a certos tipos de câncer, asma, artrite, hipertensão, distúrbios imunológicos, tuberculose, diabetes tipo 1, osteoporose e problemas cardiovasculares. Além disso, seu papel fundamental na formação e manutenção do tecido ósseo também seria comprometido caso haja carência desse micronutriente.

Em relação às fontes proteicas, as proteínas animais (especialmente as proteínas lácteas) são a matéria-prima mais comum em processos de gelificação em alimentos. No entanto, projeta-se que o mercado mundial de proteína vegetais cresça mais de US \$ 14 bilhões até 2022 (NACHAY, 2017). As proteínas vegetais são, sem dúvida, ingredientes cuja importância vem crescendo vertiginosamente na indústria de alimentos, e tem havido uma crescente urgência em desenvolver alimentos à base de proteínas vegetais, bem como investigar seus aspectos nutricionais. O alto custo das proteínas de origem animal (especialmente das proteínas lácteas), em comparação com as proteínas vegetais, também é uma forte motivação para investigar as matrizes proteicas contendo este tipo de ingrediente.

Um meio eficaz de desenvolvimento de alimentos fortificados com micronutrientes, dentre eles a vitamina D₃, que é altamente hidrofóbica, pode ser incorporá-los em matrizes gelificadas, como na forma de géis carregados de emulsão. Tais estruturas tem a vantagem de serem capazes de carrear componentes bioativos encapsulados nas gotículas de emulsão, mas ao invés de serem veiculados em uma dispersão aquosa, poderem ser usadas como matrizes alimentícias proteicas, polissacarídicas ou mistas (misturas de proteínas e polissacarídeos).

Géis carregados com emulsão podem ser produzidos a partir da substituição tanto parcial quanto total da água de uma matriz de gel (proteico, polissacarídico ou misto) por uma emulsão estável. A influência da incorporação das gotículas da emulsão nas propriedades mecânicas e reológicas da estrutura gelificada depende

majoritariamente da afinidade da matriz biopolimérica com o agente emulsificante presente na interface das gotículas da emulsão.

Além disso, em relação à produção dos géis pode-se fazer o uso do isolado proteico de soja (IPS), que é considerado um ingrediente interessante para a indústria de alimentos, devido às suas características nutricionais, elevado conteúdo proteico, menor custo comparativamente às proteínas de origem animal e às suas diversas propriedades funcionais, que incluem a capacidade de formar géis.

Além disso, as propriedades gelificantes do IPS dependem de diversos fatores relacionados à estrutura, composição, grau de dissociação, desnaturação ou agregação das suas principais globulinas constituintes: a 11S (glicina) e a 7S (β -conglícinina).

Entretanto, durante o processo de obtenção comercial do IPS, as proteínas podem sofrer modificações físico-químicas drásticas, afetando de forma negativa a sua solubilidade, que tende então a se tornar bastante baixa em pHs ácidos e neutros, que são característicos de produtos alimentícios. Por esse motivo, IPS comerciais mostram-se desafiadores de serem aplicados isoladamente como agentes gelificantes em processos em larga escala.

Dentro do contexto descrito, o objetivo principal da presente Dissertação foi desenvolver géis veiculadores de vitamina D₃, produzidos a quente com isolado proteico de soja, carregados com emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja como tensoativo. Tal desenvolvimento foi dividido em duas partes principais: (i) produção e caracterização das emulsões de óleo de castanha do Brasil encapsulando vitamina D₃, estabilizadas com isolado proteico de soja; (ii) produção e caracterização de géis de isolado proteico de soja incorporando tais emulsões. Os resultados obtidos neste trabalho de Mestrado são interessantes pois podem ser usados para a produção de protótipos de alimentos gelificados, produzidos totalmente com ingredientes de origem vegetal (óleo de castanha do Brasil e proteínas de soja), e enriquecidos com vitamina D₃.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. EMULSÕES: DEFINIÇÃO E ESTABILIDADE

Emulsões podem ser definidas como dispersões de dois líquidos imiscíveis, onde um deles está disperso no outro na forma de gotículas. Um sistema onde as gotas são constituídas por óleo e dispersas em um meio aquoso é denominado emulsão óleo em água (O/A). Por outro lado, se o sistema é formado por gotas de água dispersas em uma fase oleosa, é chamado de emulsão água em óleo (A/O) (FENNEMA et al., 2010; McCLEMENTS, 2005; MORRISON; ROSS, 2002).

Sistemas de entrega ou veiculação de bioativos baseados em emulsões são particularmente adequados para encapsular, proteger e entregar componentes bioativos lipofílicos em vários produtos, como cosméticos, farmacêuticos ou em alimentos (GOLFOMITSOU et al., 2018).

Na indústria de alimentos é possível encontrar diversos exemplos da ocorrência natural ou do uso de emulsões produzidas, como leite, produtos lácteos, sorvetes, maionese, creme, molhos que são emulsões O/A, manteiga e margarina que são emulsões A/O. Outros exemplos de produtos emulsionados muito comuns na indústria de alimentos são os embutidos cárneos (FENNEMA et al., 2010; McCLEMENTS, 2005).

Para transformar dois líquidos imiscíveis em uma emulsão, é necessário um grande aporte de energia, que pode ser por um método de alta energia, por exemplo, fornecida por agitação ou cisalhamento intensos, ou método de baixa energia, que utilizam as propriedades físico-química do sistema para obtenção de emulsões com glóbulos de tamanho reduzido (TADROS et al., 2004). Dentre os métodos de alta energia, o mais utilizado para emulsificação está a homogeneização, realizado com dispositivos mecânicos que submetem os líquidos a intensa agitação mecânica. Há diversos tipos de homogeneizadores para produzir emulsões, como os agitadores de alta velocidade (que podem ser chamados também de ultra-agitadores), moinhos coloidais, homogeneizadores a alta pressão e homogeneizadores ultrassônicos (FENNEMA et al., 2010; McCLEMENTS, 2005). Esses diferentes processos influenciam diretamente na distribuição de tamanho de gota e nas propriedades físico-químicas das emulsões produzidas. Os agitadores de alta velocidade são os equipamentos mais utilizados em métodos que se

homogeneiza diretamente as fases lipídica e aquosa tanto na indústria alimentícia, consiste em um processo em batelada, em que o óleo, água e demais ingredientes são colocados em um recipiente que pode conter volumes variando de cm^3 a m^3 . A seguir, os componentes a serem emulsificados são agitados a alta velocidade, fazendo com que os líquidos se misturem, gerando gotículas de tamanhos micrométricos (McCLEMENTS, 2005; WONG et al, 2015). Além disso, pode-se ainda reduzir o tamanho das gotículas até valores nanométricos (100 e 300 nm), por meio da utilização de outras técnicas de alta energia, como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizador e ultrassom (ALMEIDA et al., 2008; JAFARI et al., 2008).

Uma nanoemulsão pode ser preparada pelo uso de um homogeneizador a alta pressão, no qual a passagem de uma macroemulsão é forçada, sob alta pressão, através de um orifício, havendo um rápido aumento na velocidade e correspondente diminuição na pressão. Com o aumento da área superficial da emulsão, pela deformação e rompimento das gotas, torna-se importante empregar sistemas emulsionantes adequados, que estabilizem a nova interface formada. Segundo Jahnke (1998) homogeneizadores para pequena escala processarem pequenas quantidades de amostras, com capacidade de 6 a 20 litros/hora, enquanto que homogeneizadores para escala laboratorial possuem capacidade entre 20 a 500 litros/hora. Já os homogeneizadores para grande escala possuem capacidade entre 500 e 60.000 litros/hora, e operarem continuamente (ALMEIDA et al., 2008; JAFARI et al., 2008). Já no emprego da ultrassom, uma superfície sólida vibratória agita a emulsão em frequências ultrasônicas, normalmente 20 kHz ou maior, e alta energia, causando alto cisalhamento e cavitação, quebrando as gotículas (MASON et al., 2006).

Em relação à estabilidade das emulsões, existem diversos mecanismos que contribuem para sua desestabilização, como cremação, sedimentação, floculação e coalescência. Tais processos são ilustrados na Figura 1.

Figura 1 Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões.

Fonte: Adaptado de McCLEMENTS, D. J. Food Emulsion: Principles, practices and techniques. 2. Ed., Washington, D.C.: CRC Press, 2005.

A cremação e sedimentação são formas de separação gravitacional. A cremação ocorre apenas nas emulsões O/A, e se tem a formação do creme na dispersão pelo movimento ascendente das gotículas devido ao fato de terem densidade menor que o líquido, enquanto que para as emulsões A/O, ocorre a sedimentação, que é a migração das gotículas para a parte inferior por terem densidade maior que a fase contínua. A floculação ocorre quando duas ou mais gotículas se agrupam em flocos, mas mantém suas integridades individuais, não havendo destruição das gotas individuais. Por sua vez, a coalescência é o mecanismo pelo qual duas ou mais gotículas se fundem para formar uma única gota maior, fazendo que as gotículas da emulsão sofram cremação ou sedimentação posteriormente (McCLEMENTS, 2005; MORRISON; ROSS, 2002). Essas condições de desestabilizações podem ser analisadas por um método simples e economicamente viável, que é a observação visual da estabilidade física das emulsões, que consiste em verter as emulsões em tubos de ensaio transparente e deixar em repouso por um período de tempo, medindo a altura da separação entre as camadas (Figura 2) (McCLEMENTS, 2007).

Figura 2 Representação esquemática da distribuição das gotículas em um emulsão óleo em água em que há formação de creme: (I) H_T – Altura da emulsão; (II) H_C : altura do creme, H_E : altura da emulsão, H_S : altura da fase aquosa; (III) Separação total da emulsão em duas fases, creme (H_C) e soro (H_S).

Fonte: Adaptado de McCLEMENTS, D.J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.

As emulsões são um sistema termodinamicamente instável, devido ao contato entre as fases aquosa e oleosa, ou seja, moléculas hidrofílica e hidrofóbica respectivamente, e o sistema tende a separação de fases. Portanto para obter emulsões cineticamente estáveis por um longo período de tempo, é necessário utilizar uma substância que confira estabilidade ao sistema. Um estabilizante é qualquer ingrediente que possibilite que a dispersão se mantenha uniforme, sem separação de fases do sistema, como os emulsificantes e modificadores de textura (McCLEMENTS, 2005).

Segundo a legislação vigente, emulsificante é a substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento (Portaria nº 540 de 1997). Os emulsificantes são moléculas anfifílicas, apresentam porções lipofílicas e hidrofílicas na mesma molécula, que podem promover a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial. O emulsificante durante a homogeneização absorve a superfície das gotículas recém

formadas, formando um filme entre os dois produtos: a parte polar do emulsificante tem uma afinidade com a água e a apolar (cadeia carbônica) com a fase oleosa, protegendo a emulsão de agregação das gotículas (floculação e/ou coalescência) (McCLEMENTS, 2005; GAVA, 2009).

Os emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos são surfactantes de baixa massa molar, proteínas, fosfolipídeos e polissacarídeos (DICKINSON, 2010; McCLEMENTS, 2005). Segundo Dickinson (2011), de forma geral as proteínas apresentam maior atividade emulsificante, quando comparadas aos polissacarídeos ou hidrocoloides, sendo capazes de estabilizar uma emulsão em concentrações menores. A escolha de um emulsificante específico, ou uma mistura, é fundamental para se obter emulsões estáveis. Entre os emulsificantes, as proteínas de fontes vegetais têm sido amplamente estudadas em sua capacidade de estabilizarem emulsões e serem comercialmente viáveis (McCLEMENTS, 2005).

As emulsões alimentícias são complexas, pois a fase aquosa pode conter diversos compostos solúveis, como açúcares, sais, ácidos, bases, proteínas e carboidratos. Por sua vez, a fase oleosa pode ser formada por triglicerídios, diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres, esteróis e vitaminas lipossolúveis (ARAÚJO, 2004).

2.2. ISOLADO PROTEICO DE SOJA (IPS)

A soja (*Glicine max* L.), leguminosa da família *Fabacea*, é uma planta originária do continente asiático (centro sul da China) e que chegou no Brasil no início do século XX, e atualmente é cultivada em quase todo o país. É um grão rico em proteínas, elevado valor nutricional e contém de 18 a 20 % de óleo. O isolado proteico de soja, produzido a partir do farelo (flocos desengordurados de soja), é constituído de 85 a 90 % de proteínas, também contém isoflavonas, e apresenta baixo teor de óleo e carboidratos (JARDINE; BARROS, 2018).

O isolado proteico de soja é obtido a partir da separação das proteínas da soja das porções solúveis e insolúveis de carboidratos dos flocos desengordurados, que são lixiviados por uma solução alcalina e centrifugação para remoção dos resíduos insolúveis. Então as proteínas são precipitadas pela adição de ácido até seu ponto isoelétrico (pH 4,5) que são separadas por decantação, lavadas, neutralizadas e secas (LIU, 1997).

O isolado proteico de soja é largamente aplicado na indústria de alimentos, como ingredientes em produtos cárneos, bebidas, panificação e formulações de nutrição clínica, devido suas qualidades nutricionais, mas também devido às suas propriedades funcionais (LIU, 1997; TORREZAN; CRISTIANINI, 2005). As propriedades funcionais são as características que o IPS proporciona ao produto alimentício, como solubilidade, viscosidade, dispersabilidade, capacidade gelificante, emulsificante, de retenção de água e espumante (LIU, 1997). Tais propriedades podem sofrer alterações com mudanças de pH, força iônica, temperatura, tipo de solvente, que ocasionam alterações na estrutura nativa da proteína fazendo as cadeias estabelecerem novas estruturas de equilíbrio (FENNEMA et al., 2010)

As propriedades funcionais do IPS, que possibilita seu uso em sistemas alimentícios, estão relacionadas diretamente com as características dos principais componentes deste ingrediente, que são frações 7S e 11S e que representam cerca de 70% (em massa) das proteínas do grão de soja. A globulina 11S, conhecida como glicina, dispõe de uma estrutura hexamérica de massa molar de aproximadamente 360 kDa, cujas subunidades monoméricas apresentam estrutura A-S-S-B, onde A representa polipeptídeo ácido (33-44 kDa), B polipeptídeo básico (20 kDa) e S-S corresponde as pontes dissulfídicas que unem os polipeptídeos (LIU, 1997). Por sua vez, a globulina 7S, conhecida com β -conglucina, é uma glicoproteína de reserva, de forma trimétrica com massa molar médio de 180 kDa que representa 91% da fração 7S, e é constituída por três subunidades α' (57-83 kDa), α (57-76 kDa) e β (42-53 kDa), que interagem para formar cerca de 6 isômeros conhecidos (designados como B1 a B6) (TORREZZAN; CRISTIANINI, 2005; YAKLICH, 2001).

O efeito do tratamento térmico na estrutura das proteínas de soja vem sendo muito estudada, pois se faz necessário seu uso para eliminação de fatores antinutricionais, como os inibidores de tripsina, e também para o aumento da digestibilidade dessas proteínas (BARAC et al., 2004).

O aquecimento das proteínas de soja em 60 °C e 70 °C é responsável pela desnaturação parcial e total da fração 7S dessas proteínas respectivamente, já a fração 11S ocorre sua desnaturação parcial em 80 °C e total em 100 °C (GARCIA et al., 1997). Segundo BARAC e colaboradores (2004) o aquecimento acima de 70 °C dissocia a estrutura quaternária das frações 7S e 11S, desnaturando suas

subunidades e promovendo a formação de agregados via interações eletrostáticas, hidrofóbicas e dissulfídicas.

O tratamento térmico das proteínas de soja é interessante, dentre outros motivos, quando se deseja aumentar a sua capacidade emulsificante, pois esta propriedade depende fortemente da sua solubilidade. Os IPS comerciais possuem, de modo geral, baixa solubilidade em meio aquoso, necessitando pré-tratamentos para aumentar sua afinidade por meios aquosos, e, conseqüentemente, sua capacidade emulsificante através de alteração no pH e temperatura (RYAN, et al., 2008; SHAO; TANG, 2014). Além disso, o poder tensoativo das proteínas está relacionado com a redução da tensão interfacial entre as fases água/óleo, que por sua vez está ligado à capacidade da proteína de migrar, adsorver, desdobrar e se rearranjar na interface.

