UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RICARDO MATOS

**Nanoemulsificação de óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia
excel/sa*) pelo método do ponto de inversão da emulsão e
encapsulação de vitamina D₃**

Pirassununga

2019

RICARDO MATOS

**Nanoemulsificação de óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia
exce/sa*) pelo método do ponto de inversão da emulsão e
encapsulação 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 Mestre 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

2019

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

M433n Matos, Ricardo
Nanoemulsificação de óleo de castanha do Brasil
(Bertholletia excelsa) pelo método do ponto de
inversão da emulsão e encapsulação de vitamina D3 /
Ricardo Matos ; orientadora Samantha Cristina de
Pinho. -- Pirassununga, 2019.
106 f.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.
1. Nanoemulsão. 2. EIP. 3. Vitamina D3. 4.
Inversão Catastrófica. 5. Iogurte. I. de Pinho,
Samantha Cristina, orient. II. Título.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por me dar força e coragem para seguir em frente e escolher os melhores caminhos, sempre apoiado de pessoas incríveis.

A minha orientadora Samantha; entrei falando que conhecia duas “Samanthas” diferentes, a professora de Termodinâmica e a de Físico-Química, respectivamente mas que sempre ouvi dizer que era uma mãe para seus orientandos, e agora depois de todo esse tempo eu entendo o porquê de ouvir isso, como toda boa mãe, incentiva, dá bronca, mas sempre está lá pra ajudar e torcer junto. Obrigado por tudo!

A minha mãe, meu pai, meu irmão e principalmente a minha noiva Ana Paula, que estiveram sempre ao meu lado, me dando força quando eu pensava em desistir, aguentando eu reclamar e desabafar e me incentivando a seguir firme em frente sempre. Aos meus avós que mesmo não estando aqui entre nós, sempre iluminaram meu caminho lá de cima. Sem vocês eu não estaria aqui! Essa conquista não é só minha, é nossa!!!

A todos meus amigos da República Manguaça, que sempre estiveram presentes e foram muito solícitos quando precisei. Vocês são demais!!!

A todo grupo Lenalis, em especial a Augusto Pansarim, o Rolinha, aluno de Graduação, pela ajuda em boa parte do Mestrado, e pelos momentos de parceria.

Aos meus colegas de laboratório com quem compartilhei momentos únicos e que sempre me ajudaram: Marluci, Matheus, Letícia e principalmente à Thais, pela ajuda nas análises reológicas.

Aos técnicos de laboratório que sempre me ajudaram na realização de análises, ou mesmo me dando conselhos: Guilherme Silva, Camila Molina, Keila Aracava, Fábio Gallo, Arina Rochetti e, principalmente ao Marcelo Thomazini por toda paciência.

À CAPES, pela bolsa de Mestrado concedida (código de financiamento 001).

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Resumo

MATOS, Ricardo. **Nanoemulsificação de óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) pelo método do ponto de inversão da emulsão e encapsulação de vitamina D₃**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

O cotidiano de uma parcela significativa da população ocidental está associado à alimentação inadequada e ao sedentarismo, que podem levar diretamente a deficiências de micronutrientes (como vitaminas e minerais) no organismo. Nesse contexto, a suplementação com a ingestão de alimentos fortificados pode ser uma alternativa, e, portanto, torna-se interessante o desenvolvimento de produtos com adição desses micronutrientes. O objetivo desse trabalho de Mestrado foi o estudo da produção de nanoemulsões com óleo de castanha do Brasil encapsulando vitamina D₃. As nanoemulsões foram formuladas com o uso de dois tensoativos, Tween 80 e Brij 30, e produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP - *emulsion inversion point*). As amostras com (SOR) = 1,5 e razão de tensoativos 70:30, Tween 80: Brij 30, e as amostras com razão 100:0, Tween 80:Brij 30, apresentaram maior estabilidade físico-química ao longo do tempo de armazenagem. Foram produzidas também nanoemulsões com óleo de soja como fase oleosa, a título de comparação com o óleo de castanha do Brasil. As nanoemulsões foram avaliadas quanto a estabilidade com tempo de estocagem ao longo de 30 dias e o diâmetro médio hidrodinâmico de suas partículas foram medidos, ao longo do tempo de armazenagem. As amostras com óleo de soja foram mais eficazes na proteção da vitamina D₃ do que o óleo de castanha do Brasil, com ambos os tipos de interfaces (T100 e T70). O teor de fosfolipídios no óleo de castanha do Brasil foi superior ao óleo de soja, e esse fato provavelmente levou à formação de uma interface mais instável neste caso. As emulsões foram então incorporadas em iogurtes de coco e posteriormente avaliadas reológica e sensorialmente. As propriedades reológicas dos géis dependeram das proporções dos tensoativos utilizados, porém não foram amplamente afetadas pelo tipo de óleo utilizado. Em relação à ensaios afetivos, os iogurtes obtiveram alta aceitação por parte dos panelistas, mostrando potencial como veículos carreadores de vitamina D₃ para uso neste tipo de produto alimentício.

Palavras-chave: nanoemulsões, EIP, vitamina D₃, inversão catastrófica, iogurte

Abstract

MATOS, Ricardo. **Nanoemulsification of Brazil nut oil (*Bertholletia excelsa*) by the emulsion inversion point method and encapsulation of vitamin D₃**. Thesis (M.Sc.) – School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2019.

The daily lives of a significant portion of the western population are associated with poor diet and physical inactivity, which can directly lead to micronutrient deficiencies (such as vitamins and minerals) in the body. In this context, supplementation with the ingestion of fortified foods may be an alternative, and therefore it is interesting to develop products with the addition of these micronutrients. The objective of this Master's thesis was to study the production of nanoemulsions with Brazil nut oil encapsulating vitamin D₃. Nanoemulsions were formulated using two surfactants, Tween 80 and Brij 30, and produced by the emulsion inversion point (EIP) method. Samples with (SOR) = 1,5 and surfactant ratio 70:30, Tween 80: Brij 30, and samples with 100: 0 ratio, Tween 80: Brij 30, showed greater physical-chemical stability over time. storage. Nanoemulsions with soybean oil as oil phase were also produced as a comparison with Brazil nut oil. Nanoemulsions were evaluated for stability with storage time over 30 days and the average hydrodynamic diameter of their particles was measured over storage time. Soybean oil samples were more effective in protecting vitamin D₃ than Brazil nut oil, with both types of interfaces (T100 and T70). The phospholipid content in Brazil nut oil was higher than soybean oil, and this fact probably led to the formation of a more unstable interface in this case. The emulsions were then incorporated into coconut yoghurt and subsequently rheologically and sensorially evaluated. The different types of oil did not influence on the rheological properties of the yoghurts, but the type of interface did it significantly. In terms of sensory evaluation, the yoghurts presented high acceptance by panelists, showing potential as vitamin D₃ carrier vehicles for use in this type of food product.

Keywords: nanoemulsions, EIP, vitamin D₃, catastrophic inversion, yogurt

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação entre o valor de EHL e as aplicações dos tensoativos.....	21
Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) do óleo extraído da castanha do Brasil: *Óleo extraído a frio, **Óleo extraído por CO ₂ supercrítico, ND = Não Identificado, (-) = Não fornecido pelo autor, (ω 9) = ômega 9, (ω 6) = ômega 6, (ω 3) = ômega 3.	32
Tabela 3: Exemplos de trabalhos realizados com iogurtes enriquecidos nos últimos 5 anos.....	37
Tabela 4 - Nomenclatura usada para denominar as diferentes razões nas misturas dos tensoativos Tween 80 e Brij 30, durante a produção das nanoemulsões de óleo de soja e óleo de castanha do Brasil. As porcentagens são em relação à massa total de tensoativo usada.....	42
Tabela 5 - Composição das formulações das amostras com diferentes valores de SOR.....	43
Tabela 6 - Formulações dos iogurtes enriquecidos com nanoemulsões.....	49
Tabela 7 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões preparadas com óleo de soja, durante o período de 28 dias de estocagem.....	54
Tabela 8 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões produzidas com óleo de castanha do Brasil, durante o período de 28 dias de estocagem.....	55
Tabela 9 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões produzidas com óleo de castanha do Brasil, com intensidade de agitação de 300 rpm.	57
Tabela 10 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões produzidas com óleo de castanha do Brasil, com intensidade de agitação de 700 rpm.	58
Tabela 11 - Condições experimentais com os melhores resultados (formulação e operação), para as nanoemulsões produzidas com os óleos de castanha do Brasil ou soja.....	60
Tabela 12 - Quadro-resumo da estabilidade das nanoemulsões produzidas com óleo de soja e castanha do Brasil, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30, encapsulando vitamina D3, durante o período de 30 dias de estocagem.	67
Tabela 13 - Variações dos diâmetros hidrodinâmicos (nm) das nanoemulsões, com variação de pH (3, 4, 5 e 6), medidos durante o período de armazenagem.....	70
Tabela 14 - Diâmetro hidrodinâmicos médios (nm) das nanoemulsões, com diferentes concentrações de sacarose (1, 1,50, 2 e 2,5 g/100 g), medidos durante o período de armazenagem.....	73
Tabela 15 - Valores médios referentes a contagem de fungos filamentosos e leveduras, bactérias lácticas e coliformes totais e termotolerantes (C – óleo de castanha do Brasil; S – óleo de soja).	77
Tabela 16. Parâmetros do modelo Lei da Potência obtidos por meio do ajuste aos dados de curva de fluxo dos iogurtes no primeiro e segundo aumento de taxa de deformação.	81
Tabela 17. Parâmetros do modelo Herschel–Bulkley obtidos por meio do ajuste aos dados de curva de fluxo dos iogurtes no primeiro e segundo aumento de taxa de deformação.	85
Tabela 18. Valores de viscosidade aparente determinadas a 11 s ⁻¹ das amostras de iogurte em diferentes dias de armazenamento.....	87