2.2.1. Gelificação proteica

Uma importante característica das proteínas é sua capacidade de formar géis. A gelificação proteica se refere à mudança do estado “sol” para o “estado semelhante ao gel”. O calor, as enzimas ou os cátions divalentes em condições apropriadas facilitam essa formação, induzindo a formação de uma rede (DAMODARAN, 2010). As propriedades físico-químicas que influenciam a gelificação proteica nos alimentos estão relacionadas ao seu tamanho, forma, composição e sequência de aminoácidos, carga líquida, distribuição de cargas, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, estruturas (secundária, terciária e quaternária), flexibilidade e rigidez molecular em resposta a alterações do meio (pH, temperatura e força iônica) ou interações com outros ingredientes nos alimentos (DAMODARAN, 2010; GEREMIAS-ANDRADE et al., 2017).

Dentre os diversos métodos para obtenção de géis de proteínas globulares, os mais comuns são indução térmica, ou géis por aquecimento, e que pode ser descrita, de modo genérico, como formada por três etapas: desnaturação ou desdobramento, agregação ou coagulação e por último as ligações cruzadas para formação da rede proteica (BAIER, McCLEMENTS, 2005). A Figura 3 mostra o esquema de gelificação da proteína globular por aquecimento, e a Figura 4 apresenta as ligações envolvidas no processo de gelificação de proteínas globulares.

Figura 3 Representação esquemática de gelificação por indução térmica de géis proteicos.

Fonte: Adaptado de ALTING, A.C. et al. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, v. 17, p.469-479, 2003.

Na etapa de desnaturação/desdobramento, as proteínas globulares passam de seu estado nativo (original) para um estado desnaturado, expondo seus sítios reativos, favorecendo as ligações intermoleculares. Em seguida, ocorre a formação de agregados moleculares em função das ligações entre as proteínas desdobradas, levando a formação de uma estrutura de agregados. E por último, há formação de ligações cruzadas entre as estruturas de agregados, e consequentemente a formação do gel (TTOBITANI; ROSS-MURPHY, 1997).

Figura 4 Ligações envolvidas no processo de gelificação de proteínas globulares.

Fonte: CLARK, A.; ROSS-MURPHY, S.B. Modern biopolymer science. In: KAPASIS, S.; NORTON, I. T.; UBBINK, J.B. Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application. London: Academic Press, 2009. p. 27.

2.2.2. Géis carregados com emulsão

Géis carregados com emulsão é uma matriz de gel (por exemplo, de proteína) dentro da qual são incorporadas gotas de emulsão, como se observa na Figura 5.

Figura 5 Exemplos de estrutura de géis carregados de emulsão observadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser. As setas indicam as gotas lipídicas imersas na rede proteica de isolado proteico de soro de leite.

Fonte: GEREMIAS-ANDRADE, I.M. Produção, caracterização e avaliação da digestibilidade in vitro de géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

Segundo Dickinson (2012), a presença de emulsão em um gel proteico é, usualmente, um reforço na estrutura, que induz à uma maior rigidez desse material “semissólido”. Estas estruturas são classificadas como “sólidos macios” ou *soft solids* e podem ser produzidas a partir de uma emulsão estável incorporada numa fase contínua gelificada (DICKINSON, 2012, OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015a,b).

Produtos lácteos tais como sorvetes, iogurtes e queijos, e produtos cárneos processados podem ser classificados como géis carregados com emulsão. Além disso, a aplicação de géis carregados com emulsão em formulações alimentícias pode reduzir o teor de gordura em alguns alimentos além de possibilitar a fortificação com bioativos hidrofóbicos (GEREMIAS-ANDRADE et al., 2016).

A presença das gotículas de emulsão influencia fortemente nas propriedades reológicas e mecânicas, e essas propriedades dos géis carregados depende da interação entre as gotas de emulsão e a matriz proteica do gel. Diversos estudos

envolvendo géis carregados subdividem as gotas ou partículas como ativas ou inativas a partir da caracterização mecânica dos sistemas (compressão uniaxial) (SALA et al., 2007; SALA et al., 2009a,b). Quando as gotículas de emulsão estão conectadas mecanicamente à rede de gel são consideradas partículas ativas; e são consideradas inativas, se não estão ligadas à matriz, podendo até mesmo enfraquecer o gel formado. Pequenas variações nas interações entre as gotas e a matriz proteica gelificada não podem ser observadas a partir dos parâmetros obtidos por ensaios de compressão uniaxial (módulo elástico e propriedades de fratura dos géis), sendo assim necessário realizar ensaios reológicos de pequena deformação. Segundo Tabilo-Munizaga e Barbosa-Cánovas (2005), a aplicação de diversos testes reológicos é fundamental, uma vez que nenhum ensaio é capaz de fornecer todas as informações necessárias para a caracterização completa e adequada dos comportamentos reológicos de sistemas complexos, tais como os géis carregados (BRITO-OLIVEIRA, 2017). A Figura 6 mostra o comportamento reológico das partículas ativas e inativas incorporadas em sistemas gelificados:

Figura 6 Comportamento reológico das partículas ativas e inativas incorporadas em sistemas gelificados

Fonte: GEREMIAS-ANDRADE, I. M. et al. Rheology of emulsion-filled gels applied to the development of food materials. *Gels*, Basel, v. 2, p.6, 2016.

2.3. ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL

O castanheiro *Bertholletia excelsa* é uma árvore nativa da região Amazônica, pertence à família Lecythidaceae, que pode atingir mais de 45 m de altura. Seu fruto, possui casca dura e coloração castanho-escuro, pesando até dois kg, contém de oito a vinte sementes ou castanhas triangulares de até 2 cm de largura e 5 cm de comprimento (Figura 7) (YANG, 2009). A semente da castanheira, é popularmente conhecida como castanha do Brasil, castanha do Pará, noz amazônica, e no mercado externo, pelo decreto nº 51.209, de 18 de Agosto de 1961, passou a ser denominada como “Brazil nut” (castanha do Brasil).

Figura 7 Imagem do fruto da castanheira e castanhas.

Fonte: Castanha do Brasil: benefícios e cuidados. Disponível em: <www.saboravida.com.br/gastronomia/2017/04/23/castanha-do-brasil-beneficios-e-cuidados/>. Acesso em: 10 de junho de 2018.

A castanha do Brasil é a principal *commodity* do extrativismo da floresta amazônica, e a extração é feita por catadores florestais, na maioria moradores locais, e são destinadas ao comércio nacional e internacional (SILVA; VANÂNCIO, 2011; YANG, 2009). A comercialização dessa castanha é a principal fonte de renda para muitas comunidades indígenas e ribeirinhas da Amazônia (YANG, 2009).

A castanha do Brasil é considerada um alimento muito nutritivo, devido ao alto teor de proteínas, carboidratos, lipídeos insaturados, vitaminas e minerais essenciais (SILVA JUNIOR, et al., 2017). Além disso, possui concentrações significativas de selênio, importante mineral que é consumido em quantidades insuficientes pela população.

O selênio é um nutriente essencial para seres humano, pois desempenha papéis chave no sistema imunológico, previne doenças cardiovasculares e estudos relacionam o consumo de selênio com a prevenção de câncer de mama, pulmão e próstata, entre outras patologias (SILVA JUNIOR, et al., 2017; SILVA; VENÂNCIO, 2011).

A maior parte da castanha do Brasil destina-se ao consumo *in natura*, mas castanhas quebradas perdem 40% do seu valor comercial e são usadas para produzir óleo vegetal (RODRIGUES et al., 2005). O óleo de castanha do Brasil pode ser usado na indústria para diferentes aplicações. Na indústria alimentícia ainda são raros produtos à base de óleo de castanha, ficando restrito seu consumo apenas na culinária. Na culinária, o óleo de castanha é um substituto para o azeite de oliva, sendo apreciado pelo seu sabor suave e agradável, utilizados em saladas e refogados po exemplo. Um possível uso mais nobre e de maior valor agregado para o óleo de castanha na indústria de alimentos seria utilizá-lo como matriz lipídica para encapsulação de bioativos, unindo seus benefícios aos do bioativo encapsulado.

Na indústria de cosméticos o óleo de castanha é usado devido à sua composição em ácidos graxos, linoleico e linolênico, que são essenciais na formação do tecido epitelial. Tais ácidos são fundamentais para os processos bioquímicos e fisiológicos de formação da barreira cutânea, além da presença de tocoferol antioxidante que pode auxiliar na prevenção do envelhecimento da pele, aparecimento de rugas e flacidez e o selênio que potencializa o efeito antioxidante (ECYCLE, 2018). O óleo de castanha do Brasil é matéria-prima de sabonetes, hidratantes e óleos corporais.

O óleo vegetal obtido da castanha do Brasil é composto por uma mistura complexa de triglicerídeos, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos, sendo 70% de ácido palmítico, oleico e linoleico. Há também uma pequena concentração de tocoferóis, carotenoides e esteróis (RODRIGUES et al., 2005).

2.4. ESTRUTURA E FUNÇÕES BIOLÓGICAS DA VITAMINA D

A vitamina D é encontrada na natureza nas formas de vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalciferol). Apresentam estrutura química bastante semelhante, sendo diferenciadas por um grupo metil presente na D₂ (Figura 8).

Figura 8 Estruturas químicas da vitamina D₂ e D₃.

Fonte: JORGE, A. J. L., et al. Deficiência da vitamina D e doenças cardiovasculares. *International Journal of Cardiovascular Science*, p. 422 – 432, 2018.

Existem três fontes de obtenção de vitamina D, que seriam a alimentação, a exposição ao sol e a suplementação (HOLICK, 2004). A vitamina D₂ é de origem vegetal, derivada da irradiação de luz ultravioleta em moléculas de ergosterol, podendo ser consumida através de suplementos e alimentos fortificados. Por sua vez, a vitamina D₃ é obtida pela irradiação de luz ultravioleta sobre moléculas de 7-deidrocolesterol (ergosterol) que se encontram sob a epiderme. O ergosterol é a molécula precursora da vitamina D, que durante a exposição à radiação solar é convertida em pró-vitamina D, que é convertida em vitamina D₃, sendo responsável por até 90% da vitamina que o corpo recebe, mas também pode ser consumida por meio de suplementos e alimentos fortificados (BAEKE et al., 2010; HOLICK, 2004).

A vitamina D₃ é popularmente conhecida devido seu papel na formação e manutenção do tecido ósseo, pois regula o metabolismo do cálcio e do fósforo. Sua carência está associada a diversas doenças crônicas como câncer, asma, artrite, hipertensão, distúrbios imunológicos, tuberculose, diabetes tipo 1, osteoporose e problemas cardiovasculares (BAEKE et al., 2010; JUDD et al., 2010).

A ingestão direta de vitamina D₃ por alimentos está restrita a alguns peixes como o salmão, carapau e sardinha, e ao consumo de óleo de peixe (Tabela 1). Por isso há necessidade de fortificação de alimentos com a vitamina D, sendo possível encontrar no mercado pães, cereais, sucos, leites e produtos lácteos fortificados com este micronutriente (HOLICK, 2004; TANGPRICHA et al., 2003). Para evitar a carência de vitamina D₃, de 15 a 20 min de exposição ao sol seriam suficientes para sua síntese, mas a constância de vivência em lugares fechados e uso do protetores solares inibem significativamente esse processo (STUPPIELLO, 2018).

Tabela 1 Quantidade de vitamina D₃ em alguns alimentos.

Alimento	Porção (g)	µg
Atum	2 porções médias (90g)	3,68
Sardinha crua	100 g	5,2
Sardinha enlatada	100 g	17
Óleo de peixe	1 colher de sopa	40,3
Manteiga	1 colher de sopa	0,45
Fígado de boi	100 g	1,12

Fonte: Adaptado de BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. A importância do consumo dietético de cálcio e vitamina D no crescimento. J. Pediatria. Porto Alegre, v. 84, 2008.

Os lipídios são fontes de energia para o corpo humano e ajudam também na absorção de vitaminas A, D, E e K que são lipossolúveis e de outros componentes, como os carotenoides (MAIHARA et al., 2006). Diversos estudos com matrizes lipídicas para sua encapsulação vêm sendo feitos, a fim de melhorar a bioacessibilidade de compostos lipossolúveis, como nanoemulsões, emulsões, lipossomas e, partículas lipídicas sólidas.

Gasparini (2016) estudou a microencapsulação de vitamina D₃ em matriz à base de proteína isolada de soro de leite a partir do processo de secagem por atomização. Foram desenvolvidas quatro formulações de matriz, sendo duas diferenciando-se pela adição ou não de surfactante, e duas pela reticulação enzimática ou não. Os resultados indicam que a encapsulação foi bem sucedida para as amostras com concentrações baixas do bioativo, apresentando valores de 56 % de eficiência de encapsulação para matriz não reticulada, indicando que, a

matriz utilizada apresentou boas propriedades como agente encapsulante quando não reticulada através do método de secagem por atomização, representando um ingrediente promissor na formulação de novos produtos alimentícios. Paucar et al. (2016) estudaram a encapsulação de colecalciferol (vitamina D₃) em micropartículas lipídicas sólidas por spray chilling, que é muito interessante para a microencapsulação de vitaminas lipossolúveis. As micropartículas aumentaram a estabilidade da vitamina, apresentando retenção de 86,3% da vitamina após 65 dias. Por sua vez, Chaves et al. (2018) coencapsularam curcumina e vitamina D₃ em lipossomas multilamelares, os lipossomas foram produzidos por hidratação de prolipossomas e observou que a coencapsulação foi possível em lipossomas multilamelares estabilizados apenas com as gomas guar e xantana, apresentando alto teor de retenção dos bioativos ao longo de 42 dias de armazenamento.

3. OBJETIVOS

Diante do exposto na Revisão Bibliográfica apresentada, a presente Dissertação teve como objetivo principal o desenvolvimento de géis veiculadores de vitamina D₃, produzidos a quente com isolado proteico de soja, carregados com emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja como tensoativo.

Para que fosse possível alcançar este objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- (a) Determinação das melhores condições para produção das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja como tensoativo, encapsulação da vitamina D₃ e caracterização físico-química das emulsões com vitamina D₃ encapsulada;
- (b) Determinação da influência do processamento de agitação mecânica no aumento da solubilidade do isolado proteico de soja comercial;
- (c) Caracterização da microestrutura dos géis proteicos mistos produzidos com o isolado proteico de soja processado em diferentes condições de agitação mecânica na etapa de pré-gelificação;
- (d) Avaliação da estabilidade da vitamina D₃ incorporada nos géis proteicos produzidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Em todas as etapas deste estudo a água deionizada utilizada foi obtida pelo sistema de ultrapurificação Direct-Q3 (Millipore, Billerica, MA, EUA).

4.1.1. Produção e caracterização das emulsões

Para a produção das emulsões, foi utilizado óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) (Miragina, Rio Branco, AC, Brasil), isolado proteico de soja (Protimarti M-90 - Marsul, Montenegro, RS, Brasil), goma xantana (Grindsted Xanthan 80, doada pela Du Pont, Cotia, SP, Brasil) e vitamina D₃ (colicalciferol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como bioativo encapsulado.

Para as análises de quantificação de vitamina D₃ foi utilizado metanol (UV-IR-HPLC) (Panreac, Barcelona, Espanha). Para as análises de oxidação lipídica, determinação do índice de peróxido e TBARS, foram utilizados clorofórmio (CHCl₃) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), iso-octano (C₈H₁₈), isopropanol (C₃H₈O), tiocianato de amônio (NH₄SCN), cloreto de bário diidratado (BaCl₂.2H₂O), sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) e metanol (UV-IR-HPLC) (Panreac, Barcelona, Espanha), etanol absoluto (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Merck, Darmstadt, Alemanha), butil-hidroxi-tolueno (BHT) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e HCl (Chemycalis, Americana, SP, Brasil). O fluoróforo utilizado na análise de microscopia de fluorescência foi corante vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em etanol absoluto (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).

4.1.2. Produção e caracterização dos géis

Os géis proteicos foram produzidos com isolado proteico de soja (Protimarti M-90 - Marsul, Montenegro, RS, Brasil) e cloreto de sódio (Labsynth, Diadema, SP, Brasil).

Óleo de silicone (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) foi utilizado durante as análises reológicas. Para a análise morfológica utilizou-se os corantes vermelho do

Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e *Fast green* (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Encapsulação da vitamina D₃ em emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja (IPS)

4.2.1.1. Determinação das melhores condições de produção das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja

A primeira etapa para produção das emulsões foi o aumento da solubilidade do isolado proteico de soja, a fim de ser usado como tensoativo de forma mais efetiva. Diferentes condições, baseadas em Brito-Oliveira et al. (2017), foram testadas. A amostra de IPS foi primeiramente hidratada com água deionizada até a concentração desejada (Tabela 2), e a seguir, a dispersão foi agitada por 30 min em agitador magnético (MA 085, Marconi, Piracicaba, SP), à temperatura ambiente e o pH da solução foi ajustado para 7,0 com o uso de solução NaOH 0,5M. A amostra foi então aquecida em banho-maria (MA 127, Marconi, Piracicaba, SP), e testados diferentes binômios de tempo de aquecimento e temperatura, descritos na Tabela 2, visando a melhor solubilização do IPS.

Tabela 2 Condições testadas para solubilização do IPS através do tratamento térmico.

Condição experimental	Valores utilizados
pH	7,0
Concentração IPS (% m/v)	0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,00
Tempo de aquecimento (min)	15 e 30
Temperatura (°C)	60, 65, 70, 75 e 80

Fonte: Própria autoria

Para a produção das emulsões, a fase aquosa (IPS) e a fase lipídica (óleo de castanha do Brasil, 5% m/v) foram dispersas, ambas a mesma temperatura, através de ultra-agitação mecânica (T25, IKA, Staufen, Alemanha) a 15.000 rpm por 5 min,

como ilustrado na Figura 9. A goma xantana foi adicionada após a produção das emulsões sob agitação mecânica. Benzoato de sódio (0,02% m/v) foi adicionado às amostras para evitar a contaminação microbiológica. As emulsões foram armazenadas sob refrigeração.

Durante o período de armazenamento, as emulsões produzidas foram monitoradas quanto ao diâmetro médio e distribuição do tamanho das gotas (item 4.2.1.3) e índice de cremeação (item 4.2.1.4). Todas as análises foram realizadas em triplicata

Figura 9 Esquema ilustrativo da produção das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja.

Fonte: Adaptado de BRITO-OLIVEIRA, T. C. **Curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas incorporadas em géis carregados: um estudo comparativo com géis proteicos e géis biopoliméricos mistos obtidos a frio**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil, 2017.

Após a produção das emulsões apenas com isolado proteico de soja como tensoativo, adicionaram diferentes concentrações de goma xantana (0,1 a 0,3% m/v) visando a melhor estabilidade física das emulsões, formulações descritas na Tabela 3.

Tabela 3 Condições testadas para produção das emulsões de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja como tensoativo e goma xantana como espessante.

Condição experimental	Valores utilizados
pH	7,0
Concentração IPS (% m/v)	0,75; 1,00; 1,25 e 1,50
Tempo de aquecimento do IPS (min)	15 e 30
Temperatura (°C)	70, 75 e 80
Goma xantana (%m/v)	0,1; 0,2 e 0,3

Fonte: Própria autoria

4.2.1.2. Encapsulação da vitamina D₃ nas emulsões

Para a encapsulação da vitamina D₃, as formulações que se apresentaram maior estabilidade física, em relação ao diâmetro médio e distribuição do tamanho das gotas e índice de cremeação dentre as descritas na Tabela 3 foram utilizadas. A vitamina D₃ foi adicionada na fase lipídica e as emulsões foram produzidas conforme descrito no item 4.2.1.1. As concentrações de vitamina D₃ de 120 e 200 µg/mL de emulsão, foram testadas de modo, a determinar a concentração ideal para a continuação do estudo. As amostras foram monitoradas quanto ao diâmetro médio e distribuição do tamanho das gotas (item 4.2.1.3), índice de cremeação (item 4.2.1.4), quantificação da vitamina D₃ encapsulada (item 4.2.1.5), e oxidação lipídica (item 4.2.1.6) durante 30 dias de armazenagem. Todas as amostras foram produzidas em triplicata, e as análises também foram realizadas em triplicatas.

Tabela 4 Formulações testadas para produção das emulsões encapsuladas com vitamina D₃.

Emulsão	IPS (% m/v)	Óleo de castanha do Brasil (% m/v)	Goma xantana (% m/v)	Concentração de vitamina D ₃ (µg/ ml emulsão)
1	1,00	5,0	0,20	-
1A	1,00	5,0	0,20	200
1B	1,00	5,0	0,20	120
2	1,25	5,0	0,20	-
2A	1,25	5,0	0,20	200
2B	1,25	5,0	0,20	120
3	1,50	5,0	0,20	-
3A	1,50	5,0	0,20	200
3B	1,50	5,0	0,20	120

Fonte: Própria autoria

4.2.1.3. Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de gotas

Para a determinação do diâmetro médio e a distribuição de tamanho das gotas foram obtidas medidas de difração a laser (SALD-210V, Shimadzu, Kyoto, Japão) à 25 °C, realizado no laboratório de Tecnologia de Biopolímeros (BIOPOLITEC) no Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA/FZEA/USP). As amostras foram dispersas em água deionizada antes das medições. O processamento dos dados foi realizado pelo *software* próprio (Wing-1, Shimadzu, Kyoto, Japão). O tamanho das gotas foi expresso em diâmetro médio e o índice de polidispersidade (*span*) foi determinado de acordo com a Equação 1. As medidas foram realizadas em triplicata.

$$span = \frac{d_{90}-d_{10}}{d_{50}} \quad (1)$$

4.2.1.4. Índice de cremação

As amostras de emulsões foram monitoradas após sua produção em relação ao índice de cremação (IC). Imediatamente após a preparação das emulsões, alíquotas de cada uma das emulsões foram vertidas em tubos de ensaio e

armazenadas sob refrigeração. O índice de cremeação é uma medida da separação visual da emulsão, em uma camada superior rica em óleo (camada de creme), e uma camada aquosa, e indica a estabilidade física de uma emulsão, e foi definido de acordo com a Equação 2 (McCLEMENTS, 2007):

$$IC (\%) = \frac{H_c}{H_t} \times 100 \quad (2)$$

em que:

H_c = a altura da fase superior (cremeação);

H_t = a altura total da emulsão.

4.2.1.5. Quantificação da vitamina D₃ encapsulada nas emulsões de óleo de castanha do Brasil

Primeiramente foi realizada a extração da vitamina D₃ das emulsões. Um volume de 250 µL de emulsão e 4 mL de metanol foram misturados, e em seguida, cada amostra foi agitada em vórtex por 30 s. A seguir, foram submetidas a banho ultrassônico (410US, UNIQUE, Indaiatuba, SP, Brasil) por 5 min. As amostras foram então centrifugadas (centrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 7.000 rpm, a 11 °C por 5 min, e o sobrenadante coletado e reservado. Adicionou-se então 4 mL de metanol ao tubo contendo o corpo de fundo e o procedimento foi repetido mais uma vez. Por fim, o sobrenadante retirado foi misturado com o sobrenadante reservado e filtrados através de membrana de Nylon com diâmetro de 13 mm, poros de 0,45 µm (Analítica, São Paulo, Brasil). Em seguida, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 265 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração de vitamina D₃ foi determinada usando-se uma curva padrão da amostra de emulsão (sem vitamina incorporada) extraída com metanol, segundo procedimento descrito, e acrescida de concentrações conhecidas de D₃. A análise foi realizada em triplicata e lida com brancos formados pelo extrato das emulsões sem vitamina encapsulada.

4.2.1.6. Avaliação da oxidação lipídica

a) Determinação do índice de peróxido

A oxidação lipídica das amostras de emulsões foram monitoradas durante a estocagem sob refrigeração através da avaliação do índice de peróxido (SHANTHA

E DECKER, 1994). A fase lipídica foi extraída pela adição de 2 mL de solução isooctano/isopropanol (3:2 v/v) a 500 µL de amostra seguido de agitação em vórtex por 10 segundos, e centrifugadas por 1300 g por 5 min. Logo após, 200 µL do sobrenadante resultante foi recolhido e agitado em vórtex com 2,8 mL de solução clorofórmio/metanol (7:3 v/v) por 10 s. Posteriormente, 15 µL de solução de tiocianato de amônio (30% m/v) foi adicionados às amostras, com agitação em vórtex por 10 s. Subsequentemente, 15 µL de solução de Fe (II) foi adicionados às amostras, com agitação em vórtex por 10 s. Em seguida as amostras foram deixadas em repouso por 5 min e os valores de absorbância foram determinados a 500 nm. A concentração de hidroperóxido foi obtida com o uso de curva de calibração obtida a partir de solução de Fe (III). O índice de peróxido foi determinado do meio da Equação 3.

$$PV = \frac{Abs}{55,84 * m * mo * 2} \quad (3)$$

onde:

PV = valor de peróxido, expresso em miliequivalentes de peróxido por quilo de fase lipídica

Abs = absorbância da amostra

m = coeficiente angular da curva de calibração

mo = massa em gramas da fase lipídica

55,84 = peso atômico do Fe

2 = fator para conversão miliequivalente de Fe para miliequivalente de peróxido

A fim de se obter a solução de Fe (II), 0,1 g de cloreto de bário diidratado foi adicionado à 50 mL de água deionizada. Separadamente, 0,125 g de sulfato de Fe (II) foi adicionado à 12,5 mL de água deionizada. Em seguida, essas duas soluções foram misturadas sob agitação magnética constante, logo após, adicionou-se 0,50 mL de solução de ácido clorídrico 10 M. A solução resultante foi filtrada em filtro de papel Whatman nº1 para a retirada do cloreto de bário precipitado e obtenção da solução final de Fe (II).

Para a obtenção da solução de Fe (III), 0,1666 g de cloreto de ferro (III) foram dissolvidos em 10 mL de solução de ácido clorídrico 10 M. Subsequentemente, 400 µL de peróxido de hidrogênio (30%) foram adicionados à solução que, em seguida,

foi fervida por 5 min para a remoção do excesso de peróxido de hidrogênio. A solução obtida foi diluída com água até 100 mL. Após essa diluição, 1 mL da solução foi removida e diluída a 50 mL com solução clorofórmio/metanol (7:3 v/v) para a obtenção da solução de Fe(III) com concentração 20 µg/mL.

b) Determinação da oxidação secundária por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O monitoramento da oxidação lipídica foi realizado de acordo com o protocolo de LEE et al. (2011). Uma solução de TCA-TBA-HCl (ácido tricloroacético – ácido tiobarbitúrico – ácido clorídrico) foi preparado com 75 g de TCA, 1,68 g de TBA e 8,8 mL de HCl 12 M, em 414 g de água. Um volume de 100 mL desta solução foi misturado com 3 mL de BHT (2%) em etanol, sendo que 4 mL desta solução foram adicionados a 4 mL das emulsões. Após a mistura, a solução foi submetida a um aquecimento em água fervente por 10 min, resfriadas e, centrifugadas a 7000 rpm por 5 min. Em seguida a absorbância foi lida a 532 nm. As concentrações de TBARS foram calculadas a partir de uma curva de calibração feita com 1,1,3-3 tetraetoxipropano (TEP).

4.2.1.7. Microscopia ótica de fluorescência

O corante vermelho do Nilo foi encapsulado na emulsão para determinar a distribuição do material encapsulado, segundo protocolo de Abhyankar et al. (2011). Uma solução-estoque de corante vermelho do Nilo (1 mg/mL em etanol) foi preparada e adicionada à fase oleosa (10 µL de solução-estoque/g de óleo) no processo de produção da emulsão. A análise de microscopia de fluorescência foi feita no microcópio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC One Zeiss Drive, Thornwood, NY, EUA) com fonte de luz fluorescente HBO 100. Essa análise foi realizada no dia seguinte ao preparo da emulsão, no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (ZMV/FZEA/USP).

4.2.2. Produção e caracterização dos géis proteicos de isolado proteico de soja a quente

4.2.2.1. Determinação da mínima concentração de gelificação (MCG)

A mínima concentração de gelificação foi determinada de acordo com Wong et al. (2013), pelo método dos tubos invertidos com modificações. Os géis foram preparados conforme o item 4.2.2.4, com a diferença que após estocagem sob refrigeração durante, no mínimo 12 h, tanto tubos como béquers foram invertidos e armazenados por 3 h a 4 °C. A menor concentração na qual os géis não caíram dos tubos invertidos foi considerada a MCG para produção dos géis.

4.2.2.2. Processamento pré-gelificação: avaliação da solubilidade do IPS

A solubilidade do IPS foi uma questão importante avaliada, pois trata-se de um fator que pode afetar significativamente a microestrutura formada durante a gelificação dos géis proteicos. Protocolo semelhante feito por McCarthy et al. (2014) para concentrado proteico de soro de leite foi aplicado. O IPS foi primeiramente disperso manualmente em diferentes concentrações (10 a 15 g IPS/100 g dispersão) e pH 7,0. Em seguida, a dispersão foi processada por agitação mecânica, utilizando-se agitador tipo propulsor naval com 3 pás em diferentes intensidades de agitação (400, 600 e 800 rpm), à temperatura ambiente e diferentes tempos de processo (10, 20 e 30 min). As amostras processadas foram analisadas em relação à solubilidade (item 4.2.2.3), sendo que as amostras com maiores solubilidades foram analisadas quanto ao seu tamanho médio e distribuição de partícula (item 4.2.1.3).

4.2.2.3. Determinação da solubilidade proteica

Após cada processamento descrito no item 4.2.2.2 as amostras foram centrifugadas a 7.000 g, por 30 min, a 4 °C. Tanto a amostra sem centrifugação quanto o sobrenadante obtido após a centrifugação (proteínas solúveis) foram analisadas em relação ao teor de sólidos totais em analisador de umidade (M35, Ohaus, Parsipanny, NJ, EUA). A porcentagem de IPS solubilizado após a agitação mecânica foi calculada conforme a Equação 4:

$$\% \text{ solubilidade IPS} = \frac{\text{massa de sólidos antes da centrifugação} - \text{massa de sólidos no sobrenadante}}{\text{massa de sólidos antes da centrifugação}} * 100 \quad (4)$$

4.2.2.4. Produção dos géis de isolado proteico de soja

As concentrações proteicas de 11, 13 e 15 g/100 g IPS foram escolhidas para produção dos géis. Às dispersões adicionou-se NaCl (concentração final no gel de 0,1 M) e o pH ajustado para 7,0. A fim de evitar o crescimento microbiano, benzoato de sódio (0,2 g/100 g) também foi adicionado. As dispersões de IPS pré-tratadas por agitação mecânica conforme descrito no item 4.2.2.2, nas condições escolhidas de acordo com os resultados obtidos na etapa citada, foram armazenadas durante a noite sob refrigeração para hidratação completa. Os sistemas foram aquecidos a 95 °C por 30 min, e armazenados sob refrigeração antes das análises de caracterização (JOSE et al., 2016).

Nos géis carregados com emulsão, a fase aquosa das dispersões proteicas foi totalmente substituída pela emulsão de castanha do Brasil estabilizada com isolado proteico de soja.

4.2.2.5. Caracterização macroscópica visual das formulações de géis proteicos

As amostras foram, logo após sua produção, analisadas visualmente e subjetivamente e classificadas como: gel não - sustentável, gel sustentável fraco e gel sustentável forte, para a construção de diagramas visuais (PERRECHIL et al., 2011; GEREMIAS-ANDRADE et al., 2017; BRITO-OLIVEIRA., 2017). Somente os géis caracterizados como sustentáveis foram analisados em termos de capacidade de retenção de água, compressão uniaxial e reologia oscilatória de pequena amplitude.

4.2.2.6. Determinação da capacidade de retenção de água (CRA)

Os géis com características de géis sustentáveis (1- 2 g) foram pesados em papel Whatman nº 1 e colocados em tubo tipo Falcon. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min, a 6 °C. A porcentagem de umidade espremível (UE) foi calculada pela equação: $100 \times ((\text{massa papel de filtro úmido} - \text{massa papel seco}) / \text{massa papel úmido})$. A capacidade de retenção de água (CRA) foi calculada de acordo com a Equação 5 (GEREMIAS-ANDRADE et al., 2017):

$$CRA (\%) = 100 - UE \quad (5)$$

4.2.2.7. Ensaios de compressão uniaxial

Os ensaios de compressão uniaxial dos géis foram realizados em texturômetro (TA-Xtplus, TextureAnalyser, Godalming, Surrey, Reino Unido). Os corpos de prova com dimensões de 10 mm de diâmetro e 15 mm de altura foram cortados e comprimidos por uma probe de alumínio (20 mm de diâmetro) em 80 % de sua altura original a uma velocidade de compressão constante de 1 mm/s. A força e a altura foram então convertidas em tensão verdadeira (σ_H) e deformação verdadeira (ϵ_H) para a construção da curva tensão versus deformação, de acordo com as equações 6 e 7, respectivamente (OLIVER et al., 2015a,b; STEFFE, 1996). A inclinação da região linear da curva permitiu a obtenção do módulo de Young aparente (E). As propriedades de ruptura (tensão - σ_{rup} e deformação - ϵ_{rup}) foram determinadas a partir do ponto máximo da curva tensão-deformação.

$$\sigma_H = \frac{F}{A(t)} \quad (6)$$

$$\epsilon_H = \ln \frac{H(t)}{H_0} \quad (7)$$

onde: F = força aplicada; A(t) = área de contato do probe com a amostra; H₀ = altura inicial do gel; H(t) = altura do gel no tempo t de análise.