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática mostrando as gotas das emulsões, onde em amarelo temos a fase dispersa e em azul a fase contínua.....	17
Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de emulsão (A – emulsão O/A; B – emulsão A/O ; C – emulsões múltiplas do tipo A/O/A ; D/E – comportamento do tensoativo). A fase oleosa é representada em amarelo e a fase aquosa em azul.	18
Figura 3 - Dinâmica do comportamento de fases por inversão de fase transicional e catastrófico. (A - quantidades intermediárias de óleo e água no sistema; B - excesso de óleo; C - excesso de água; os sinais + e – representam o sinal do DHL.	22
Figura 4 - Representação esquemática do método do ponto de inversão de fases da emulsão.	24
Figura 5 - Fenômenos físico-químicos que podem afetar a estabilidade das nanoemulsões do tipo óleo em água.	26
Figura 6: Estruturas químicas dos tensoativos utilizados no presente trabalho de Mestrado: (A) Brij 30; (b) Tween 80.	29
Figura 7 - Amêndoas de castanha do Brasil.	30
Figura 8 - Aspecto visual do óleo refinado de castanha do Brasil.	30
Figura 9 - Estruturas químicas das vitaminas D ₂ e D ₃	34
Figura 10 - Representação esquemática do processo para produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão.	40
Figura 11 - Condições operacionais utilizadas na produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão.	41
Figura 12 - Condições de <i>stress</i> utilizadas na avaliação da estabilidade das nanoemulsões.	48
Figura 13 - Resultados obtidos com a variação nas condições operacionais na produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão.	59
Figura 14 - Comportamento da condutividade, durante a adição da fase aquosa no processo de produção das nanoemulsões, com óleo de soja (azul) ;castanha do Brasil (vermelho) e presença de tensoativos Tween 80 e Brij 30 na proporção 70:30) e com óleo de soja (amarelo); castanha do Brasil (verde) e presença do tensoativo Tween 80).	61
Figura 15 - Quantificação da concentração de vitamina D ₃ nas nanoemulsões durante o período de 30 dias de estocagem, produzidas com óleo de soja e castanha do Brasil, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30. Legenda: —●— soja T70/S1,5, —●— castanha do Brasil T100/S1,5, —●— soja T100/S1,5, —●— castanha do Brasil T70/S1,5.	63
Figura 16 - Resultados da análise de índice de peróxidos das nanoemulsões contendo óleo de soja e castanha do Brasil, durante o período de 30 dias de estocagem, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30. Legenda: —●— soja T100/S1,5, —●— castanha do Brasil T100/S1,5, —●— soja T70/S1,5, —●— castanha do Brasil T70/S1,5).	65
Figura 17 - Resultados da análise de quantificação de produtos secundários da oxidação lipídica (por quantificação de TBARS) das nanoemulsões, durante o período de 30 dias de estocagem, produzidas com óleo de soja e castanha do Brasil, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30. Legenda: —●— soja T100/S1,5, —●— castanha do Brasil T100/S1,5, —●— soja T70/S1,5, —●— castanha do Brasil T70/S1,5.	66
Figura 18 - Diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos para as nanoemulsões após dos ciclos de congelamento e descongelamento das amostras produzidas com óleo de castanha do Brasil com Tween 80 e Brij 30 A temperatura de congelamento (-2 °C) está representada em azul; a temperatura de descongelamento (25 °C) está representada em vermelho. Foram realizados dois ciclos e os diâmetros hidrodinâmicos medidos em cada etapa.	71
Figura 19 - Diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos para as nanoemulsões, após exposição ao binômio tempo X temperatura (15 s X 72 °C).	75
Figura 20. Curva de fluxo (segundo aumento de taxa de deformação) para amostras de iogurte nos dias 01 (A) e 15 (B) de armazenamento com ajuste do modelo Lei da Potência.	80

Figura 21. Curva de fluxo (segundo aumento de taxa de deformação) para amostras de iogurte nos dias 01 (A) e 15 (B) de armazenamento com ajuste do modelo Herschel–Bulkley.....	84
Figura 22. Valores de tixotropia calculados a partir da área de histerese entre a primeira rampa ascendente e rampa descendente.	87
Figura 23 – Notas da avaliação sensorial das amostras de iogurte enriquecido com vitamina D ₃ encapsulado em nanoemulsões (I – iogurte sem adição de emulsão; IC – iogurte enriquecido com nano emulsão produzida com óleo de castanha do Brasil, CT70; IS – iogurte enriquecido com nano emulsão produzida com óleo de soja, ST70).	90

Lista de Abreviaturas e Siglas

A/O – Água em óleo

BHT - Di-terc-butil metil fenol

BHA – hidroxianisol butilano

BHT - hidroxitolueno butilano

CT70 – Óleo de castanha do Brasil e 70% de Tween 80

CT100 – Óleo de castanha do Brasil e 100% de Tween 80

EIP - *Emulsion point inversion* (ponto de inversão da emulsão)

HLD – desvio hidrofílico-lipofílico (hydrophilic lipophilic deviation)

O/A – Óleo em água

O/A/O – Emulsão múltipla óleo/água/ óleo

PIT - *Phase inversion temperature* (temperatura de inversão de fases)

rpm - Rotações por minuto

SOR - *Surfactant:oil ratio* (razão tensoativo:óleo)

ST70 – Óleo de Soja e 70% de Tween 80

ST100 – Óleo de Soja e 100% Tween 80

TBA - Ácido tricloroacético

TBARS - TBA *reactive substances* (substâncias reativas ao TBA, ácido tiobarbitúrico)

TCA – *Trichloroacetic acid* (ácido tricloroacético)

Lista de Símbolos

σ = tensão de cisalhamento

K = índice de consistência

$\dot{\gamma}$ = taxa de deformação

PV = valor de peróxido;

abs = absorvância da amostra;

m = coeficiente angular da curva de calibração;

m_o = massa em gramas da fase oleosa

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Nanoemulsões: definição, produção e estabilidade físico-química..	17
2.2	Método do Ponto de Inversão da Emulsão (EIP).....	20
2.3	Estabilidade físico-química de nanoemulsões.....	25
2.4	Tensoativos	27
2.5	Óleo de Castanha do Brasil.....	29
2.6	Estrutura e funções nutricionais da vitamina D ₃	32
2.7	Iogurte: mercado e enriquecimento com bioativos	35
3.	OBJETIVOS.....	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	MATERIAL.....	39
4.2	MÉTODOS.....	40
4.2.1.	Determinação das condições operacionais para a produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão (emulsion inversion point - EIP).....	40
4.2.2.	Experimentos para definição da razão tensoativo/óleo (SOR – surfactant/oil ratio) e influência da presença do tensoativo Brij 30..	42
4.2.3.	Determinação do ponto de inversão da emulsão.....	43
4.2.4.	Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de gota.....	44
4.2.5.	Encapsulação e quantificação de vitamina D ₃ nas nanoemulsões..	44
4.2.6.	Quantificação da oxidação lipídica nas nanoemulsões.....	46
4.2.7.	Avaliação da estabilidade das nanoemulsões em diferentes condições de processamento.....	48
4.2.8.	Formulação do iogurte de coco enriquecido com vitamina D ₃	49
4.2.9.	Análises microbiológicas do iogurte.....	49
4.2.9.1.	Contagem de fungos filamentosos e leveduras.....	50
4.2.9.2.	Contagem de bactérias lácticas.....	50
4.2.9.3.	Contagem de coliformes totais e termotolerantes.....	50
4.2.10.	Análises Reológicas.....	51

4.2.11.	Análise Sensorial.....	52
4.2.11.	Análises Estatísticas.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	Determinações da influência da razão tensoativo/óleo (SOR) e da presença do tensoativo Brij 30 na formação das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão.....	53
5.2	Produções de nanoemulsões com óleo de castanha do Brasil.....	54
5.3	Produção de nanoemulsões com óleo de castanha do Brasil: variação de parâmetros operacionais.....	56
5.4	Determinação do ponto de inversão da emulsão (EIP).....	61
5.5	Quantificação de vitamina D3 encapsulada nas nanoemulsões....	63
5.6	Quantificação da oxidação lipídica nas nanoemulsões.....	65
5.7	Avaliação da estabilidade das nanoemulsões em diferentes condições de processamento simuladas.....	69
5.8	Formulação dos iogurtes de coco.....	75
5.9	Análises microbiológicas do iogurte.....	76
5.10	Análises Reológicas.....	78
5.11	Análise Sensorial.....	88
6.	CONCLUSÕES.....	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8.	ANEXOS.....	102

1. INTRODUÇÃO

O cotidiano de grande parcela da população urbana moderna está associado a uma alimentação inadequada, ao sedentarismo, dentre outros hábitos que colaboram para o desenvolvimento de doenças como hipertensão, colesterol alto, diabetes, bem como em deficiências crônicas de vitaminas no organismo. A ingestão insuficiente de algumas vitaminas, principalmente devido à alimentação inadequada, está relacionada diretamente às condições de redução da capacidade de defesa do sistema imunológico. Nesse contexto, destaca-se a vitamina D, que em concentrações insuficientes no organismo, aliada à crônica falta de exposição solar, acaba por interferir diretamente na síntese do colicalciferol (vitamina D₃). Para evitar ou minimizar esses efeitos, é possível complementar as necessidades diárias dessa vitamina através da suplementação com suplementos vitamínicos ou alimentos fortificados.

A vitamina D₃ caracteriza-se por ser lipossolúvel e apresentar alta instabilidade frente a fatores como elevadas temperaturas, presença de oxigênio, exposição à luz e variações de pH. Tais condições são comuns durante o processamento de alimentos, e, portanto, podem dificultar a manutenção da vitamina D₃ como um composto estável nas matrizes alimentícias. Dessa maneira, um meio de se adicionar compostos bioativos lipofílicos como a vitamina D₃ em alimentos, de modo a mantê-los estáveis durante o processamento e estocagem do produto, é através da incorporação de tal bioativo em emulsões.

Para a produção das emulsões deve-se atentar para os tipos de ingredientes utilizados, como o óleo e o(s) tensoativo(s). Por essa razão, no presente trabalho optou-se por utilizar o óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), que é rico em micronutrientes, como selênio e magnésio, e ainda pouco explorado em pesquisas sobre processos de nanoemulsificação, e ainda menos explorado com tal finalidade para uso em alimentos. Da mesma forma, a escolha dos tensoativos é fundamental, a fim de alcançar a melhor performance para a produção de nanoemulsões.

Em relação aos tensoativos, já é amplamente sabido que o Tween 80 (polisorbato 80) é muito eficiente para a formação das nanoemulsões por métodos de baixa energia. No entanto, o presente projeto também visou explorar a combinação de dois tensoativos, o Tween 80 e o Brij 30, com o intuito de determinar a influência do Brij 30 na produção e na estabilidade das nanoemulsões. Por sua vez, a produção de nanoemulsões é possível a partir de métodos classificados como métodos de alta ou de baixa energia.

A nanoemulsificação por métodos de alta energia ocorre com o emprego de dispositivos mecânicos, através da atuação de forças de cisalhamento e/ou alta pressão, o que, na maioria dos casos, pode levar a altos custos de investimento inicial e de operação. Por outro lado, os métodos de baixa energia utilizam a energia química do próprio sistema em questão, o que pode torná-los economicamente mais interessantes, pois a princípio necessitam de menor energia externa adicionada para acontecerem.

Porém, técnicas de nanoemulsificação por métodos de baixa energia demandam maiores quantidades de tensoativos para a produção das nanoemulsões, fator que deve ser levado em consideração devido, principalmente, em relação às alterações sensoriais que essas quantidades de tensoativo podem acarretar os alimentos. Os processos de nanoemulsificação de baixa energia classificam-se em emulsificação espontânea e métodos de inversão de fases.

Diante do exposto, a presente Dissertação teve como principal objetivo o estudo da nanoemulsificação de óleo de castanha do Brasil, pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) e a utilização das nanoemulsões para a encapsulação de vitamina D₃, e posterior aplicação em iogurte de coco. A partir das formulações produzidas em condições operacionais definidas pelo estudo realizado na produção de nanoemulsões, adicionou-se a vitamina D₃ e em seguida foram feitas análises de estabilidade físico-químicas das nanoemulsões. Por fim, realizou-se a incorporação das nanoemulsões em iogurte sendo avaliados os aspectos reológicos e sensoriais decorrentes desta incorporação.

Dessa forma, o presente trabalho de Mestrado pode colaborar com a melhoria no processo de produção de nanoemulsões pelo método de ponto de inversão da emulsão (EIP), além da aplicabilidade das nanoemulsões como ferramenta alternativa para a suplementação da vitamina D₃, em matrizes alimentícias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanoemulsões: definição, produção e estabilidade físico-química

Nanoemulsões são sistemas dispersos formados por, pelo menos, duas fases líquidas imiscíveis, e um (ou mais) agente(s) emulsificante(s) para estabilização das gotas. O tamanho médio das gotas das nanoemulsões localiza-se na escala nanométrica, entre 20 e 200 nm. As gotas são denominadas de “fase dispersa”, “fase descontínua” ou “fase interna”, enquanto o líquido que contém as gotas é a “fase dispersante”, “fase contínua” ou “fase externa”, como mostra o esquema na Figura 1 (HUNTER, 2001; MASON et al. 2006; TADROS et al., 2004).

Figura 1 - Representação esquemática mostrando as gotas das emulsões, onde em amarelo temos a fase dispersa e em azul a fase contínua.

Fonte: Própria Autoria

As nanoemulsões, da mesma forma que as emulsões convencionais, podem se apresentar como uma emulsão óleo em água (O/A), em que o meio oleoso é a fase dispersa e a água é a fase contínua. Por outro lado, se o meio aquoso é a fase dispersa a emulsão é dita água em óleo (A/O). Além dessas formas convencionais, pode-se encontrar emulsões múltiplas como, por exemplo, água em óleo em água (A/O/A) que se constitui em gotículas de água suspensas em gotas maiores de óleo que, por sua vez, estão suspensas na fase aquosa (McCLEMENTS, 2012; MORAIS et al., 2008).

Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de emulsão (A – emulsão O/A; B – emulsão A/O ; C – emulsões múltiplas do tipo A/O/A ; D/E – comportamento do tensoativo). A fase oleosa é representada em amarelo e a fase aquosa em azul.

Fonte: Própria Autoria

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e que, portanto, precisam de adição de energia para serem formadas. Para tanto, existem duas classes de processos de formação de nanoemulsões: métodos de alta e de baixa energia. Um processo típico de alta energia se inicia com uma mistura (utilizando agitação mecânica, por exemplo) entre as fases dispersa e contínua, e o(s) tensoativo(s), resultando em uma emulsão grosseira, caracterizado pelo tamanho de gotícula na faixa micrométrica. Logo após a formação da emulsão grosseira, esta é submetida à ação de forças de cisalhamento e turbulência, durante o qual se reduzirá o tamanho médio de gotícula (JAFARI et al., 2008).

Os métodos de alta energia são dependentes de fatores operacionais do equipamento como vazão, intensidade de energia adicionada e temperatura, bem como da composição da amostra, concentração de tensoativos, além de fatores físico-químicos como a tensão interfacial e viscosidade das fases (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008). Nesses processos, a energia adicionada ao sistema pode ser oriunda de dispositivos mecânicos, como por exemplo, existentes em homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e homogeneizadores ultrassônicos (ANTON et al., 2008).

No entanto, os processos de alta energia apresentam, de forma geral, um alto custo de investimento inicial para aplicações industriais, uma vez que os equipamentos podem ser caros. Por sua vez, os métodos de baixa energia para produção de nanoemulsões podem apresentar menores custos de investimento inicial e menores custos operacionais. Em termos de comparação, as densidades de energia típicas requeridas em métodos de alta energia estão entre 10^8 e 10^6 W/kg, enquanto nos métodos de baixa energia estão por volta de 10^3 W/kg (GUPTA et al., 2016).

Além disso, a maior vantagem dos métodos de baixa energia é que podem produzir gotículas com diâmetros muito pequenos, abaixo de 80 nm, faixa de diâmetro difícil de ser alcançada por métodos de alta energia (McCLEMENTS; RAO, 2011). Por esse motivo, para determinadas aplicações, também podem ser métodos mais eficientes em relação aos métodos de alta energia (OSTERTAG; WEISS; McCLEMENTS, 2012, YANG et al., 2012).