4.2.2.8. Ensaios reológicos de pequena amplitude

Os ensaios de reologia dinâmica oscilatória foram realizados segundo protocolo adaptado de Jose et al. (2016), utilizando-se uma probe de placa plana, 60 mm de diâmetro e gap de 1 mm em um reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA). O processo de gelificação foi conduzido no próprio reômetro e óleo de silicone foi aplicado ao redor da amostra para prevenir perda de umidade durante o experimento. Para cada amostra, foi utilizada uma rampa de aquecimento de 25 até 95 °C, permanecendo a 95 °C por 30 min para a formação do gel. Por fim, as amostras de gel foram resfriada até 25 °C. As taxas de aquecimento e de resfriamento foram de 5 °C/min. A partir da formação do gel, foram conduzidas as análises de varredura de deformação para a determinação da região de viscoelasticidade linear (RVL) a uma frequência constante de 1 Hz, com a taxa de deformação variando de 0,01 a 100 %.

O teste de varredura da frequência (espectro mecânico) foi realizado após a determinação da RVL para cada amostra de gel. Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram monitorados, a uma deformação constante dentro da RVL, com frequência variando de 0,1 a 10 Hz. Os testes descritos foram realizados em triplicata para cada amostra e os dados tratados pelo programa *Rheology Advantage Data Analysis* (TA Instruments, New Castle, DE, EUA).

4.2.2.9. Análise morfológica dos géis por microscopia

Por sua vez, a etapa da avaliação dos géis por microscopia confocal a laser seguiu o protocolo descrito por Abhyankar et al. (2011) com adaptações. A avaliação foi realizada no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade de Campinas, em equipamento Carl Zeiss-ZEN (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) com objetiva de 40 e lente EC Plan-Neofluar40x/ 130 OilDICM27.

4.2.2.10. Quantificação da vitamina D₃ encapsulada nas emulsões de óleo de castanha do Brasil

A vitamina D₃ foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em condições analíticas modificadas a partir da metodologia descrita por Staffas e Nyman (2003). Foi utilizado um cromatógrafo (Prominence Modular HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japão) controlado por *software* LC Solution (Versão 1.25) e equipado com bomba de fase móvel quaternária, degaseificador online, injetor automático, compartimento de coluna termostaticado e detector por arranjo de diodos. A coluna analítica com fase estacionária de octadecilsilano (20 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e 4,6 µm de diâmetro de partícula – Shim-Pack VP-ODS, Shimadzu, Kyoto, Japão) foi mantida a 35 °C. Metanol e acetronitrila foram usados como fase móvel na proporção respectiva de 90:10 (v/v) com fluxo constante de 1,60 mL/min. Injetou-se 10 µL das amostras com detecção espectrofotométrica em 265 nm e tempo total de corrida igual a 10 minutos. A identificação foi realizada por comparação com o tempo de retenção (7,30 min) da substância padrão de vitamina D₃. A quantificação foi realizada por padronização externa a partir das áreas obtidas de análises em triplicata de 7 níveis de concentração da vitamina D₃ preparadas entre 0,5 e 15,00 µg/mL.

4.2.3. Análises Estatísticas

Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de 95% de significância, com *software* SAS 9.4 (Statistical Analysis System, Cary, NC, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DAS EMULSÕES DE ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL ESTABILIZADA COM ISOLADO PROTEICO DE SOJA

O primeiro objetivo do presente trabalho de Mestrado foi verificar a possibilidade do uso do isolado proteico de soja como emulsificante para produção das emulsões de óleo de castanha do Brasil. Inicialmente foram testados diferentes concentrações de isolado como emulsificante, juntamente com diferentes binômios de tempo e temperatura para melhoria das propriedades emulsificantes do IPS.

Em um estudo anterior do grupo de pesquisa, BRITO-OLIVEIRA (2017) caracterizou o IPS utilizado no presente estudo quanto ao ponto isoelétrico. Observou-se que o IPS sem tratamento térmico apresentou ponto isoelétrico (pI) próximo a 4; porém, quando submetido aos diferentes tratamentos térmicos, os valores de pI diminuíram um pouco, ficando entre 3,5 e 4, como observado na Figura 10.

Figura 10 Comportamento do potencial zeta das dispersões de isolado proteico de soja submetidas aos tratamentos térmicos

Fonte: BRITO-OLIVEIRA, T.C. Curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas incorporadas em géis carregados: um estudo comparativo com géis proteicos e géis biopoliméricos mistos obtidos a frio. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

A informação sobre o ponto isoeletrico é necessário pois quando o pH da dispersão proteica é o pH isoeletrico, há possibilidade de agregação das proteínas no pl, em razão da estrutura mais hidrofóbica, ser menos estável, resultante da ausência de forças repulsivas entre as moléculas .

Além do ponto isoeletrico, BRITO-OLIVEIRA (2017) analisou a solubilidade proteica. O IPS apresenta diversas propriedades funcionais que são influenciadas pela solubilidade, sendo as mais afetadas o poder emulsificante e gelificante (FENNEMA et al., 2010). A solubilidade é influenciada pelas interações hidrofóbicas (proteína-proteína) e interações iônicas (proteína-solvente).

O pH do meio também é um dos fatores extrínsecos que afeta a solubilidade proteica, sendo que em valores abaixo ou acima do pl, as proteínas apresentam carga líquida, positiva ou negativa, promovendo a repulsão eletrostática e permitindo a hidratação dos grupos carregados (FENNEMA et al., 2010). Para o IPS utilizado no presente trabalho, os valores de solubilidade proteica obtidos foram de aproximadamente 14,8% m/v para pH 3, 7,7% m/v para pH 5, aumentando com o aumento de pH obtendo solubilidade de 100% no pH 11, como apresentado na Figura 11.

Figura 11 Análise da solubilidade proteica do IPS em diferentes condições de pH.

Fonte: BRITO-OLIVEIRA, T.C. Curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas incorporadas em géis carregados: um estudo comparativo com géis proteicos e géis biopoliméricos mistos obtidos a frio. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

As amostras de emulsões produzidas foram monitoradas durante a estocagem sob refrigeração em relação ao diâmetro médio das gotas e ao índice de cremeação da dispersão. Os resultados obtidos para as emulsões produzidas com IPS tratados em diferentes binômios tempo vs temperatura estão mostrados na Figura 12:

Figura 12 Diâmetros médios, em volume, das emulsões estabilizadas com isolado proteico de soja tratado termicamente utilizando diferentes binômios de tempo e temperatura.

Fonte: Própria autoria

Os dados mostrados na Figura 12 mostram que as amostras que apresentaram menor diâmetro médio foram as produzidas com o IPS tratado na temperatura de 80 °C. Tal fato está, de acordo com os dados obtidos por Brito-Oliveira et al. (2017), que estudaram a caracterização do isolado proteico de soja não-tratado, e concluíram que um tratamento térmico de 60 °C por 30 min em pH 7 foi insuficiente para alterar as propriedades do isolado proteico a ponto de melhorar sua capacidade de emulsificação de estearina de palma. Porém, de acordo com os mesmos autores, o tratamento térmico a 80 °C por 30 min em pH 7 foi suficiente para que as alterações estruturais da proteína fossem suficientes para permitir que o IPS utilizado fosse capaz de emulsificar a fase oleosa citada. Tal fato foi observado também para a produção das emulsões com óleo de castanha do Brasil – ou seja, o fator predominante para o aumento da atividade emulsificante parece não ser o tipo de fase oleosa, mas sim o tratamento térmico ao qual o IPS foi submetido.

No entanto, apesar de claramente o aumento da temperatura ter sido um fator positivo de influência sobre a atividade emulsificante, é visível que os diâmetros médios apresentaram variações ao longo do armazenamento em todos os casos, o que levou à separação de fases. A análise de estabilidade foi realizada também obtendo-se o índice de cremeação, que quantifica a separação de fases das emulsões. Os índices de cremeação foram obtidos e medidos 10 dias de armazenagem e estão mostrados na Figura 13. Por sua vez, o aspecto visual das emulsões obtidas estão na Figura 14.

É possível observar que as emulsões preparadas com IPS tratados a 60 e 65 °C apresentaram também sedimentação. Acima de 70 °C, há dissociação da estrutura quaternária das frações 7S e 11S, desnaturando suas subunidades e promovendo formação de agregados via forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e dissulfídicas (BARAC et al., 2004). Tal fato pode resultar num aumento da capacidade emulsificante das proteínas, já que o efeito tensoativo das proteínas está ligado com a diminuição da tensão interfacial entre as fases água/óleo.

Figura 13 Índice de cremeação para as emulsões produzidas com diferentes binômios de tempo e temperatura de tratamento térmico do isolado proteico de soja.

Fonte: Própria autoria

Figura 14 Aspecto visual das emulsões preparadas com isolado proteico de soja submetido a diferentes condições de tratamento térmico.

Emulsão	Concentração IPS							
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00
60 °C x 15 min Dia 3
60 °C x 30 min Dia 3
65 °C x 15 min Dia 7
65 °C x 30 min Dia 7
70 °C x 15 min Dia 7
70 °C x 30 min Dia 7

continuação

Concentração IPS								
Emulsão	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00
75 °C x 15 min Dia 7
75 °C x 30 min Dia 7
80 °C x 15 min Dia 10
80 °C x 30 min Dia 10

Fonte: Própria autoria

É notório, diante destes resultados, que mesmo utilizando-se o IPS tratado em condições em que gotas de menores tamanhos foram obtidos (a 75 ou 80 °C, conforme gráficos da Figura 12), não foi possível manter nenhuma das emulsões de óleo de castanha do Brasil estáveis nem durante 3 dias de estocagem. Portanto, diante de todos estes resultados, verificou-se a necessidade de uma substância espessante para se obter emulsões estáveis em termos de diâmetro médio. Na continuação do estudo, portanto, goma xantana foi adicionada às emulsões e diferentes concentrações do espessante foram testadas para verificar a melhor formulação que proporcionasse estabilidade às emulsões de castanha do Brasil.

Foram eliminadas as emulsões produzidas com IPS tratado a 60 e 65 °C, bem como e as concentrações de IPS de 0,25, 0,50, 1,75 e 2,00. Tal escolha foi realizada, pois nas concentrações menores de IPS observou-se índices de cremeação mais altos, indicando que essas concentrações de proteína ou foram menos eficazes para emulsificar o óleo de castanha do Brasil (0,25 e 0,50 %), ou observou-se sedimentação (1,75 e 2,00 % IPS). De acordo com resultados anteriores (Brito-Oliveira et al., 2017), de fato, a faixa de concentração de IPS mais adequada para emulsificação da fase oleosa nas condições experimentais utilizada seria de 0,75 a 1,50% (m/v).

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE SOJA TRATADO TERMICAMENTE: MICROSCOPIA E TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA

A fim de compreender mais as dispersões de proteína que são usadas como emulsificantes, e a influência do tratamento térmico sobre as mesmas, analisou-se o tamanho médio da solução de IPS e sua distribuição, das quatro concentrações que foram escolhidas (0,75; 1,00; 1,25 e 1,50% m/v) para continuidade do estudo que foi a produção das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja e goma xantana como agente espessante.

Ao analisar o diâmetro médio, o *span* e as curvas de distribuição de tamanho de partículas percebe a presença de agregados de proteínas em todos os tratamentos térmicos, como observado também nas microscopias.

Os resultados obtidos da distribuição de tamanho de partículas das amostras submetidas a diferentes tratamentos térmicos estão mostrados na Figura 15 e os valores de tamanho médio, em volume, na Figura 16.

Figura 15 Distribuição de tamanho de partículas das amostras de IPS tratado termicamente

Fonte: Própria autoria

Ao analisar as curvas de distribuição de tamanho de partículas percebe-se que ao aumentar a temperatura do tratamento térmico nota uma tendência das curvas apresentarem dois picos (distribuição binodal).

Figura 16 Valores de tamanho médio, em volume. Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$)

Fonte: Própria autoria

Os valores de *span* estão mostrados na Tabela 5. E as microscopias na Figura 17.

Tabela 5 Valores de *span* das amostras das dispersões de isolado proteico de soja tratados termicamente.

	Concentração IPS (% m/v)			
Tratamento térmico	0,75	1,00	1,25	1,50
70 °C x 15 min	1,65 ± 0,29	1,56 ± 0,12	1,89 ± 0,26	1,62 ± 0,05
70 °C x 30 min	1,84 ± 0,20	1,51 ± 0,15	1,94 ± 0,58	2,19 ± 0,44
75 °C x 15 min	1,84 ± 0,55	1,84 ± 0,42	2,41 ± 1,08	1,90 ± 0,32
75 °C x 30 min	1,69 ± 0,49	1,69 ± 0,28	2,06 ± 0,35	1,63 ± 0,17
80 °C x 15 min	1,64 ± 0,17	1,99 ± 0,71	1,91 ± 0,14	1,71 ± 0,12
80 °C x 30 min	1,73 ± 0,17	1,70 ± 0,19	2,58 ± 0,24	1,81 ± 0,09

Fonte: Própria autoria

Figura 17 Microscopia ótica do isolado proteico de soja tratado termicamente.

(a) 0,75% m/v; (b) 1,00% m/v; (c) 1,25% m/v e (d) 1,50% m/v.

Fonte: Própria autoria

Percebe-se que com o aumento da temperatura as dispersões de isolado proteico de soja tratadas termicamente apresentaram um aumento de tamanho médio, tal aumento pode ser explicado pela agregação da globulina, principal constituinte proteico dos grãos de soja (CHEN et al., 2016; NISHINARI et al., 2014). Durante o aquecimento a globulina, β -conglucina e glicina, as proteínas desnaturam, se co-agregam, levando a agregação irreversível das proteínas através da formação de ligações de hidrogênio e dissulfeto e interações hidrofóbicas. A temperatura de desnaturação da β -conglucina e glicina, em pH neutro foi de 65 e 80 °C respectivamente (CHEN et al., 2016).

5.3. EMULSÕES DE ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL ESTABILIZADAS COM ISOLADO PROTEICO DE SOJA E GOMA XANTANA

As emulsões alimentícias muitas vezes utilizam misturas de proteínas e polissacarídeos para conferir textura e aumentar a vida de prateleira dos produtos, pois aumentam a viscosidade do meio conferindo maior estabilidade física desse produtos, apresentando melhores propriedades funcionais do que usados individualmente. No presente trabalho, além do isolado proteico de soja como emulsificante foi necessário o uso de um agente espessante. O agente espessante, a goma xantana (GX), foi utilizado para aumentar a viscosidade da fase contínua da emulsão, dificultando a movimentação das gotas da fase oleosa, sendo portanto capaz de inibir a cremação, e consequentemente, aumentando a estabilidade físico-química da emulsão.

A estabilidade das emulsões foi acompanhada ao longo do tempo de estocagem em relação à distribuição do diâmetro das gotículas e do diâmetro médio. A Figura 18 apresenta os resultados obtidos para o diâmetro médio, em volume, durante o período avaliado, a tabela completa com os resultados de diâmetro médio obtidos está apresentada no APÊNDICE A.

Figura 18 Diâmetro médio das gotas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja, utilizando diferentes concentrações de goma xantana, em volume. Concentrações de goma xantana (% m/v): (A) 0,1 %; (B) 0,2 %; (C) 0,3%.

Fonte: Própria autoria

O diâmetro médio apresentou diferença significativa para as emulsões produzidas com goma xantana 0,1% (m/v), se comparadas com as produzidas com 0,2 e 0,3% (m/v) GX. Além disso, observou-se cremação a partir do dia 7 de armazenamento para as emulsões produzidas com 0,1% (m/v) GX. Além do diâmetro médio, foram obtidos também as curvas de distribuição de tamanho em termos de volume, apresentados nas Figuras 19, 20 e 21.