Os métodos de nanoemulsificação de baixa energia são fundamentados na formação espontânea de gotículas de óleo nos sistemas mistos de óleo-água-tensoativo, a partir da alteração da composição ou das condições operacionais, empregando a própria energia química do sistema. São exemplos de métodos de baixa energia os métodos de inversão de fases e os métodos de emulsificação espontânea (SOLANS et al., 2005).

Contudo, uma das desvantagens desses métodos é a necessidade de utilização de maiores quantidades de tensoativos do que nos métodos de alta energia. Dessa forma, pode-se alterar as características do produto em que as nanoemulsões serão incorporadas. É possível que ocorram, por exemplo, alterações significativas de textura, sabor ou mesmo torná-lo impróprio para consumo (KOMAICO; McCLEMENTS, 2016) devido a significativas alterações organolépticas, pois há presença da grande quantidade de tensoativos nas emulsões.

2.2 Método do Ponto de Inversão da Emulsão (EIP)

Devido à importância das características dos tensoativos na formação das nanoemulsões pelo método de inversão de fase, faz-se necessário o entendimento de sua estrutura e classificação. Os tensoativos são compostos que apresentam em sua estrutura porções hidrofílicas e hidrofóbicas, e dessa forma suas propriedades e seu desempenho levam em consideração o equilíbrio entre estas diferentes partes de suas moléculas. GRIFFIN (1949) definiu o conceito de HLB – *hydrophilic-lipophilic balance*, ou equilíbrio hidrofílico – lipofílico (em português, EHL), como um valor empírico dentro de uma escala arbitrária.

Em tal escala, o grupo de tensoativos mais lipofílicos apresentam um baixo valor de HLB, e normalmente estabilizam emulsões do tipo água/óleo (A/O). Por outro lado, o grupo de tensoativos mais hidrofílicos apresentam valores elevados de EHL e estabilizam as emulsões do tipo óleo/água (O/A) (BECHER; SCHICK, 1987). A Tabela 1 fornece informações típicas sobre a relação do valor de EHL e a aplicação dos tensoativos. É importante ressaltar que o conceito de EHL só é válido para tensoativos não-iônicos.

Tabela 1 - Relação entre o valor de EHL e as aplicações dos tensoativos.

Valores de EHL	Características
< 6	Emulsões A/O
7 – 9	Agente de molhamento
8 – 18	Emulsões O/A
13 – 15	Detergente
> 15	Solubilizante

Fonte: Davies, JT, Proceedings of the International Congress of Surface Activity, 426-38, 2007.

A classificação dos tensoativos pelos valores de EHL permite uma previsão do desempenho destas substâncias e podem atuar como um elo entre a teoria e as aplicações práticas (KRUGLYAKOV, 2000). Contudo, o conceito de EHL não leva em consideração fatores importantes que alteram o desempenho dos tensoativos, como por exemplo, valores de pH, força iônica e temperatura, limitando as informações sobre as características dos tensoativos sob essas diferentes condições.

Nesse contexto, o desvio hidrofílico-lipofílico (DHL, em inglês HLD – *hydrophilic-lipophilic deviation*), que é um valor atribuído ao equilíbrio entre a fase aquosa e a fase oleosa, leva em consideração não somente as características moleculares do tensoativo, mas também a influência de diversas variáveis como salinidade da fase aquosa, natureza do óleo, presença de álcoois e temperatura sobre as características do tensoativo (ZAMBRANO et al., 2003). Dessa forma, quando uma formulação apresenta um valor de DHL = 0, o tensoativo não apresenta diferença na preferência pelas fases aquosa e oleosa. Já valores de DHL > 0 indicam que o tensoativo apresenta maior afinidade com a fase oleosa, valores de DHL < 0, demonstram que o tensoativo possui maior afinidade com a fase aquosa (SALAGER et al., 2004).

Além disso, o DHL também pode ser calculado para sistemas não-iônicos e iônicos, usando equações distintas (SALAGER, 2006; McCLEMENTS e RAO, 2011).

O diagrama mostrado na Figura 3 é um mapa de formulação-composição, sendo que a ordenada corresponde ao valor de DHL (ou seja, relacionado com a formulação), e a abscissa corresponde à razão água-óleo (ou seja, relacionado com a composição):

Figura 3 - Dinâmica do comportamento de fases por inversão de fase transicional e catastrófica. (A - quantidades intermediárias de óleo e água no sistema; B - excesso de óleo; C - excesso de água; os sinais + e - representam o sinal do DHL).

Fonte: (Adaptado de ZAMBRANO et al. 2003)

As emulsões localizadas nas áreas A+, A-, B+ e C- são denominadas emulsões “normais”, pois seguem a regra de Bancroft, a qual diz que a fase em que o tensoativo tem maior afinidade tende a ser a fase contínua. Já as emulsões B- e C+ não seguem a regra de Bancroft, sendo denominadas “anormais”. A inversão de fases de uma emulsão pode ser representada pelo cruzamento da linha destacada no mapa, podendo ocorrer em qualquer sentido (SALAGER, 2006; ZAMBRANO et al., 2003).

As inversões de fase transicionais ocorrem por mudanças na formulação, como alterações de parâmetros físico-químicos do tensoativo, tanto na fase oleosa quanto na fase aquosa, podendo alterar a afinidade hidrofílica ou lipofílica do tensoativo. (SALAGER et al., 2004; JAHANZAD et al., 2010; SCHALBART et al., 2010). O tipo mais conhecido dentre tais inversões é a inversão de fase por temperatura (PIT – do inglês - *phase inversion temperature*), que é induzida pela alteração da temperatura enquanto a composição é mantida constante. Nesta técnica todos os componentes do sistema (água, óleo e tensoativo) são misturados na temperatura ambiente sendo ligeiramente agitados; posteriormente há um aumento gradativo da temperatura (ANTON et al., 2007; ANTON; VANDAMME, 2009).

Já o método do ponto de inversão da emulsão (ou EIP, *emulsion inversion point*) é uma inversão de fases catastrófica que ocorre pela adição de uma fase aquosa a uma fase orgânica contendo uma mistura de óleo e tensoativo(s) hidrofílico(s). Dessa forma, há uma mudança na razão mássica entre as fases oleosa/aquosa, desencadeando uma série de transformações, como por exemplo a emulsão água em óleo (A/O) que se transforma com o aumento da fase aquosa em uma emulsão múltipla de óleo/água/óleo (O/A/O) e, posteriormente, em uma emulsão óleo em água (O/A) (McCLEMENTS; RAO 2011).

Essas transformações ocorrem devido ao equilíbrio de separação das gotículas, que em pequenas quantidades de adição da fase aquosa, formam gotas de água, contendo no interior a fase oleosa. No entanto com o aumento do volume de fase aquosa no sistema, o tensoativo passa de um ambiente menos favorável para um mais favorável, e essa migração acarreta o tamanho de gotícula produzida, ocorrendo a formação da emulsão múltipla intermediária, Figura 4. Quando o “teor crítico” de água é excedido, essa migração do tensoativo da fase oleosa para a fase aquosa, atinge o ponto de inversão de fase, passando de uma emulsão água em óleo para óleo em água (BERNEWITZ et al., 2014).

Figura 4 - Representação esquemática do método do ponto de inversão de fases da emulsão.

Fonte: Própria Autoria

A inversão de fase catastrófica depende das alterações nos parâmetros de composição (por exemplo, razão mássica água/óleo). Maiores concentrações de tensoativo e períodos mais longos de agitação favorecem a formação de gotículas de óleo e a composição das estruturas intermediárias (O/A/O). Já baixas concentrações de tensoativo podem ser insuficientes para a solubilização de óleo, ou resultar em gotículas maiores (FERNANDEZ et al., 2004; JAHANZAD et al., 2009; MAYER; WEISS; McCLEMENTS, 2013). Por essa razão, as condições operacionais como intensidade de agitação, vazão de água adicionada, tipo de impelidor, juntamente com a quantidade e o tipo de tensoativo, são altamente relevantes na produção de emulsão pelo método EIP (OSTERTAG; WEISS; McCLEMENTS, 2012; BORRIN et al., 2016).

2.3 Estabilidade físico-química de nanoemulsões

A estabilidade físico-química de uma emulsão está relacionada com a energia livre positiva na interface entre a fase óleo e a fase aquosa. A variação da energia livre na produção das nanoemulsões indica se a emulsão é estável termodinamicamente, porém, não determinam a velocidade no qual suas propriedades variam com o decorrer do tempo, nem apontam o mecanismo físico responsável pela estabilidade cinética (McCLEMENTS; RAO, 2011). Nesse contexto, a estabilidade cinética das nanoemulsões é mais interessante do ponto de vista nas aplicações alimentícias, do que sua estabilidade termodinâmica.

Para entender a estabilidade cinética, deve-se levar em conta a natureza dinâmica das nanoemulsões e as interações entre as gotículas presentes na emulsão. Por apresentarem uma natureza dinâmica, as gotículas se mantêm em um estado contínuo de movimento e chocam-se umas com as outras, devido às forças externas ou ao movimento Browniano, podendo levar a uma formação de gotículas maiores, podendo ocorrer dessa forma a separação de fase (McCLEMENTS, 2005).

Os principais fenômenos físico-químicos que afetam a estabilidade cinética das nanoemulsões são apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Fenômenos físico-químicos que podem afetar a estabilidade das nanoemulsões do tipo óleo em água.

Fonte: (Adaptado de TADROS, 2004)

Dentre os fenômenos descritos, a cremação se dá pela a separação gravitacional devido à ação da força da gravidade sobre as gotículas. Essa separação é resultante da diferença de densidade das gotículas e da fase contínua. Se as gotículas apresentam menor densidade em relação à fase contínua, a tendência é que se desloquem para cima ocorrendo a cremação.

Por sua vez, a floculação é o processo no qual duas ou mais gotículas se juntam, preservando a integridade individual de cada uma (McCLEMENTS; RAO, 2011). Já na coalescência, ocorre a fusão de gotículas, favorecendo a formação de gotas maiores. Quanto maior o tamanho das gotas, menor será a área interfacial diminuindo a ação dos agentes emulsificantes, atuantes na superfície das gotas, tendendo a diminuir a tensão interfacial e aumentar a viscosidade interfacial. A redução da tensão interfacial ocorre devido ao surgimento de forças de expansão que exercem contra a tensão interfacial normal, quando o tensoativo é adsorvido.

No caso da viscosidade interfacial, um aumento desta reflete um crescimento na resistência mecânica das gotas, diminuindo a coalescência. Tal fato ocorre porque apresentam uma maior área superficial por volume aumentando o efeito de fricção (McCLEMENTS, 2007; MAIA FILHO, 2010).

Já o amadurecimento (ou maturação) de Ostwald (em inglês, *Ostwald ripening*) é causado pelo crescimento do tamanho de gota devido à incorporação das gotas menores pelas gotas maiores. Tal fenômeno pode ser entendido pela diferença de energia livre, que nas gotículas pequenas é maior em relação a de gotículas maiores, gerando uma competitividade de difusão, podendo em um tempo infinito, reduzir todas as gotículas para uma única, dessa forma ocorrendo a separação de fase (McCLEMENTS; WEISS, 2005).

O amadurecimento de Ostwald, portanto, pode ser um mecanismo de desestabilização com maior importância em nanoemulsões, devido ao pequeno tamanho das gotas. No entanto, quando comparadas a floculação, coalescência, e separação gravitacional, pode ser mais estável cineticamente, em virtude do tamanho das gotículas, diminuindo a ocorrência de agregação dessas.

2.4 Tensoativos

Tensoativos são moléculas que possuem estrutura divididas em porção(ões) hidrofílica(s) e hidrofóbica(s), e apresentam capacidade de exercer atividade superficial e adsorvente em interfaces, como na superfície de uma gota, protegendo-as de perturbações (McCLEMENTS, 2005). Em relação a formação das emulsões, a função do tensoativo é facilitar o rompimento das gotas a partir da diminuição da tensão superficial, favorecendo a produção de gotas menores, no caso de emulsões formadas pelos métodos de alta de energia.

Já para as emulsões produzidas por métodos de baixa energia, o tensoativo age na formação de pequenas gotas é favorecida, pois tem capacidade de diminuir ainda mais a tensão superficial dependendo das condições operacionais. Portanto a escolha do tensoativo adequado está relacionada ao tipo de nanoemulsão que se deseja produzir. A produção de nanoemulsões é classificada por métodos de alta e baixa energia, nessas condições os tensoativos de baixo peso molecular podem ser utilizados na produção de nanoemulsões por ambos os métodos.

Os tensoativos são classificados como iônicos, não-iônicos e zwitteriônicos, de acordo com suas características elétricas. Os tensoativos não-iônicos são os mais utilizados devido à sua baixa toxicidade, baixa irritabilidade e facilidade de formar nanoemulsões pelos métodos de alta ou baixa energia (JAFARI et al., 2008; McCLEMENTS, 2005).

Em relação aos tensoativos iônicos, os que possuem grau alimentício, são carregados negativamente (McCLEMENTS, 2005). São exemplos, o ácido cítrico com éster de MG (CITREM) e lactilato esteroil de sódio (SSL). Já os tensoativos não-iônicos, são utilizados na em produção de nanoemulsões de grau alimentício, por possuírem baixa toxicidade. Pode-se citar como exemplos, tensoativos do tipo éter polioxietilado (POE) (por exemplo, Brij 97, Brij 30) e ésteres de sorbitano etoxilados (por exemplo, polisorbato ou tweens) (LIU et al, 2006; JAFARI et al, 2007). No presente trabalho foram utilizados o Brij30 (polioxietileno (4) lauril éter) e o Tween 80 (polisorbato 80, monoleato de sorbitan etoxilado), mostrados na Figura 6:

Figura 6: Estruturas químicas dos tensoativos utilizados no presente trabalho de Mestrado: (A) Brij 30; (b) Tween 80.

A diferença entre as estruturas químicas dos tensoativos em questão, interfere diretamente no coeficiente de difusão na fase oleosa, ou seja, está relacionado com a velocidade de migração do tensoativo da fase oleosa para a fase aquosa. No tensoativo, Brij 30, essa velocidade de migração é menor, quando comparado ao tensoativo Tween 80. Fato que pode ser explicado, a diferença de grupos polietoxilados, sendo 4 grupos no Brij 30 e 20 grupos no Tween 80.

Por outro lado, os tensoativos neutros ou zwitteriônicos, possuem em sua estrutura grupos ionizáveis de carga oposta, essa característica proporciona a eles, comportamentos diferentes que podem variar com o pH, apresentando carga líquida negativa, neutra ou positiva. O exemplo mais comumente utilizado em alimentos são os fosfolipídios.

2.5 Óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)

A castanheira que produz a castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma árvore nativa da América do Sul, e que está presente sobretudo na região Amazônica, Figura 6. Seu crescimento se dá em regiões de floresta tropical não-inundadas (YANG, 2009). É tida como uma das espécies de maior relevância econômica da floresta amazônica e, atualmente tem recebido atenção dos pesquisadores com o intuito de obter dados necessários para maximizar sua produção comercial, seus benefícios econômicos, e assegurar o seu uso por períodos mais longos (MASSI et al, 2014; RIBEIRO et al, 2014).

Figura 7 - Amêndoas de castanha do Brasil.

Fonte: Própria Autoria

Figura 8 - Aspecto visual do óleo refinado de castanha do Brasil.

Fonte: Própria Autoria

A castanha do Brasil é rica em ácidos graxos insaturados, que têm sido associados com a prevenção de doenças cardiovasculares, doenças vasculares periféricas e diabetes, Figura 7. Estudos recentes revelam que a ingestão de castanha do Brasil foi eficiente na modulação do perfil lipídico de voluntários saudáveis, auxiliando no aumento de seus níveis de colesterol de alta densidade (HDL) e diminuindo seus níveis de colesterol de baixa densidade (LDL) (COLPO et al, 2014; MACAN, 2018).

Além de rica em lipídios e proteínas, a castanha do Brasil contém notáveis quantidades de vitaminas e minerais (VENKATACHALAM; SATHE, 2006; PIRES, 2012.).

Diversos estudos demonstram que a castanha do Brasil é a maior fonte de selênio entre os alimentos de origem vegetal (SILVA, 2019; DE SOUZA, 2019). Tal mineral está envolvido em complexas reações enzimáticas e metabólicas, como a atividade da glutathione peroxidase, que protege contra o estresse oxidativo por eliminação de peróxidos; além de estar relacionado à ação anticancerígena (VONDERHEIDE et. al, 2002; YANG, 2009).

A castanha do Brasil ainda apresenta quantidades significativas de antioxidantes fenólicos que podem atuar no controle do estresse oxidativo celular. Dessa forma, a castanha do Brasil pode atuar como um alimento nutracêutico, ou ser empregada como ingrediente em produtos desta categoria (MASSI et al., 2014; JHON; SHAHIDI, 2010).

O óleo da castanha do Brasil pode ser extraído através de diferentes processos, a saber:

- (i) extração a frio, frequentemente realizada por prensas hidráulicas ou mecânicas, sendo este o método mais empregado
- (ii) extração sólido-líquido, onde se utilizam solventes como o hexano, éter de petróleo e metanol, entre outros solventes;
- (iii) estudos recentes apontam a extração do óleo por fluido supercrítico (VENKATACHALAM; SATHE, 2006; YANG, 2009).