Figura 19 Distribuição de tamanho de partículas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja e goma xantana 0,1 % (m/v).

Fonte: Própria autoria

Figura 20 Distribuição de tamanho de partículas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja e goma xantana 0,2 % (m/v).

Fonte: Própria autoria

Figura 21 Distribuição de tamanho de partículas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja e goma xantana 0,3 % (m/v).

Fonte: Própria autoria

Analisando-se os resultados obtidos, as emulsões escolhidas para a continuação deste trabalho de Mestrado foram as produzidas com o IPS submetido ao tratamento térmico de 75 °C por 15 min, pois na próxima etapa do presente trabalho o bioativo, vitamina D₃, seria adicionado, e a vitamina D₃ é sensível à temperatura. Portanto, é importante minimizar possíveis danos que possam ocorrer devido ao uso de altas temperaturas. Além disso, 0,2% GX foi escolhido, pois conseguimos resultados semelhantes a 0,3% GX (ou seja, é uma concentração que diminuiria o uso de matéria-prima). Finalmente, as concentrações de IPS de 1,0; 1,25 e 1,50% foram escolhidas também.

5.4. ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA D₃ NAS EMULSÕES E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

As emulsões com vitamina D₃ foram monitoradas em relação ao diâmetro médio e distribuição das gotas, índice de cremeação, quantificação da vitamina D₃ e oxidação lipídica.

5.4.1. Determinação do tamanho médio e distribuição do tamanho de gotas

A Figura 21 apresenta os resultados para o diâmetro médio, em volume, durante o período de estocagem avaliado. A legenda da figura acompanha as formulações descritas na Tabela 4 (item 4.2.1.2 da seção Material e Métodos)

Figura 22 Diâmetro médio de gota, em volume, das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja, encapsulando vitamina D₃.

Fonte: Própria autoria

O diâmetro médio de gota apresentou diferença significativa para as emulsões produzidas nos diferentes tratamentos, mas não com a diferentes concentrações de vitamina encapsulada. Os valores de *span* expressam o grau de uniformidade da distribuição das gotículas, e quanto menor o seu valor, maior a homogeneidade do diâmetro médio de gota da emulsão.

Tabela 6 Valores de span das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja encapsulando vitamina D₃.

Span				
Emulsão	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30
1: IPS 1,00% m/v	1,57±0,07 ^{BCD, a}	1,70±0,03 ^{A, a}	1,51±0,14 ^{D, a}	2,09±0,36 ^{A, a}
1A: IPS 1,00% m/v e 200 µg/mL de emulsão	1,81±0,04 ^{A, a}	1,71±0,04 ^{A, a}	2,11±0,02 ^{A, a}	1,90±0,33 ^{AB, a}
1B: IPS 1,00% m/v e 120 µg/mL de emulsão	1,67±0,01 ^{B, ab}	1,67±0,02 ^{A, ab}	1,73±0,02 ^{BC, a}	1,65±0,03 ^{AB, b}
2: IPS 1,25% m/v	1,50±0,01 ^{CDE, bc}	1,52±0,02 ^{BC, b}	1,47±0,00 ^{D, c}	1,67±0,01 ^{AB, a}
2A: IPS 1,25% m/v e 200 µg/mL de emulsão	1,62±0,03 ^{BC, b}	1,57±0,01 ^{B, b}	1,87±0,06 ^{B, a}	1,96±0,03 ^{AB, a}
2B: IPS 1,25% m/v e 120 µg/mL de emulsão	1,53±0,05 ^{CDE, b}	1,67±0,04 ^{A, b}	1,57±0,01 ^{CD, b}	1,97±0,12 ^{AB, a}
3: IPS 1,50% m/v	1,43±0,01 ^{E, c}	1,45±0,02 ^{C, bc}	1,50±0,00 ^{D, a}	1,47±0,01 ^{B, ab}
3A: IPS 1,50% m/v e 200 µg/mL de emulsão	1,50±0,00 ^{CDE, b}	1,50±0,02 ^{BC, b}	1,77±0,03 ^{B, a}	1,78±0,03 ^{AB, a}
3B: IPS 1,50% m/v e 120 µg/mL de emulsão	1,48±0,03 ^{DE, b}	1,50±0,02 ^{BC, b}	1,50±0,03 ^{D, b}	2,05±0,01 ^{AB, a}

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si

* Letras minúsculas iguais na mesma linha: valores não diferem estatisticamente entre si

Fonte: Própria autoria

5.4.2. Estabilidade da vitamina D₃ encapsulada

Para quantificação da vitamina D₃ foram testados alguns protocolos, optando-se pelo uso da espectrofotometria, fazendo-se necessário o uso da própria emulsão sem vitamina (nas três formulações) como branco para eliminar os compostos que interferem na leitura da absorbância em 265 nm.

Desta forma foi necessário construir três curva-padrão diferentes (formulação 1,2 e 3) utilizando-se as emulsões sem vitamina (APÊNDICE B).

Teoricamente, adicionou-se 200 µg/ml de emulsão nas formulações A e 120 µg/ml de emulsão nas formulações B. A concentração de vitamina D₃, ao longo de 30 dias de estocagem sob refrigeração, está apresenado na Figura 23.

Figura 23 Perfil temporal de concentração de vitamina D₃ nas emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja.

Fonte: Própria autoria

A perda inicial do bioativo foi baixa, apresentando retenção de $96,9 \pm 3,1\%$ até o dia 14 para a emulsão 1A, e de $91,3 \pm 4,2\%$ para a emulsão 1B. Mas há uma grande perda do bioativo, com retenção de $49,2 \pm 2,5\%$ e $39,1 \pm 0,3\%$ para as emulsões 1A e 1B respectivamente no dia 30. Porém nota-se que a emulsão 1A apresentou reteve o bioativo sem degradar até dia o 21, o que não foi observado nas demais emulsões.

Para as emulsões com formulação 2, a retenção $97,3 \pm 4,6\%$ para a emulsões 2A, até o dia 7, e de $72,5 \pm 1,0\%$ para 2B, porém apartir do dia 7 já foi observado perdas mais significativas de vitamina. Ao final dos 30 dias a retenção foi de 42% para ambas as emulsões.

Observou nas emulsões com formulações 3, uma maior perda do bioativo inicialmente, com $84,9 \pm 1,6$ e $81,0 \pm 3,8\%$ de retenção para as emulsão 3A e 3B respectivamente, com retenção final de 38% para ambas as emulsões.

A retenção da vitamina no sistema encapsulante proposto não foi tão eficiente após a segunda semana de análise, resultado semelhante foi observado por Diarrassouba et al. (2015), que estudaram sistema de encapsulação proteico (microesferas formadas por β -lactoglobulina e lisozimas), para proteção e possível aumento da absorção de vitamina D₃ e observaram uma perda de $95,0 \pm 2,5\%$ e $56,0 \pm 4,3\%$ de D₃ após 2 e 5 semanas respectivamente nas microesferas.

A vitamina D₃ é sensível a diversos fatores como: radiação UV, presença de oxigênio e temperatura (YOUSAF et al., 2014). Um dos fatores que pode ter contribuído para as perdas da vitamina é a metodologia de preparo das emulsões, que utiliza altas temperaturas para pré-tratamento térmico do IPS.

Outro fator para a degradação do bioativo pode ser atribuído à forma de distribuição do mesmo nas gotículas de óleo. A vitamina D₃ apresenta em sua estrutura química um gupo hidroxila (OH) que confere hidroflicidade permindo que o bioativo se localize mais perto da interface óleo-água. Nik e seus colaboradores (2011) estudaram alterações em emulsões estabilizadas por SPI durante a digestão *in vitro* e relataram que presença da vitamina D₃ na fase aquosa da emulsão sem hidrólise da gotícula de óleo. Tal fato pode ter ocorrido devido à possibilidade da vitamina estar retido nos grupos hidrofóbicos do IPS (ao invés de somente na fase oleosa da emulsão) contribuindo para menor estabilidade ao longo do tempo, pois a proteção é menor quando está incorporada na proteína e não na fase oleosa. Ou seja, provalvemelme a emulsão 1A conseguiu reter melhor o bioativo até o dia 21, pois em sua formulação continha um teor menor de proteína (1% m/v), e consequentemente menos grupos hidrofóbicos, que poderia reter a vitamina, facilitando sua degradação, porém após 30 dias o sistema proposto não foi eficiente para proteger a vitamina.

5.4.3. Avaliação da oxidação lipídica

A oxidação lipídica interfere na aceitação sensorial dos produtos alimentícios, devido ao desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis, além da formação de compostos tóxicos, afetando a segurança dos alimentos, perda do valor

nutricional e degradação das vitaminas lipossolúveis (ARAÚJO, 2004; FENNEMA et al., 2010).

A oxidação lipídica das emulsões foi monitorada medindo-se a formação dos produtos primários (índice de peróxido) e dos produtos secundários da oxidação lipídica (TBARS), demonstrados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 Índice de peróxido das amostras em mEq de oxigênio/kg óleo.

Formulação	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30
1: IPS 1,00% m/v	107 ± 5,04 ^{A, a}	107 ± 3,83 ^{A, a}	112 ± 1,09 ^{A, a}	102 ± 8,16 ^{A, a}
1A: IPS 1,00% m/v e 200 µg/mL de emulsão	37,4 ± 4,69 ^{CD, b}	38,7 ± 2,73 ^{CD, ab}	43,2 ± 8,09 ^{CD, ab}	56,1 ± 5,53 ^{B, a}
1B: IPS 1,00% m/v e 120 µg/mL de emulsão	41,8 ± 8,33 ^{CD, c}	60,2 ± 0,68 ^{BC, ab}	53,2 ± 3,66 ^{BCD, bc}	70,1 ± 0,50 ^{B, a}
2: IPS 1,25% m/v	68,0 ± 16,4 ^{ABC, b}	76,2 ± 4,27 ^{B, ab}	83,0 ± 7,13 ^{AB, ab}	105,3 ± 1,91 ^{A, ab}
2A: IPS 1,25% m/v e 200 µg/mL de emulsão	44,9 ± 8,59 ^{CD, a}	50,2 ± 5,00 ^{BCD, a}	33,2 ± 2,37 ^{CD, a}	34,1 ± 6,08 ^{C, a}
2B: IPS 1,25% m/v e 120 µg/mL de emulsão	61,3 ± 6,95 ^{CD, a}	74,4 ± 20,3 ^{B, a}	63,2 ± 6,89 ^{BC, a}	58,5 ± 9,10 ^{B, a}
3: IPS 1,50% m/v	102 ± 22,13 ^{AB, a}	106,2 ± 11,3 ^{A, a}	81,5 ± 7,31 ^{AB, a}	100,9 ± 6,06 ^{A, a}
3A: IPS 1,50% m/v e 200 µg/mL de emulsão	24,9 ± 1,91 ^{D, b}	24,9 ± 1,47 ^{D, b}	25,2 ± 2,02 ^{D, b}	33,1 ± 1,25 ^{C, a}
3B: IPS 1,50% m/v e 120 µg/mL de emulsão	63,3 ± 11,2 ^{BCD, ab}	72,8 ± 1,53 ^{B, a}	47,9 ± 24,08 ^{CD, ab}	22,1 ± 1,00 ^{C, b}

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

*Letras minúsculas iguais na mesma linha: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

Fonte: Própria autoria

Os produtos primários da oxidação lipídica são os compostos produzidos nas etapas de iniciação e propagação. O método de índice de peróxidos baseia-se na capacidade dos hidroperóxidos de oxidar compostos indicadores (Fe²⁺). Os valores de peróxidos são expressos em miliequivalentes (mEq) de oxigênio por kg

de óleo, sendo que 1 mEq é igual a 2 mmol de hidroperóxido (FENNEMA et al., 2010).

Tabela 8 Análise de TBARS (Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico) em mg MDA/kg

Formulação	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30
1: IPS 1,00% m/v	0,216 ± 0,003 ^{CD, b}	0,279 ± 0,002 ^{BC, ab}	0,279 ± 0,020 ^{C, ab}	0,307 ± 0,040 ^{DE, a}
1A: IPS 1,00% m/v e 200 µg/mL de emulsão	0,175 ± 0,008 ^{EF, b}	0,210 ± 0,013 ^{D, b}	0,306 ± 0,029 ^{BC, a}	0,292 ± 0,013 ^{E, a}
1B: IPS 1,00% m/v e 120 µg/mL de emulsão	0,148 ± 0,015 ^{F, c}	0,241 ± 0,017 ^{CD, b}	0,207 ± 0,005 ^{D, bc}	0,342 ± 0,034 ^{CDE, a}
2: IPS 1,25% m/v	0,266 ± 0,010 ^{A, b}	0,282 ± 0,007 ^{BC, ab}	0,307 ± 0,015 ^{BC, ab}	0,318 ± 0,019 ^{DE, a}
2A: IPS 1,25% m/v e 200 µg/mL de emulsão	0,171 ± 0,007 ^{EF, c}	0,292 ± 0,007 ^{B, b}	0,310 ± 0,013 ^{BC, b}	0,339 ± 0,007 ^{CDE, a}
2B: IPS 1,25% m/v e 120 µg/mL de emulsão	0,189 ± 0,003 ^{DE, c}	0,279 ± 0,033 ^{BC, b}	0,264 ± 0,007 ^{CD, b}	0,399 ± 0,012 ^{BC, a}
3: IPS 1,50% m/v	0,269 ± 0,005 ^{A, b}	0,380 ± 0,005 ^{A, a}	0,369 ± 0,031 ^{B, a}	0,381 ± 0,005 ^{BCD, a}
3A: IPS 1,50% m/v e 200 µg/mL de emulsão	0,230 ± 0,006 ^{BC, d}	0,312 ± 0,007 ^{B, c}	0,364 ± 0,026 ^{B, b}	0,427 ± 0,011 ^{B, a}
3B: IPS 1,50% m/v e 120 µg/mL de emulsão	0,251 ± 0,014 ^{AB, d}	0,326 ± 0,005 ^{B, c}	0,442 ± 0,004 ^{A, b}	0,503 ± 0,023 ^{A, a}

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

*Letras minúsculas iguais na mesma linha: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

Fonte: Própria autoria

Os produtos secundários da oxidação lipídica são os compostos da decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos por reações de β -clivagem. A análise de TBA baseia-se na reação entre TBA e carbonilas que formam adutos fluorescentes vermelho sob condições ácidas (FENNEMA et al., 2010). O produto detectado pelo TBA é o malondialdeído (MDA).

Ao longo dos 30 dias de análises, as amostras foram armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz. Observa-se que as amostras com vitamina D₃

apresentaram valores inferiores do que as amostras controle sem vitamina D₃. Mas não foi observado alteração de cor e odor das amostras durante o período.

A vitamina D₃ provavelmente atuou como agente pró-oxidante nas emulsões resultando em uma menor oxidação lipídica nas emulsões, mas, conseqüentemente houve degradação da vitamina D₃ como observando na quantificação ao longo do tempo de estocagem (Figura 22).

5.4.4. Microscopia ótica de fluorescência

A Figura 23 apresenta as micrografias óticas de fluorescência das diferentes emulsões (1, 2 e 3) produzidas.

Nas imagens do microscópio ótico de fluorescência, a fase oleosa (óleo de castanha do Brasil) está corada em vermelho, e a fase contínua (IPS) esta corada em verde. Pode-se observar que as emulsões possuem diferentes tamanhos de gotículas, e distribuição heterogênea. Não foi observando nenhuma diferença entre as três formulações, o que foi reforçado pela análise de tamanho também (Figura 21).

Figura 24 Micrografias ótica de fluorescências. Fase oleosa corada com corante Red Nile e imagem do microscópio ótico. Barra de escala = 100µm.

Fonte: Própria autoria

Com base nos dados obtidos na caracterização físico-química das emulsões de óleo de castanha estabilizadas com IPS, optou-se por continuar o estudo de Mestrado com a emulsão 1A (tratamento térmico de 75 °C por 15 min, concentração de IPS de 1,00% m/v, e 200 µg de vitamina/ml de emulsão) pois apresentou maior retenção da vitamina e valores inferiores de oxidação lipídica (índice de peróxido e TBARS).

5.5. PRODUÇÃO DOS GÉIS DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA

5.5.1. Mínima concentração de gelificação (MCG)

Para a determinação das melhores condições para a produção dos géis de IPS, diferentes concentrações de proteína foram testadas e a avaliação visual é visualizada na Figura 25.