O perfil de ácidos graxos no óleo de castanha do Brasil consiste sobretudo de ácidos graxos insaturados importantes nutricionalmente, destacando-se os ácidos oleico e linoleico, Tabela 2 (QUEIROGA et al., 2009).

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) do óleo extraído da castanha do Brasil: *Óleo extraído a frio, **Óleo extraído por CO₂ supercrítico, ND = Não Identificado, (-) = Não fornecido pelo autor, (ω 9) = ômega 9, (ω 6) = ômega 6, (ω 3) = ômega 3.

Ácido Graxo	YANG, J. (2009)	SANTOS, O.V. (2012)	SANTOS, O.V. (2013)
Láurico (C 12:0)	ND	0	0,767
Mirístico (C 14:0)	0,06	0,06	0,565
Palmítico (C 16:0)	13,5	14,24	14,04
Palmitoleico (C 16:1)	0,33	0,01	0,016
Margárico (C 17:0)	0,22	-	-
Estearico (C 18:0)	11,77	11,19	10,63
Oleico (C 18:1) (ω 9)	29,09	36,26	34,55
Linoleico (C 18:2) (ω 6)	42,8	37,53	40,15
Linolênico (C 18:3) (ω 3)	0,2	0,08	0,085
Araquidônico (C 20:0)	0,54	-	-
Gadoleico (C 22:1)	0,21	-	-
Behênico (C 22:0)	0,12	-	-
Erucico (C 22:1)	0,34	0,28	0,436
Docosahexaneóico (C 22:6)	ND	0,06	0,108

Fonte: (ROLIM, 2016)

2.6 Estrutura e funções nutricionais da vitamina D₃

As vitaminas são compostos orgânicos presentes nos alimentos, sendo essenciais para o funcionamento normal do metabolismo. A falta de vitaminas, ou *avitaminose*, é o déficit de tais nutrientes no organismo podendo ser provocada pela má absorção do organismo ou pela falta de ingestão vitamínica. A avitaminose pode acarretar uma série de problemas de saúde, como asma, artrite, hipertensão, problemas coronários, câncer, dentre outras (GAO et al., 2008; LUO et al., 2006).

A vitamina D é um pró-hormônio produzido a partir da ação dos raios ultravioleta B na pele. É encontrada sob duas formas: vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colicalciferol). O ergocalciferol é encontrado em plantas, como produto da irradiação de luz ultravioleta em moléculas de ergosterol. Já o colicalciferol é um pré-hormônio derivado de uma série de reações do colesterol, produto da irradiação de luz ultravioleta em moléculas de 7-deidrocolesterol. É uma molécula sintetizada pela epiderme humana, ou que pode também ser ingerida através de alimentos fortificados e/ou suplementação medicamentosa, Figura 8 (BARRAL; SENA et al., 2018; SOUZA et al., 2017).

Figura 9 - Estruturas químicas das vitaminas D₂ e D₃.

Fonte: (PEIXOTO et al. 2012).

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), estima-se que aproximadamente metade da população mundial apresenta deficiência de vitamina D₃ no organismo. A deficiência deste nutriente pode resultar em doenças como raquitismo em lactentes e crianças, e osteomalácia e osteoporose em adultos. Essa deficiência pode ser associada aos hábitos de vida da população, devido à permanência por longos períodos de tempo em lugares fechados, não-expostos ao sol, bem como uma alimentação desbalanceada. Além disso, outros fatores interferem diretamente na absorção da vitamina D₃ pelo organismo, como ingestão de anticonvulsivos ou de medicamentos que diminuem a absorção de colesterol, hipertireoidismo, tuberculose e diabetes por exemplo (FEMKE et al. 2010; SAITO et al., 2008).

A quantidade de alimentos que contêm em sua composição a vitamina D₃ não é grande, sendo que este micronutriente pode ser encontrado de forma mais abundante em carnes de peixes de água fria (BEZERRA, 2016; FRAGA, 2018). Para aumentar a oferta de tal vitamina, portanto, a estratégia de fortificação de alimentos vem ganhando espaço, usando alimentos como sucos, pães e cereais, além de leite e seus derivados (ALMOUAZEN et al., 2013; LUO; TENG; WANG, 2012).

No entanto, em tal processo de fortificação deve-se levar em consideração, além de outros fatores, que como qualquer componente lipofílico, ao ser digerida no trato gastrointestinal (duodeno), a vitamina D₃ a princípio é incorporada às micelas mistas que penetram nos enterócitos por difusão passiva. Dessa forma, a incorporação da vitamina D₃ em alimentos, necessariamente, precisa estar relacionada à presença de uma matriz lipídica que pode facilitar o aumento de sua bioacessibilidade (VAZ et al., 2017). Tal matriz lipídica pode ser, por exemplo, devido à incorporação da vitamina D₃ na sua forma encapsulada, que tem também a função de proteger o micronutriente de fatores de desestabilização durante o processamento do alimento fortificado.

2.7 Iogurte: mercado e enriquecimento com bioativos

Iogurte, segundo a definição do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), é o produto oriundo da fermentação controlada do leite com “cultivos para os simbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aos quais podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto pode conter um máximo de 30% (p/p) de ingredientes não-lácteos” (BRASIL, 2007).

Esse produto lácteo apresenta diversas vantagens sobre a saúde dos consumidores. Além disso, na última década, o consumo de iogurtes aumentou no Brasil, segundo dados do Sistema Brasileiro do Agronegócio (SBA, 2015). Apenas entre 2010 a 2015, o mercado de iogurtes quase dobrou: a receita saiu de R\$ 7,7 bilhões para R\$ 14,5 bilhões (COCO e PALAZZO, 2016). Além disso, o iogurte é um produto que atrai a população por características que vão além do sabor, como a saudabilidade, sendo por isso um sistema ideal para aplicação de sistemas de microencapsulação de bioativos nutracêutico. Por essa razão é alvo de estudos diversos, como apresentado na Tabela 3 (COMUNIAN et al., 2017).

Devido à flexibilidade do uso de diferentes ingredientes na fabricação do iogurte, como por exemplo a adição de polpas de frutas, aromas, fibras e probióticos, surgiu uma grande variedade de tipos de produtos no mercado que acabou impulsionando o seu consumo. Atualmente, há um crescente busca por alimentos relacionados com a saúde, categoria em que o iogurte é o maior representante com crescimento de 136% na demanda (NIELSEN, 2017).

ASSIS (2017) et al. estudaram os efeitos combinados de curcumina e licopeno ou bixina no iogurte na inibição da oxidação do LDL e aumento dos níveis de HDL. Já BARBOSA e GALINA (2017) investigaram a viabilidade de bactérias (*starter* e probióticas) em iogurte. Por sua vez, JUNIOR e seus colaboradores (2016) estudaram a elaboração de iogurtes grego de leite de búfala e a influência da calda de Ginja, no teor de ácido ascórbico e antocianinas.

Tabela 3: Exemplos de trabalhos realizados com iogurtes enriquecidos nos últimos 5 anos.

Título	Autor
ACT. Iogurte enriquecido com curcumina e metformina reduz a dislipidemia e o estresse oxidativo em ratos diabéticos	ROXO et al., 2016
Avaliação sensorial e físico-química de iogurte enriquecido com farinha de linhaça	GARMUS et al., 2016
Elaboração e caracterização físico-química de iogurtes de ameixa adicionados da farinha de chia	SOARES et al., 2019
Farinha do mesocarpo do pequi (caryocar brasiliense cambess): cinética da secagem, propriedades nutricionais, funcionais e enriquecimento de iogurtes	SOUZA, 2015
Physicochemical characterization and sensory evaluation of yogurts incorporated with beta-carotene-loaded solid lipid microparticles stabilized with hydrolyzed soy protein isolate	MOLINA et al., 2018
Propriedades e simulação gastrointestinal in vitro de iogurte adicionado de extrato de Stevia Rebaudiana (Bert.) em pó	CARVALHO, 2017
Efeito da curcumina e carotenoides em iogurte sobre biomarcadores fisio-metabólicos e de estresse oxidativo em modelos de diabetes mellitus tipo 1 e de obesidade/resistência insulínica	ASSIS, 2016

Fonte: Própria Autoria

Portanto, diante do exposto nessa Revisão Bibliográfica, o presente projeto de Mestrado objetivou produzir e caracterizar nanoemulsões de óleo de castanha do Brasil pelo método do ponto de inversão de fase, encapsulando vitamina D₃, e avaliar sua incorporação em iogurte de coco do ponto de vista tecnológico e sensorial.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho de Mestrado teve como objetivo principal a nanoemulsificação de óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para posterior encapsulação de vitamina D₃ e incorporação em iogurte.

Para alcançar tal objetivo, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- Verificação da possibilidade do uso de óleo de castanha do Brasil como fase oleosa e dos tensoativos Brij 30 e Tween 80 como matérias-primas para produção de nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão;
- Determinação de parâmetros operacionais do método EIP para obtenção de formulação (os) estável (is) de nanoemulsões de óleo de soja e de castanha do Brasil;
- Encapsulação da vitamina D₃ nas nanoemulsões produzidas;
- Avaliação da estabilidade físico-química das nanoemulsões encapsulando vitamina D₃ ao longo do tempo de armazenagem;
- Avaliação da estabilidade das nanoemulsões de óleo de castanha do Brasil em diferentes condições típicas de processamento de alimentos, como aquecimento, resfriamento, mudanças de pH, força iônica e presença de diferentes concentrações de sacarose;
- Avaliação tecnológica e sensorial da incorporação das nanoemulsões encapsulando vitamina D₃ em iogurtes de coco.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

- Para a produção das nanoemulsões: óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) (Miragina, Miragina, AC, Brasil) e o óleo de soja comercial (Liza, Cargill, Mairinque, SP, Brasil). Tensoativos: polioxietileno monooleato de sorbitana (polisorbato 80, ou Tween 80, Synth, Diadema, SP, Brasil) e o dodecil éter de polietilenoglicol (Brij 30, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Benzoato de sódio foi utilizado como conservante (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). A água deionizada utilizada nos experimentos foi proveniente de um sistema de purificação Direct Q3® (Millipore, Billerica, MA, EUA). O bioativo encapsulado foi a vitamina D₃ (colicalciferol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Para quantificação da vitamina D₃: vitamina D₃, (colicalciferol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); metanol grau HPLC (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil).
- Para quantificação da oxidação lipídica nas nanoemulsões: ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); ácido tricloroacético (TCA, Supelco, Pennsylvania, EUA); tetraoxipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); cloreto de bário diidratado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); ácido Clorídrico (Supelco, Pennsylvania, EUA); sulfato de Ferro II (Supelco, Pennsylvania, EUA), etanol absoluto (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- O iogurte foi de origem da Empresa de Laticínios Jamava, portanto seguiu os respectivos processos e padrões de produção da empresa em questão. Como aditivos, utilizou-se aroma de coco (Rica Nata, Piracema, MG, Brasil) e polpa de coco (Rica Nata, Piracema, MG, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Determinação das condições operacionais para a produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão (emulsion inversion point - EIP)

A produção das nanoemulsões seguiu a metodologia do ponto de inversão da emulsão (EIP), à temperatura ambiente (aproximadamente 25° C), baseando-se nos protocolos descritos por Borrin et al. (2016) e de Carli et al. (2018), esquematizado na Figura 9. A fase oleosa, composta por óleo vegetal (óleo de soja ou óleo de castanha do Brasil), e dos tensoativos (Tween 80 ou Tween 80 e Brij 30), foi inicialmente agitada magneticamente durante 15 min. Em seguida, foi adicionada a fase aquosa (água e benzoato de sódio) por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex, Easy-Load II, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), com vazão variando de 8 a 16 mL/min, enquanto a mistura (fase oleosa + fase aquosa) foi agitada mecanicamente, em intensidades variando de 300 a 700 rpm. A Figura 10 mostra as condições operacionais testadas para produção das nanoemulsões. Por fim, após a completa adição da fase aquosa, a dispersão resultante continuou a ser agitada com intervalos de tempo que variavam entre 10 e 30 min.

Figura 10 - Representação esquemática do processo para produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão.

Fonte: Adaptado de BORRIN (2015)

Figura 11 - Condições operacionais utilizadas na produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão.

Fonte: Própria Autoria

4.2.2 Experimentos para definição da razão tensoativo/óleo (SOR – surfactant/oil ratio) e influência da presença do tensoativo Brij 30

Para a avaliação da influência do valor de SOR (razão tensoativo/óleo) na estabilidade das emulsões produzidas, a concentração de óleo de soja foi fixada em 10% (10 g/100 g nanoemulsão), a intensidade de agitação em 500 rpm e vazão de fase aquosa em 12 mL/min, seguindo o protocolo de Borrin et al. (2016). As emulsões foram deixadas em repouso por 24 h e logo após foram avaliadas visualmente. Posteriormente, as melhores relações SOR obtidas para o óleo de soja (ou seja, aquelas em que as nanoemulsões permaneceram com tamanho médio de gota estáveis por 30 dias) foram testadas para produzir nanoemulsões com o óleo de castanha do Brasil, Tabela 4.

Tabela 4 - Nomenclatura usada para denominar as diferentes razões nas misturas dos tensoativos Tween 80 e Brij 30, durante a produção das nanoemulsões de óleo de soja e óleo de castanha do Brasil. As porcentagens são em relação à massa total de tensoativo usada.

Amostra	Tween 80	Brij 30
T10	10%	90%
T30	30%	70%
T50	50%	50%
T70	70%	30%

Fonte: Própria Autoria

As amostras que apresentaram maior estabilidade, dos valores de SOR foram selecionados e a partir desses, investigou-se a influência da presença do tensoativo Brij 30, utilizando-se diferentes formulações, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Composição das formulações das amostras com diferentes valores de SOR.

SOR	Formulação (S=SOR)	Fase oleosa (g/100 g)			Fase aquosa (g/100 g)	
		Tween 80	Brij 30	Óleo	Água deionizada	Benzoato de sódio
1,25	T10/S1,25	2,5	22,5	20	54,98	0,02
1,25	T30/S1,25	7,5	17,5	20	54,98	0,02
1,25	T50/S1,25	12,5	12,5	20	54,98	0,02
1,25	T70/S1,25	17,5	7,5	20	54,98	0,02
1,5	T10/S1,5	3	27	20	49,98	0,02
1,5	T30/S1,5	9	21	20	49,98	0,02
1,5	T50/S1,5	15	15	20	49,98	0,02
1,5	T700/S1,5	21	9	20	49,98	0,02
1,75	T10/S1,75	3,5	31,5	20	44,98	0,02
1,75	T30/S1,75	10,5	24,5	20	44,98	0,02
1,75	T50/S1,75	17,5	17,5	20	44,98	0,02
1,75	T70/S1,75	10,5	24,5	20	44,98	0,02

Fonte: Própria Autoria

4.2.3 Determinação do ponto de inversão da emulsão

Os valores da condutividade elétrica, obtidos durante a inversão de fases, foram obtidos utilizando-se um condutivímetro digital (DM-32, Digimed, São Paulo, SP, Brasil), aferido com solução padrão de KCl 0,1N, na temperatura de 25°C. As curvas de condutividade vs. % fase aquosa adicionada foram obtidas em duplicata (BORRIN et al., 2016; DE CARLI et al., 2018).

4.2.4 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de gota

Para determinação do diâmetro médio hidrodinâmico e da distribuição de tamanho das gotas, foi utilizada espectroscopia de correlação de fótons (PCS, *photon correlation spectroscopy*, ou espalhamento dinâmico de luz) utilizando-se o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA) a 25 °C. O comprimento de onda do laser foi 657 nm, em ângulo de incidência a 90°. As amostras foram diluídas em água deionizada para evitar o efeito de espalhamento múltiplo. Todas as análises de dados foram realizadas pelo software incluso no sistema (90Plus). Foi estabelecida a realização de dez corridas para cada medida.

4.2.5 Encapsulação e quantificação de vitamina D3 nas nanoemulsões

A encapsulação de vitamina D₃, (colicalciferol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foi realizada adicionando-a diretamente na fase oleosa, utilizando-se três diferentes massas de bioativo, tendo como média os valores indicados pela Organização Mundial de Saúde, a saber: 6,25, 12,5 e 18,75 mg. Para a quantificação da vitamina D₃, utilizou-se amostras de nanoemulsão (2,0 g), que foram colocadas em tubos de centrifuga de 15 mL. Após a adição de 5 mL de metanol, a mistura foi agitada em vórtex (IKA, Staufen, Alemanha) por 10 s, e em seguida mantida em banho ultrassônico (410US, Marte, São Paulo, SP, Brasil), à temperatura ambiente, por 5 min. A seguir, ocorreu a centrifugação (5430R, Eppendorf, Berzdorf, Alemanha) por 5 min a 6890 g, a 4 °C. O extrato metanólico foi então transferido para um balão volumétrico de 10 mL, que foi completado com metanol até o volume de 10 mL.