Figura 25 Avaliação visual das dispersões/géis de IPS obtidos com diferentes concentrações de proteína (IPS), após 24 horas de produção, para determinação da mínima concentração de gelificação (MCG).

Fonte: Própria autoria

Os resultados obtidos demonstraram que concentrações de proteína de 5,0; 7,5; e 9,0% (m/v) não foram suficientes para produzir um gel sustentável, sendo, portanto, considerada a concentração de 10% (m/v) como a MCG (mínima concentração de gelificação).

Os géis foram produzidos em pH 7 devido ao fato de a solubilidade desta matéria-prima em condições mais ácidas ser muito baixa (menor que 30%). Tal fato poderia atrapalhar significativamente a gelificação do IPS. Além disso, a produção dos géis em pH neutro poderia se justificar pela criação de um protótipo de um alimento.

Portanto para a próxima etapa, estudo da solubilidade do IPS, optou-se pelas concentrações de 10 a 15% (m/v).

5.5.2. Determinação das condições do processamento pré-gelificação dos géis de IPS: avaliação da solubilidade proteica, tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas

A fim de determinar as melhores condições do processamento, através da agitação mecânica na pré-gelificação, foi avaliada a solubilidade proteica das dispersões de IPS após este processo, e os resultados estão mostrados na Figura 26.

Figura 26 Solubilidade das dispersões de isolado proteico de soja de 10 a 15g IPS/100 g de dispersão.

Fonte: Própria autoria

Para todas as concentrações de IPS, é fácil perceber que o pré-tratamento de 10 min foi insuficiente para aumentar a solubilidade comparada aos demais tempos de agitação, para uma mesma concentração proteica. Para melhor compreensão da influência do pré-tratamento na solubilidade, foi analisado o tamanho médio e distribuição de partículas para as amostras de 11, 13 e 15 g IPS/100g, e os dados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 27, 28 e 29.

Figura 27 Solubilidade das dispersões de isolado proteico de soja de 11, 13 e 15g IPS/100 g de dispersão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria

Ao comparar os valores de solubilidade para cada concentração de proteína testada, os maiores valores de solubilidade foram obtidos para as amostras tratadas por agitação mecânica a 800 rpm por 30 min. Os menores valores foram os obtidos quando se usou hidratação manual, bem como intensidade e agitação de 400 rpm em todos os tempos de processo. Juntamente com a solubilidade, foi analisada a influência da agitação mecânica sob o tamanho dos agregados proteicos, e fica claro a influência positiva da agitação mecânica independente do tempo e rotação quando comparada à hidratação manual da dispersão de IPS.

Figura 28 Tamanho médio, em volume, de agregados nas dispersões de proteínas de 11, 13 e 15g IPS/100 g de dispersão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria

Figura 29 Distribuição de tamanho de partículas das amostras de dispersões de isolado proteico de soja: (A) 11g IPS/100 g; (B) 13g IPS/100 g e (C) 15g IPS/100 g.

Fonte: Própria autoria

Ao se analisar os resultados obtidos nos ensaios de agitação mecânica realizados (velocidade de rotação e tempo) - solubilidade e tamanho médio dos agregados proteicos - pode-se observar que:

- (i) O uso da agitação mecânica diminuiu a polidispersidade dos agregados proteicos formados, fato visível ao se comparar as curvas de distribuição de tamanho apresentadas na Figura 29.
- (ii) Aparentemente, as curvas distribuição de tamanho foram se tornando menos polidispersas com o aumento da concentração de proteína, fato também observado pela Figura 29. Portanto, houve uma tendência de diminuição do diâmetro médio destes agregados proteicos com o aumento da concentração. Tal fato se refletiu no aumento da solubilidade, pois a diminuição do tamanho médio dos agregados fez com que se localizassem no sobrenadante após o protocolo de centrifugação descrito no item 4.2.2.2.
- (iii) A tendência de aumento da solubilidade com a concentração pode ser também entendida pelo aumento da quantidade de aglomerados na porção considerada como “solúvel” de acordo com o protocolo do item 4.2.2.2. Quanto mais proteína no sistema, pode ter havido uma maior taxa de formação de pequenos agregados, que foi maior à taxa de precipitação das proteínas da soja, causando o efeito percebido no estudo da solubilidade.

Sendo assim, de acordo com os resultados de solubilidade obtidos, escolheu-se os tratamentos de 800 rpm por 20 e 30 min para a produção dos géis, e analisar se haveria, e qual seria, a influência da agitação mecânica em função do tempo no aumento da solubilidade do IPS sobre as propriedades reológicas, mecânicas e da microestrutura dos géis.

5.5.3. Caracterização dos géis de isolado proteico de soja não carregados e carregados

As concentrações proteicas de 11, 13 e 15 g/ 100 g foram escolhidas para a produção dos géis. As dispersões de IPS foram inicialmente pré-tratadas por agitação mecânica a 800 rpm por 20 e 30 min, por apresentar maior solubilidade, e menores

tamanho do IPS. Nos géis carregados com emulsão, a fase aquosa das dispersões proteicas foi substituída pela emulsão de castanha do Brasil estabilizada com isolado proteico de soja. Dezoito formulações de géis foram analisados, descritas na Tabela 9.

Tabela 9 Formulações empregadas para produção dos géis de isolado proteico de soja não-carregados e carregados.

Géis não-carregados	Géis carregados	IPS (g/100g)	Pré-tratamento
G1	G10	11	Hidratação manual
G2	G11	13	Hidratação manual
G3	G12	15	Hidratação manual
G4	G13	11	800 rpm por 20 min
G5	G14	13	800 rpm por 20 min
G6	G15	15	800 rpm por 20 min
G7	G16	11	800 rpm por 30 min
G8	G17	13	800 rpm por 30 min
G9	G18	15	800 rpm por 30 min

Fonte: Própria autoria

O aspecto visual dos géis não-carregados podem ser visualizados na Figura 30 e os géis carregados na Figura 31.

Figura 30 Aspecto visual das amostras dos géis de isolado proteico se soja não-carregados.

Fonte: Própria autoria

Figura 31 Aspecto visual das amostras dos géis carregados de isolado proteico de soja.

Fonte: Própria autoria

De acordo com as Figuras 30 e 31, é visível que todos os géis se mostraram sustentáveis fortes (BRITO-OLIVEIRA, 2017). Além disso, aparentemente, os géis carregados se mostraram, ao menos macroscopicamente, mais homogêneos que os não-carregados, especialmente para 11 e 13 g IPS/100 g. Os géis produzidos com o

IPS pré-tratado por agitação mecânica também se mostraram visualmente mais homogêneos

5.5.4. Microestrutura dos géis

As imagens de microscopia confocal foram utilizadas para auxiliar na caracterização da microestrutura dos géis de IPS, e estão apresentadas nas Figuras 32 e 33, respectivamente.

Figura 32 Morfologia dos géis não-carregados de isolado proteico de soja visualizada por microscopia de varredura confocal a laser.

Fonte: Própria autoria

Figura 33 Morfologia dos géis carregados de isolado proteico de soja visualizada por microscopia de varredura confocal a laser.

Fonte: Própria autoria

Os géis de IPS formaram estruturas que não parecem formar uma rede aparente, mas sim uma estrutura densa, como um aglomerado de microgéis. É possível visualizar que estes microgéis são formados por agregados proteicos menores das proteínas do IPS. É possível também distinguir estruturas capsulares (indicadas pelas setas), que podem ter sido formadas pela glicinina. Chen et al. (2017) identificaram a formação de estruturas capsulares em condições específicas de pH e concentração de NaCl, similares às usadas no presente estudo.

Também é importante perceber, a partir das micrografias obtidas, que a microestrutura (na escala em que pode ser observada pela microscopia confocal de

varredura a laser) não se alterou significativamente com a alteração da solubilidade, tanto nos géis não-carregados quanto carregados.

A incorporação da emulsão ao gel pode ser vista nas micrografias da Figura 33. É evidente que as gotas de emulsão se localizaram preferencialmente nos poros do gel, aparentemente interagindo tanto com a matriz proteica quanto entre si. Em algumas micrografias (G15, G16, p. ex.) é possível visualizar as gotas como se formassem uma rede entre si. O fortalecimento dos géis carregados em relação aos não-carregados, demonstrado pelos resultados de compressão uniaxial e de ensaios reológicos de pequena deformação, confirmarão adiante essa percepção da microestrutura mostrada pelas micrografias.

5.5.5. Capacidade de retenção de água (CRA)

As capacidades de retenção de água (CRA) dos géis não-carregados e carregados estão apresentadas nas Figuras 34 e 35, respectivamente.

Figura 34 Capacidade de retenção de água dos géis de isolado proteico de soja não-carregados.

Fonte: Própria autoria

Figura 35 Capacidade de retenção de água dos géis de isolado proteico de soja carregados.

Fonte: Própria autoria

Percebe-se que os géis carregados apresentaram maiores valores de capacidade de retenção de água comparado aos géis não-carregados. Além disso, o tratamento de 800 rpm por 30 min para todas as concentrações apresentou menores valores de CRA entre os tratamentos estudados. Tal fato faz sentido ao se observar as micrografias nas Figuras 34 e 35. A porosidade dos géis não-carregados é perceptivelmente maior, o que pode ter levado à saída mais fácil da água da estrutura gelificada que no caso dos géis carregados.

5.5.6. Caracterização mecânica dos géis

Os ensaios de compressão uniaxial permitem caracterizar géis proteicos carregados e não-carregados quanto a elasticidade (módulo de Young) e sensibilidade a ruptura (tensão e deformação de ruptura). Os resultados dos testes de compressão uniaxial para as formulações de géis carregados e não-carregados produzidos neste estudo estão apresentados na Figura 36.

Figura 36 Dados obtidos através dos ensaios de compressão uniaxial dos géis de isolado proteico de soja não-carregados e carregados. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria

Verificou-se que de modo geral, os géis carregados apresentaram maiores valores de módulo de Young (E) comparado aos géis não-carregados com emulsão. Esses resultados indicam que a substituição da fase aquosa por emulsão aumentou a elasticidades dos géis submetidos a grandes deformações, provavelmente devido à atuação das gotas como uma rede dentro da estrutura. A formação desta “rede de gotas” pode ter sido no sentido de tornar o gel mais elástico, pois funcionaria como um “amortecimento” quando o gel estivesse sob compressão. Tal fato pode ser colaborado definitivamente para o aumento do módulo de Young, bem como aumento na tensão de ruptura (σ_{rup}) dos géis carregados em relação aos géis não-carregados.

Diversos estudos envolvendo géis carregados subdividem as gotas ou partículas como ativas ou inativas a partir da caracterização mecânica dos sistemas (compressão uniaxial) (Sala et al., 2007; Sala et al., 2009a). As gotas de emulsão nos géis carregados ligadas mecanicamente à rede do gel são consideradas ativas; caso contrário, quando não estão ligadas mecanicamente a rede, são consideradas partículas inativas (Sala et al., 2007; Sala et al., 2009a).

As partículas inativas tem pouca afinidade química (ou física) pelas cadeias biopoliméricas que formam a matriz de gel, levando uma diminuição da rigidez do gel (E), um aumento ou diminuição na deformação de ruptura (ϵ_{rup}) e uma diminuição na tensão de ruptura (σ_{rup}) dos géis. A incorporação de partículas ativas leva a um aumento ou diminuição no valor de E , porém sempre aumenta a tensão de ruptura (σ_{rup}) (Sala et al., 2007; Sala et al., 2009a).

No presente trabalho, os resultados mostraram que a incorporação da emulsão de óleo de castanha estabilizada com IPS resultou em um aumento nos valores de E e da σ_{rup} para todos os sistemas analisados, embora para os géis formulados com a menor concentração de proteína o aumento não tenha sido estatisticamente significativo.

Tal comportamento indica que as gotas da emulsão de óleo de castanha estabilizada com IPS, produzidas no presente estudo, agiram como partículas ativas nos géis carregados.

A adição de partículas ativas aos géis geralmente reduz os valores de ϵ_{rup} , mas não foi observado diferença estatisticamente significativa em tais valores no presente trabalho.

Em relação à influência da solubilidade do IPS avaliada no item 5.5.2, não é possível distinguir uma tendência clara de variação das propriedades mecânicas obtidas pelos ensaios de compressão uniaxial com o aumento da solubilidade, nem para os géis não-carregados nem para os géis carregados. Uma das possíveis causas para este comportamento é que o aumento de solubilidade conseguido pelo pré-processamento do IPS por agitação mecânica não tenha sido suficiente para, após a gelificação, mudar significativamente a microestrutura da rede. É possível observar nas Figuras 32 e 33 (micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser) que não há, de fato, nenhuma mudança significativa na estruturação proteica.

A única observação que se pode fazer é que os géis com 11 %IPS são ligeiramente mais porosos, mas tal fato se deve à concentração proteica mais baixa. A microestruturação de todos os géis é bastante parecida, consistindo na aglomeração desordenada dos microgeis descritos no item 5.5.4. Os parâmetros dos ensaios de compressão uniaxial (E , σ_{rup} e ϵ_{rup}), devido à escala em que este tipo de experimento é realizado, provavelmente possuem como maior influência esse arranjo dos microgeis. Como o arranjo microestrutural visualizado não se alterou significativamente para cada concentração proteica, independentemente da intensidade de agitação utilizada na etapa de pré-processamento do IPS, os valores destes parâmetros também não alteraram de forma significativa do ponto de vista estatístico.

5.5.7. Caracterização reológica dos géis por ensaios oscilatórios de baixa deformação

Inicialmente, para a determinação da região de viscoelasticidade linear (RLV) das diferentes amostras, testes de varredura de deformação foram conduzidos, e os resultados obtidos estão disponíveis no APÊNDICE C. A partir de tais dados, a deformação de 0,5 % foi selecionada para a realização dos testes de varredura de frequência.

Nas Figuras 37 e 38 pode-se observar os dados obtidos nos testes de varredura de frequência dos géis não-carregados e carregados, respectivamente. As Tabelas 12 e 13 mostram os valores dos parâmetros do modelo da Lei de Potência ajustado para todos os géis produzidos.

Figura 37 Resultados dos testes de varredura de frequência para os géis de isolado proteico de soja não-carregados: (A) hidratação manual; (B) 800 rpm por 20 min e (C) 800 rpm por 30 min.

Fonte: Própria autoria

Figura 38 Resultados dos testes de varredura de frequência para os géis de isolado proteico de soja carregados: (A) hidratação manual; (B) 800 rpm por 20 min e (C) 800 rpm por 30 min.

Fonte: Própria autoria

Tabela 10 Parâmetros das equações tipo lei de potência dos géis de isolado proteico de soja não-carregados. (G1, G2 e G3: hidratação manual; G4, G5 e G6: 800 rpm por 20 min; G7, G8 e G9: 800 rpm por 30 min e nas concentrações de 11, 13 e 15 % m/v respectivamente)

Gel	$G' = K' \cdot \omega^{n'}$			$G'' = K'' \cdot \omega^{n''}$		
	K'	n'	R ²	K''	n''	R ²
G1	570 ^{CD} ±139	0,08 ^{BC} ±0,02	0,969	119 ^{CD} ±25,6	0,11 ^A ±0,03	0,947
G2	1643 ^A ±323	0,08 ^{BC} ±0,02	0,996	284 ^A ±58,9	0,10 ^A ±0,03	0,907
G3	827 ^{BC} ±75,3	0,038 ^D ±0,01	0,908	244 ^{ABC} ±110	0,09 ^A ±0,01	0,943
G4	469 ^{CD} ±270	0,09 ^{AB} ±0,004	0,999	81,6 ^D ±42,5	0,14 ^A ±0,02	0,985
G5	273 ^D ±0,00	0,06 ^C ±0,00	0,996	45,4 ^D ±0,00	0,12 ^A ±0,00	0,991
G6	685 ^{CD} ±84,1	0,09 ^{BC} ±0,00	0,999	123 ^{BCD} ±17,0	0,14 ^A ±0,02	0,973
G7	573 ^{CD} ±42,4	0,10 ^{AB} ±0,00	0,999	104 ^D ±10,6	0,13 ^A ±0,01	0,986
G8	1259 ^{AB} ±0,00	0,11 ^A ±0,00	0,999	254 ^{AB} ±0,00	0,14 ^A ±0,00	0,992
G9	1519 ^A ±0,00	0,09 ^{AB} ±0,00	0,999	266 ^A ±0,00	0,11 ^A ±0,00	0,984

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

Tabela 11 Parâmetros das equações tipo lei de potência dos géis de isolado proteico de soja carregados. (G10, G11 e G12: hidratação manual; G13, G14 e G15: 800 rpm por 20 min; G16, G17 e G18: 800 rpm por 30 min e nas concentrações de 11, 13 e 15 % m/v respectivamente)

Gel	$G' = K' \cdot \omega^{n'}$			$G'' = K'' \cdot \omega^{n''}$		
	K'	n'	R ²	K''	n''	R ²
G10	882 ^{CD} ±1,96	0,13 ^A ±0,01	0,986	308 ^{DE} ±3,43	0,14 ^{BC} ±0,00	0,976
G11	573 ^D ±54,0	0,11 ^A ±0,03	0,981	227 ^{DE} ±67,2	0,14 ^{ABC} ±0,00	0,973
G12	1726 ^{AB} ±203	0,12 ^A ±0,00	0,998	660 ^A ±33,1	0,13 ^{BC} ±0,00	0,979
G13	755 ^{CD} ±140	0,12 ^A ±0,03	0,999	253 ^{DE} ±27,4	0,16 ^A ±0,00	0,987
G14	1071 ^{CD} ±0,00	0,12 ^A ±0,00	0,997	423 ^{BCD} ±0,00	0,13 ^{BC} ±0,00	0,979
G15	1879 ^A ±242	0,11 ^A ±0,01	0,998	620 ^{AB} ±3,40	0,14 ^{ABC} ±0,01	0,988
G16	653 ^D ±0,00	0,11 ^A ±0,00	0,999	208 ^E ±0,00	0,15 ^A ±0,00	0,989
G17	1002 ^{CD} ±378	0,11 ^A ±0,00	0,998	343 ^{CDE} ±124	0,14 ^{ABC} ±0,01	0,983
G18	1262 ^{BC} ±175	0,14 ^A ±0,01	0,997	530 ^{ABC} ±105	0,15 ^{AB} ±0,01	0,986

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

Tanto para os géis não-carregados quanto para os géis carregados, os dados de K' são muito maiores que os valores de K'', indicando um comportamento viscoelástico de géis fortes, levando a valores de $G' \gg G''$, conforme pode ser visto nas curvas das Figuras 37 e 38. Há também uma baixa dependência desses valores

com a frequência, uma vez que os valores de n' e n'' são bem baixos (de 0,0045 a 0,1123).

No caso dos géis não-carregados, em relação à comparação do comportamento reológico para diferentes concentrações proteicas, na mesma condição de mistura, neste tipo de ensaio, observa-se que para a hidratação manual não há uma tendência clara de variação dos parâmetros da lei da potência. Tal fato pode ser devido à falta de reprodutibilidade do processo de solubilização das proteínas do IPS quando submetidas à hidratação manual, que é por um tempo curto e em condições de mistura não-reprodutíveis, a princípio, para uma matéria-prima altamente insolúvel como o IPS.

Na verdade só há uma tendência clara (aumento) para os valores dos parâmetros reológicos obtidos pela Lei da Potência para os geis produzidos com IPS tratado por 30 min, a 800 rpm. É importante dizer que, macroscopicamente, houve uma diferença significativa ao final do processo entre o IPS agitado por 20 e 30 min. A dispersão de IPS se mostrou muito mais viscosa ao final de 30 min de agitação, e tal fato pode ter contribuído para a formação de um gel mais forte durante o aquecimento, uma vez que a rede proteica pode ter começado já a se formar mais efetivamente durante a agitação mecânica.

No caso dos géis carregados, tanto para 20 quanto para 30 min de agitação mecânica a 800 rpm pode-se distinguir um aumento da força do gel com o aumento da concentração proteica, conforme esperado.

5.5.8. Estabilidade da vitamina D₃ encapsulada nos géis proteicos

A estabilidade da vitamina D₃ durante o período de armazenamento das amostras de géis sob refrigeração está apresentada na Figura 39. Teoricamente, adicionou-se 178, 174 e 170 µg D₃/g gel para os géis com 11, 13 e 15 g IPS/100 g gel respectivamente.

A vitamina D₃ se mostrou estável durante todo o período avaliado para a maioria das amostras (exceto para as amostras produzidas com 13 e 15 g/100g de proteína com o hidratação manual no pré-tratamento e 11 g/100 g de IPS com o pré-tratamento de 800 rpm por 20 min). Além disso, após 30 dias a amostra que apresentou maior retenção de vitamina D₃ foi a de 15 g IPS/100 g gel produzida com o pré-tratamento de 800 rpm por 30 min (G18).

Observa-se também que foram obtidos valores superiores de retenção de vitamina D₃ nos géis em comparação à emulsão, em que a retenção máxima foi de 49% e para o gel G18 a retenção foi de 73%.

Figura 39 Perfil temporal de concentração de vitamina D₃ nos géis. Valores teóricos: 178, 174 e 170 µg D₃/g gel para os géis com 11, 13 e 15 g IPS/100 g gel respectivamente. Tratamentos com médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ao longo dos dias. Médias seguidas com a mesma letra maiúsculas não se diferem entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria

A indústria de alimentos está cada vez mais desenvolvendo alimentos enriquecidos com vitamina D, e na maioria dos produtos a forma de adição da vitamina é a vitamina D₃, mesmo que na maior parte das vezes os rótulos não especifiquem (Yetley, 2008). Além disso, geralmente os rótulos subestimam a quantidade real de vitamina D, pois deve refletir a quantidade mínima de vitamina no produto durante toda a vida útil. Isso se deve ao fato de que a vitamina D₃ é altamente reativa, sendo facilmente degradada pela luz e por agentes oxidantes presentes no meio (DIARRASSOUBA et al., 2015; YETLEY, 2008).

Com esse raciocínio, foi calculado o teor de vitamina D₃ nos géis ao final de 30 dias de armazenagem, e que podem ser visualizados na Tabela 14.

Tabela 12 Concentração de vitamina D₃ nos géis de isolado proteico de soja carregados, após 30 dias de armazenamento sob refrigeração

Gel	Valor teórico de vitamina D₃ (µg D₃/g gel)	Vitamina D₃ após 30 dias (µg D₃/g gel)	Vitamina D₃ após 30 dias (UI D₃/g gel)
G10	178	87,6	3504
G11	174	60,2	2409
G12	170	116	4626
G13	178	98,8	3953
G14	174	114	4558
G15	170	83,7	3350
G16	178	126	5026
G17	174	121	4858
G18	170	124	4974

Fonte: Própria autoria

De acordo com as diretrizes mais recentes, a dose diária recomendada de vitamina D é de 600 UI para indivíduos de 1 a 70 anos e 800 UI para acima de 70 anos (GOLFOMITSOU et al., 2018).

Dessa forma, pode-se dizer que o consumo de um produto alimentício baseado na matriz proteica desenvolvida neste Mestrado seria eficiente, a princípio, para suprir as necessidades de vitamina D₃. Além disso, estudos clínicos comprovaram que o consumo de proteína de soja (isoflavona e fitoestrógeno) reduz o risco de doença coronariana, risco de aterosclerose e o risco de câncer de mama e osteoporose, com aprovação da FDA para alegação de saúde (ANJO, 2004; LEGAULT et al., 2004).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nessa Dissertação de Mestrado foi possível chegar às seguintes conclusões:

- (i) Foi possível produzir as emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja, e encapsular vitamina D₃. Porém foi necessário o uso de estabilizante, goma xantana, para melhorar a estabilidade físico-química das emulsões. A emulsão com 1,0 (%m/v) de IPS, e 0,2 (%m/v) de goma xantana se manteve estável fisicamente por 30 dias e apresentou retenção do bioativo de $49,2 \pm 2,5\%$ ao longo do armazenamento;
- (ii) A concentração mínima de 10 g/100 g gel de IPS foi necessária para se produzir géis sustentáveis;
- (iii) O uso da agitação mecânica aumentou a solubilidade do isolado proteico de soja comercial, e a intensidade e o tempo de agitação foram parâmetros operacionais importantes para esse assunto;
- (iv) Foi possível produzir géis proteicos não-carregados e carregados com a substituição total da fase aquosa pela emulsão de óleo de castanha do Brasil;
- (v) As propriedades mecânicas dos géis foram influenciadas pela presença da emulsão, apresentando características de partículas ativas. Além disso, não foi possível distinguir uma tendência clara na influência da solubilidade do IPS em tais propriedades;
- (vi) Os resultados dos ensaios reológicos de baixa deformação revelaram que apenas os géis não-carregados produzidos com IPS tratado por 30 min, a 800 rpm apresentaram uma tendência de aumento dos valores dos parâmetros reológicos. Já para os géis carregados, hidratação do IPS por 800 rpm foi efetivo para aumentar a força do gel com o aumento da concentração proteica;
- (vii) Os géis carregados apresentaram maior retenção do bioativo comparado à emulsão, ao longo do período de armazenamento.

Assim, pode-se concluir que foi possível produzir géis veiculadores de vitamina D₃, produzidos a quente com isolado proteico de soja, carregados com emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja como tensoativo, que foram capazes de preservar o micronutriente veiculado por um tempo de armazenagem significativo para futuros alimentos que possam ser produzidos a partir dessa matriz proteica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHYANKAR, A. R.; MULVIHILL, D. M.; AUTY, M. A. E. Combined microscopic and dynamic rheological methods for studying the structural breakdown properties of whey protein gels and emulsion filled gels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 275–282, 2011.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780–788, 2008.

ALTING, A.C. et al. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 17, p.469-479, 2003.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145–154, 2004.

ANVISA, Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 3ª ed. Viçosa: UFV, 2004.

BAEKE, f.; et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 482-496, 2010.

BAIER, S.K.; McCLEMENTS, D.J. Influence of cosolvent systems on the gelation mechanism of globular protein: thermodynamic, kinetic, and structural aspects of globular protein gelation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 3, p. 43-54, 2005.

BARAC, M. B. et al. Soy protein modification - a review. **APTEFF**, v. 280, n. 35, p. 3–16, 2004.

BRASIL. Decreto nº 51.209, de 18 de Agosto de 1961. Aprova as novas especificações para classificação e fiscalização da exportação da “Castanha do Brasil”.

BRITO-OLIVEIRA, T.C. Curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas incorporadas em géis carregados: um estudo comparativo com géis proteicos e géis biopoliméricos mistos obtidos a frio. 2017. 209 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

BRITO-OLIVEIRA, T.C. et al. Encapsulation of beta-carotene in lipid microparticles stabilized with hydrolyzed soy protein isolate: production parameters , alpha-tocopherol coencapsulation and stability under stress conditions. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 659–669, 2017.

BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. A importância do consumo dietético de cálcio e vitamina D no crescimento. **J. Pediatria**. Porto Alegre, v. 84, 2008.

Castanha do Brasil: benefícios e cuidados. Disponível em: <www.saboravida.com.br/gastronomia/2017/04/23/castanha-do-brasil-beneficios-e-cuidados/>. Acesso em: 10 de junho de 2018.

CHAVES, M. A. Coencapsulação de curcumina e vitamina D3 em lipossomas multilamelares. 2017. 112p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

CHEN, N. et al. Exploiting salt induced microphase separation to form soy protein microcapsules or microgels in aqueous solution. **Biomacromolecules**, v. 18, p. 2064–2072, 2017.

CHEN, N. et al. Thermal aggregation and gelation of soy globulin at neutral pH. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 740–746, 2016.

CLARK, A.; ROSS-MURPHY, S.B. Modern biopolymer science. In: KAPASIS, S.; NORTON, I. T.; UBBINK, J.B. Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application. London: Academic Press, 2009. p. 27.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap 5., p 180-260.

DIARRASSOUBA, F. et al. Food protein-based microspheres for increased uptake of vitamin D 3. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1066–1072, 2015.

DICKINSON, E. Food Emulsion and foams: Stabilization by particles. Current Opinion in **Colloid & Interface Science**, v. 15, p. 40-49, 2010.

DICKINSON, E. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. **Food Biophysics**. p. 1 – 11, 2011.

DICKINSON, E. Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein - stabilized oil droplets. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 224-241, 2012.

eCycle. Os diversos benefícios do óleo de castanha-do-pará para a sua saúde e beleza. Disponível em: < <https://www.ecycle.com.br/component/content/article/67-dia-a-dia/2873-oleo-vegetal-castanha-para-brasil-que-e-para-serve-onde-compra-encontra-puro-beneficios-corpo-cabelo-pele-composicao-propriedades-hidratacao-cosmetico-aplicacao-tratamento-beleza-fazer-sabao-risco-contaminacao-quimica-nociva-descarte.html> >. Acesso em: 14 de junho de 2018.

FENEMMA, OR; OWEN, R .; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fenemma**. São Paulo: Artmed , 2010.

GARCÍA, M. C. et al. Composition and characterization of soyabean and related products. **Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 361–391, 1997.

GASPARINI, B. C. Microencapsulação de vitamina D₃ em matriz de proteína isolada de soro de leite. 2016. Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

GAVA, A.J. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2009.

GEREMIAS-ANDRADE, I.M. Produção, caracterização e avaliação da digestibilidade in vitro de géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas. 2017.

193 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

GEREMIAS-ANDRADE, I. M. et al. Rheological and mechanical characterization of curcumin-loaded emulsion- filled gels produced with whey protein isolate and xanthan gum. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 166–173, 2017.

GEREMIAS-ANDRADE, I. M. et al. Review: Rheological of Emulsion-Filled Gels Applied to the Development of Food Materials. **Gels**, Based, v. 2, p. 6, 2016.

GOLFOMITSOU, I. et al. Development of food grade O / W nanoemulsions as carriers of vitamin D for the fortification of emulsion-based food matrices: a structural and activity study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 268, p. 734–742, 2018.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 362-371, 2004.

JAFARI, S. M. et al. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1191–1202, 2008.

JAHNKE, D.I.S. The theory of high-pressure homogenization. In: Müller, R.H., Benita, S., Böhn, B. (Eds). *Emulsions and Nanosuspensions for Formulation of Poorly Soluble Drugs*. **Medpharm Scientific Publishers**, Stuttgart, pp. 177-200, 1998.

JARDINE, J. G.; BARROS, T. D. Soja. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3vtDI7vi.html>>. Acesso em: 12 de junho de 2018.

JORGE, A. J. L., et al. Deficiência da vitamina D e doenças cardiovasculares. **International Journal of Cardiovascular Science**, p. 422 – 432, 2018.

JOSE, J.; POUVREAU, L.; MARTIN, A.H. Mixing whey and soy proteins: Consequences for the gel mechanical response and water holding. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 216–224, 2016.

JUDD, S. E., et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: A pilot feasibility study. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, p. 445-447, 2010.

LEE, S. J. et al. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions : comparison of physicochemical stability, lipid oxidation and lipase digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 415–427, 2011.

LEGAULT, L. et al. Food Label and Package Survey: An Update on Prevalence of Nutrition Labeling and Claims on Processed, Packaged Foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 6, p. 952–958, 2004.

LIU, K. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. New York: Chapman and Hall, 1997. Disponível em: <books.google.com.br>. Acesso em: 11 de junho de 2018.

MAIHARA, V. R. et al. Avaliação nutricional de dietas de trabalhadores em relação a proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras alimentares e vitaminas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 672-677, 2006.

MASON, T. G. et al. Nanoemulsions : formation , structure , and physical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 18, p. 635–666, 2006.

MCCARTHY, N. A. et al. Dissolution of milk protein concentrate (MPC) powders by ultrasonication. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 142–148, 2014.

McCLEMENTS, D.J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.

McCLEMENTS, D. J. **Food Emulsion: Principles, practices and techniques**. 2nd Ed., Washington, D.C.: CRC Press, 2005.

MORRISON, I. D; ROSS, S. **Colloidal dispersions – Suspensions, Emulsions and Foams**. New York: John Wiley & Sons, 2002.

Nachay, K. (2017). How consumers think about protein. **Food Science and Technology (IFT)**, 7, 54-55.

NIK, Amir Malaki; CORREDIG, Milena; WRIGHT, Amanda J. Release of lipophilic molecules during in vitro digestion of soy protein-stabilized emulsions. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. S278-S289, 2011.

NISHINARI, K. et al. Food Hydrocolloids Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 301–318, 2014.

OLIVER, L.; SCHOLTEN, E.; VAN AKEN, G. A. Effect of fat hardness on large deformation rheology of emulsion-filled gels. **Food hydrocolloids**, v. 43, p. 299–310, 2015a.

OLIVER, L.; SCHOLTEN, E.; VAN AKEN, G. A. Food Hydrocolloids Effect of fat hardness on large deformation rheology of emulsion-filled gels. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 299–310, 2015b.

PAUCAR, O. C. et al. Food and Bioproducts Processing Production by spray chilling and characterization of solid lipid microparticles loaded with vitamin D₃. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 344–350, 2016.

PERRECHIL, F. A.; SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L. κ-Carrageenan – sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 1, p. 123–133, 2011.

RODRIGUES, J.E.; et al. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**. p. 223–229, 2005.

RYAN, M., et al. Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients. **Food Chemistry**, p. 503-510, 2008.

SALA, G. et al. Deformation and fracture of emulsion-filled gels: Effect of gelling agent concentration and oil droplet size. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1853–1863, 2009a.

SALA, G. et al. Deformation and fracture of emulsion-filled gels : Effect of oil content and deformation speed. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1381–1393, 2009a.

SALA, G. et al. Oil droplet release from emulsion-filled gels in relation to sensory perception. **Food Hydrocolloids** v. 21, p. 977–985, 2007.

SHANTHA, N. S.; DECKER, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of lipids. **Journal of AOAC International**, v.77, p.421-424, 1994.

SHAO, Y.; TANG, C. Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: Influence of ionic strength and heat pretreatment. **Food Hydrocolloids**, p.149-158, 2014.

SILVA JUNIOR, E. C., et al. Natural variation of selenium in Brasil nuts and soils from the Amazon region. *Chemosphere*, n. 188, p. 650 – 658, 2017.

SILVA, O.F.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research Internacional**, p. 1434-1440, 2011.

STAFFAS, A.; NYMAN, A. Determination of cholecalciferol (vitamin D3 in selected foods by liquid chromatography: NMKL Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 400-406, 2003.

STEFFE, J. F. *Rheological Methods In Food Process Engineering*. 2nd Ed. Michigan: Freeman Press, 1996.

STUPIELLO, B. Vitamina D: conheça os benefícios e como obter essa substância. Disponível em:< <http://www.minhavidade.com.br/alimentacao/tudo-sobre/17540-vitamina-d>>. Acesso em: 13 de junho de 2018.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 147-156, 2005.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 303-318, 2004.

TANGPRICHA, V. et al. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach to enhance vitamin D nutritional health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1478-1483, 2003.

TOBITANI, A.; ROSS-MURPHY, S. B. Heat-Induced Gelation of Globular Proteins. 1. Model for the Effects of Time and Temperature on the Gelation Time of BSA Gels. **Macromolecules**, v. 30, p. 4845–4854, 1997.

TORREZAN, R.; CRISTIANINI, M. Revisão: efeito do tratamento de alta pressão sobre as propriedades funcionais da proteína de soja e interação proteína-polissacarídeos. **B. Ceppa**, Curitiba, v. 23, n.2, p. 201-220, 2005.

WONG, S. F. et al. Crude oil emulsion: A review on formation, classification and stability of water-in-oil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 135, p. 498-504, 2015.

WONG, S. F. et al. Synergistic enhancement in the co-gelation of salt-soluble pea proteins and whey proteins. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3913-3919, 2013.

YAKLICH, R. β -conglycinin and High-protein soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 729-735, 2001.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT – Food Science and Technology**, p. 1573 – 1580, 2009

YETLEY, E.A. Assessing the vitamin D status of the US population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 558–564, 2008.

YOUSAF, N. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with prostate cancer risk in the Pakistani population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 22, p. 10009-10013, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Diâmetro médio das gotas das emulsões de óleo de castanha do Brasil estabilizadas com isolado proteico de soja, utilizando diferentes concentrações de goma xantana, em volume. Concentrações de goma xantana (% m/v): (A) 0,1 %; (B) 0,2 %; (C) 0,3%.

(A) 0,1%

	Dias	1	7
[IPS]	Emulsão	Média±DP	Média±DP
0,75	E	23,5±0,19 A	19,8±1,05 A
	F	3,44±0,06 B	X
	G	2,70±0,05 ^{D,a}	2,70±0,06 ^{B,a}
	H	2,99±0,02 ^{CD,a}	3,14±0,22 ^{B,a}
	I	3,017±0,00 C	X
	J	3,14±0,02 ^{C,a}	3,04±0,01 ^{B,b}
1,00	E	21,9±2,19 A	20,8±1,84 A
	F	2,64±0,03 ^{B,b}	2,75±0,03 ^{B,a}
	G	3,03±0,01 ^{B,a}	2,99±0,00 ^{B,b}
	H	2,65±0,04 ^{B,a}	2,68±0,02 ^{B,a}
	I	2,85±0,00 ^{B,b}	2,93±0,00 ^{B,a}
	J	3,07±0,02 ^{B,a}	3,05±0,05 ^{B,a}
1,25	E	23,9±2,18 ^{A,a}	23,0±3,79 ^{A,a}
	F	3,12±0,14 ^{B,a}	2,91±0,06 ^{B,a}
	G	2,58±0,03 ^{B,b}	2,71±0,02 ^{B,a}
	H	2,47±0,04 ^{B,a}	2,53±0,05 ^{B,a}
	I	2,72±0,01 ^{B,a}	2,71±0,00 ^{B,a}
	J	2,95±0,03 ^{B,a}	2,75±0,04 ^{B,b}
1,50	E	35,5±3,13 ^{A,a}	36,7±2,46 ^{A,a}
	F	2,41±0,01 ^{B,b}	2,50±0,01 ^{B,a}
	G	2,73±0,00 ^{B,a}	2,72±0,02 ^{B,a}
	H	2,57±0,01 ^{B,b}	2,63±0,00 ^{B,a}
	I	2,32±0,08 ^{B,a}	2,41±0,02 ^{B,a}
	J	2,70±0,01 ^{B,a}	2,61±0,01 ^{B,a}

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

*Letras minúsculas iguais na mesma linha: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

(B) 0,2%

	Dias	1	14	28
[IPS]	Emulsão	Média±DP	Média±DP	Média±DP
0,75	E	16,6±1,25 ^{A,b}	20,7±0,46 ^{A,a}	22,5±0,64 ^{A,a}
	F	2,74±0,06 ^{B,b}	3,32±0,33 ^{C,b}	11,8±0,30 ^{D,a}
	G	3,62±0,07 ^{B,a}	3,63±0,11 ^{C,a}	4,69±0,88 ^{F,a}
	H	3,03±0,06 ^{B,b}	16,2±1,07 ^{B,a}	15,1±0,31 ^{C,a}
	I	2,89±0,05 ^{B,b}	3,26±0,40 ^{C,b}	18,1±0,38 ^{B,a}
	J	3,10±0,01 ^{B,b}	3,05±0,02 ^{C,b}	9,32±0,12 ^{E,a}
1,00	E	20,4±1,11 ^{A,a}	21,9±3,18 ^{A,a}	22,8±1,27 ^{A,a}
	F	2,43±0,02 ^{B,b}	3,17±0,22 ^{B,b}	12,3±0,92 ^{C,a}
	G	3,06±0,02 ^{B,ab}	2,96±0,12 ^{B,b}	3,26±0,00 ^{D,a}
	H	2,42±0,01 ^{B,c}	6,09±0,62 ^{B,b}	17,7±0,17 ^{B,a}
	I	2,70±0,01 ^{B,b}	3,66±0,36 ^{B,b}	19,7±0,51 ^{B,a}
	J	2,78±0,03 ^{B,b}	2,86±0,17 ^{B,b}	10,4±0,85 ^{C,a}
1,25	E	26,9±4,22 ^{A,b}	40,5±1,79 ^{A,a}	38,9±2,89 ^{A,a}
	F	2,73±0,03 ^{B,b}	4,75±1,19 ^{C,b}	20,0±0,95 ^{B,a}
	G	3,01±0,03 ^{B,b}	2,76±0,01 ^{C,b}	17,45±0,27 ^{B,a}
	H	2,56±0,05 ^{B,b}	16,8±2,51 ^{B,a}	18,0±1,10 ^{B,a}
	I	2,52±0,04 ^{B,a}	4,75±0,43 ^{C,a}	15,5±9,09 ^{B,a}
	J	2,87±0,10 ^{B,b}	3,63±0,16 ^{C,b}	24,8±0,42 ^{B,a}
1,50	E	17,3±0,73 ^{A,a}	19,2±2,00 ^{A,a}	19,1±0,86 ^{C,a}
	F	2,40±0,02 ^{B,b}	2,41±0,05 ^{B,b}	21,3±2,83 ^{BC,a}
	G	2,65±0,01 ^{B,b}	2,78±0,02 ^{B,ab}	2,84±0,09 ^{D,a}
	H	2,40±0,01 ^{B,c}	21,6±1,36 ^{A,b}	24,7±0,24 ^{B,a}
	I	2,59±0,02 ^{B,b}	2,62±0,03 ^{B,b}	20,9±0,70 ^{BC,a}
	J	2,60±0,00 ^{B,b}	3,00±0,20 ^{B,b}	30,5±1,50 ^{A,a}

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

*Letras minúsculas iguais na mesma linha: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

(C) 0,3%

	Dias	1	14	28
[IPS]	Emulsão	Média±DP	Média±DP	Média±DP
0,75	E	19,0±3,34 ^{A,a}	20,3±1,82 ^{A,a}	19,4±1,76 ^{A,a}
	F	3,15±0,08 ^{B,c}	4,79±0,38 ^{B,b}	7,16±0,39 ^{B,a}
	G	3,00±0,07 ^{B,a}	3,26±0,11 ^{B,b}	4,86±0,55 ^{C,a}
	H	2,72±0,04 ^{B,c}	4,82±0,08 ^{B,b}	10,1±0,08 ^{B,a}
	I	3,09±0,04 ^{B,b}	3,56±0,40 ^{B,b}	7,91±0,37 ^{B,a}
	J	3,41±0,01 ^{B,b}	4,12±0,54 ^{B,b}	9,59±0,09 ^{B,a}
1,00	E	32,3±5,85 ^{A,a}	31,9±9,98 ^{A,a}	34,8±3,19 ^{A,a}
	F	2,63±0,02 ^{B,c}	6,87±0,28 ^{B,b}	9,20±0,11 ^{C,a}
	G	2,86±0,04 ^{B,b}	2,83±0,04 ^{B,b}	6,98±0,74 ^{C,a}
	H	2,41±0,01 ^{B,c}	6,50±0,32 ^{B,b}	10,3±0,27 ^{C,a}
	I	2,74±0,01 ^{B,c}	3,81±0,25 ^{B,b}	9,74±0,52 ^{C,a}
	J	3,14±0,01 ^{B,c}	6,09±1,28 ^{B,b}	15,4±0,69 ^{B,a}
1,25	E	22,8±1,89 ^{A,a}	20,6±2,30 ^{A,a}	26,3±3,91 ^{A,a}
	F	2,48±0,04 ^{B,b}	3,52±1,17 ^{B,b}	12,7±0,89 ^{CD,a}
	G	2,96±0,02 ^{B,b}	3,40±0,26 ^{B,b}	14,8±0,59 ^{CD,a}
	H	2,45±0,05 ^{B,c}	5,35±0,05 ^{B,b}	10,9±0,90 ^{D,a}
	I	2,79±0,04 ^{B,b}	3,92±0,01 ^{B,b}	18,94±0,66 ^{BC,a}
	J	2,77±0,01 ^{B,c}	4,28±0,21 ^{B,b}	21,3±0,77 ^{AB,a}
1,50	E	43,8±5,32 ^{A,a}	44,9±6,04 ^{A,a}	49,62,46 ^{A,a}
	F	2,47±0,01 ^{B,c}	14,1±0,84 ^{B,b}	17,3±0,46 ^{B,a}
	G	2,71±0,04 ^{B,b}	2,87±0,04 ^{B,b}	21,6±6,68 ^{B,a}
	H	2,52±0,03 ^{B,c}	9,73±0,52 ^{B,b}	23,6±1,01 ^{B,a}
	I	2,72±0,05 ^{B,b}	3,05±0,04 ^{B,b}	19,4±1,16 ^{B,a}
	J	2,66±0,02 ^{B,c}	4,24±0,05 ^{B,b}	21,3±0,26 ^{B,a}

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

*Letras minúsculas iguais na mesma linha: valores não diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

APÊNDICE B – Curva padrão para quantificação da vitamina D₃ na emulsão

Fonte: Própria autoria

APÊNDICE C – Resultados dos testes de varredura de deformação para os géis de isolado proteico de soja não-carregados (A, B e C) e carregados (D, E e F) para hidratação manual, 800 rpm por 20 min e 800 rpm por 30 min, respectivamente.

Fonte: Própria autoria

ANEXOS

ANEXO A – Ficha de especificação do isolado proteico de soja comercial, disponibilizada pelo fornecedor (Marsul Proteínas LTDA)

PROTIMARTI M-90 – PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

DESCRIÇÃO DO PRODUTO:

Protimarti M-90, proteína isolada de soja, caracteriza-se por suas propriedades funcionais, muito importantes na produção de alimentos: retenção de líquidos, poder estabilizante, melhorias na coloração e na textura, grande poder emulsificante; sua neutralidade não interfere no sabor do produto final. É capaz de manter sua estabilidade funcional em condições adversas (sistemas com alto teor de gordura ou umidade). Além disso, o produto apresenta alto teor proteico, baixo teor de açúcar e ótima digestibilidade. Apresenta capacidade de hidratação, de 1:5, e de emulsão, de 1:6:6.

APLICAÇÃO DO PRODUTO:

Indicado para utilização no processo de fabricação de uma grande variedade de produtos alimentícios, como: pães, bolos, biscoitos, suplementos proteicos, sopas desidratadas, alimentos infantis, massas, alimentos especiais (funcionais e/ou dietéticos). Também, é indicado para utilização em produtos cárneos frescos ou cozidos, embutidos ou não, misturados ou injetados; pode ser adicionado diretamente na massa ou após prévia hidratação ou emulsão, em concentração de 2,0% a 4,0% sobre a massa cárnea, conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do produto (se aplicado diretamente na massa, é indicado adicionar o produto após a mistura das carnes, do sal e parte do gelo ou água).

CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE:

PARÂMETRO	PADRÃO	METODOLOGIA
Aspecto	Pó fino, cor natural	Observação visual
Proteína (base seca)	Mín. 88,0%	Normas Analíticas – Instituto Adolfo Lutz
Umidade	Máx. 8,0%	Normas Analíticas – Instituto Adolfo Lutz
Gordura	Máx. 2,0%	Normas Analíticas – Instituto Adolfo Lutz
pH (solução 1%)	6,0-8,0	Normas Analíticas – Instituto Adolfo Lutz
Granulometria (retido #100)	Máx. 5,0%	Normas Analíticas – Instituto Adolfo Lutz
<i>E. coli</i>	Máx. 10 UFC/g	APHA
<i>Bacillus cereus</i> *	Máx. 5 x 10 ² UFC/g	EMBRAPA
<i>Salmonella sp.</i> *	Ausência em 25g	APHA

*Conforme Resolução RDC nº12 de 02/01/2001

EMBALAGEM:

Embalado em saco de polietileno, revestido por saco de papel multifolhado; peso líquido de 5kg ou 20kg.

Também disponível embalado em saco de polietileno, revestido por saco plástico leitoso; peso líquido de 20kg.

VALIDADE:

Doze meses, a contar da data de fabricação.

ARMAZENAMENTO:

O produto deve ser armazenado em local seco e ventilado, protegido contra roedores e insetos e ao abrigo de luz solar.

ANEXO B – Relatório de Análise – Determinação do perfil de ácidos graxos

Universidade de São Paulo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos
Laboratório de Engenharia de Separações

RELATÓRIO DE ANÁLISE

Analista: Keila Kazue Aracava

Professora responsável: Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Data: 16/04/2018

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

AMOSTRA: castanha do Brasil

C1

C2

Ácido Graxo		% massa 1	% massa 2	média	desvio
C16:0	Palmitico	14,46	14,00	14,23	0,33
C16:1	Palmitoleico	0,34	0,22	0,28	0,08
C18:0	Estearico	7,88	7,45	7,67	0,30
C18:1	Oleico	29,00	29,41	29,21	0,29
C18:2	Linoleico	48,31	48,92	48,61	0,43