O extrato metanólico foi então filtrado através de uma membrana de nylon (0,45 µm; 13 mm, MFS, Dublin, CA, EUA) sendo recolhido no interior de frascos de 2 mL, sendo posteriormente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (protocolo adaptado de PAUCAR et al., 2016). A quantidade de vitamina D₃ encapsulada foi determinada em condições analíticas modificadas a partir da metodologia descrita por Staffas e Nyman (2003). Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Prominence Modular HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japão) controlado por software LC Solution (v. 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 (250 mm de comprimento x 4,6 mm d.i. e 4,6 µm d.p. – Shim-Pack VP-ODS, Shimadzu, Kyoto, Japão) foi mantida a 35 °C. Metanol e acetonitrila foram usados como fase móvel na proporção respectiva de 90:10 (v/v) com fluxo constante de 1,60 mL/min. A detecção espectrofotométrica foi realizada no comprimento de onda de 265 nm e tempo total de corrida igual a 10 min. A identificação foi realizada por comparação com o tempo de retenção- 7,30 min – do padrão de vitamina D₃. A quantificação foi realizada por padronização externa a partir das áreas obtidas de análises em triplicata, das amostras com três diferentes concentrações da vitamina D₃, conforme citado anteriormente.

4.2.6 Quantificação da oxidação lipídica nas nanoemulsões

A oxidação lipídica nas nanoemulsões foi determinada por índice de peróxido (produtos de oxidação primária) e substâncias reagentes ao ácido barbitúrico (TBARS, relacionados com os produtos de oxidação lipídica secundária). Para a determinação do índice de peróxido, a fase oleosa foi extraída pela adição de 1,5 mL de solução isooctano/isopropanol (3:2 v/v) a 1,5 mL de amostra e agitação em vórtex por 10 s. Esta extração foi repetida três vezes e, em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por 30 min para separação de fases.

Decorrido esse tempo, um volume de 0,2 mL da fase superior foi coletado e agitado em vórtex com 2,8 mL de solução clorofórmio: metanol (7:3 v/v). Em seguida, 15 µL de solução de tiocianato de amônio (30% m/v) foram adicionados às amostras, com agitação em vórtex por 4 s. Posteriormente, 15 µL de solução de Fe (II) foram adicionados às amostras, com agitação em vórtex por 4 s. Logo após as amostras foram deixadas em repouso por 5 min e os valores de absorbância foram determinados a 500 nm (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA).

Por sua vez, a concentração de hidroperóxidos foi determinada com o uso de curva padrão obtida a partir de solução de Fe (III), baseado na adaptação do protocolo original descrito por Shanta e Decker (1994). O índice de peróxido foi determinado a partir da Eq. (1), expressa em miliequivalentes (meq) de peróxido / kg de fase oleosa, na qual:

PV = valor de peróxido;

abs = absorbância da amostra;

m = coeficiente angular da curva de calibração;

mo = massa em gramas da fase oleosa,

peso atômico do Fe = 55,84

2 = fator para converter miliequivalente de Fe para miliequivalente de peróxido.

$$PV = \frac{Abs}{55,84 \times m \times mo \times 2} \quad (1)$$

Para a obtenção da solução de Fe (II), 0,4 g de cloreto de bário diidratado foram adicionados à 50 mL de água deionizada. Separadamente, 0,5g de sulfato de Fe (II) foram adicionados a 50 mL de água deionizada. Posteriormente, essas duas soluções foram misturadas sob agitação magnética constante e, em seguida, 2 mL de solução de ácido clorídrico 10N foram adicionados. 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).

A determinação da extensão da oxidação lipídica secundária das nanoemulsões foi realizada quantificando-se as substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Uma solução de TCA (ácido tricloroacético) e TBA-HCl foi preparada pela combinação de 15 g de TCA, 0,33 g de TBA, 1,8 mL de 12 M de HCl e 83 mL de água deionizada. A esta solução acrescentou-se 3 mL de BHT 2% (em massa) em etanol, e desta, extraiu-se 2 mL de solução que foram misturados com 2 mL da amostra de emulsão. A seguir, foram submetidos ao processo de aquecimento a 100°C durante 15 min, resfriados até a temperatura ambiente e centrifugados a 1000 g por 15 min (Z326K, Hermle, Wehingen, Alemanha).

Após a etapa de centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a absorbância medida a 532 nm e 600 nm (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA), para correção da turbidez. As concentrações de TBARS foram obtidas a partir da curva padrão, preparada com 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) (LEE et al., 2011).

4.2.7 Avaliação da estabilidade das nanoemulsões em diferentes condições de processamento

A estabilidade físico-química das nanoemulsões contendo vitamina D₃ foi avaliada em condições típicas de *stress* encontradas durante o processamento e o armazenamento de alimentos. Nesta etapa, as nanoemulsões foram submetidas a diferentes condições de pH, presença de sacarose, e binômio tempo vs. temperatura, a fim de analisar o comportamento da emulsão, frente a variações de acidez, temperatura, visando aplicação em matrizes alimentícias, conforme esquematizado na Figura 11.

A influência do *stress* relacionado com ciclos de congelamento e descongelamento também foi avaliado. As nanoemulsões foram armazenadas sob refrigeração e avaliadas em relação à distribuição do tamanho de partícula, semanalmente, a partir do dia de produção, durante um período de 30 dias (protocolo baseado em GOMES et al., 2017).

Figura 12 - Condições de *stress* utilizadas na avaliação da estabilidade das nanoemulsões.

pH	Sacarose	Binômio tempo vs. temperatura	Congelamento
<ul style="list-style-type: none">• Alíquotas de 10 mL de emulsão• pH=3• pH=4• pH=5• pH=6	<ul style="list-style-type: none">• Alíquotas de 10 mL de emulsão• Adição de sacarose (g/100 g)<ul style="list-style-type: none">• 1• 1,5• 2• 2,5	<ul style="list-style-type: none">• Alíquotas de 10 mL de emulsão• Tempo vs. temperatura<ul style="list-style-type: none">• 15 s a 72 °C	<ul style="list-style-type: none">• Alíquotas de 10 mL de emulsão• Dois ciclos de congelamento e descongelamentos, 24 horas• Temperatura da etapa de congelamento: -2 °C• Temperatura da etapa de descongelamento: 25 °C

Fonte: (Adaptado de ISAAC et al., 2008 e GOMES et al., 2017)

4.2.8 Formulação do iogurte de coco enriquecido com vitamina D₃

As nanoemulsões produzidas foram incorporadas em iogurtes sabor coco, que foram produzidos na Laticínios Jamava, localizada em Santa Cruz da Conceição - SP. Adicionou-se aos iogurtes as nanoemulsões em quatro tratamentos, conforme mostrado na Tabela 6:

- T100/S1,50 (C) – iogurte enriquecido com emulsão produzida com óleo de castanha do Brasil e tensoativo Tween 80;
- T70/S1,50 (C) – iogurte enriquecido com emulsão produzida com óleo de castanha do Brasil e tensoativos Tween 80/Brij 30
- T100/S1,50 (S) – iogurte enriquecido com emulsão produzida com óleo de soja e tensoativo Tween 80;
- T70/S1,50 (S) – iogurte enriquecido com emulsão produzida com óleo de soja e tensoativos Tween 80/Brij 30

Tabela 6 - Formulações dos iogurtes enriquecidos com nanoemulsões.

iogurte (tratamento)	Emulsão (g/100 g)	Aroma de coco (g/100 g)	Polpa de coco (g/100 g)
T100/S1,5 (C)	0,5	0,5	5
T70/S1,5 (C)	0,5	0,5	5
T100/S1,5 (S)	0,5	0,5	5
T70/S,15 (S)	0,5	0,5	5

Fonte: Própria Autoria

4.2.9 Análises microbiológicas do iogurte

As análises microbiológicas dos iogurtes foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microbiologia, no Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-USP.

4.2.9.1 Contagem de fungos filamentosos e leveduras

Para determinação de fungos e leveduras foram realizadas diluições 10^{-2} e 10^{-3} , e 0,1 mL das diluições selecionadas foram inoculados em placas de Petri contendo o ágar PDA acidificado já solidificado. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, espalhou-se o inóculo cuidadosamente na placa até sua completa absorção. As placas foram incubadas, sem inverter, a 25 ± 1 °C, por 28 dias.

4.2.9.2 Contagem de bactérias lácticas

Pipetou-se 1 mL de iogurte em 9 mL de diluente água peptonada. As diluições foram 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Foi feito plaqueamento por profundidade (colocou-se 1 mL da amostra e verteu-se o meio MRS -Man, Rogosa e Sharpe- sobre a amostra). Após o meio solidificado, colocaram-se as placas invertidas na estufa, a 37 °C por 28 dias.

4.2.9.3 Contagem de coliformes totais e termotolerantes

Para determinação de coliformes totais e termotolerantes realizaram-se diluições 10^{-2} e 10^{-3} , e inoculou-se 0,1 mL das diluições em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton já solidificado. Espalhou-se o inóculo, cuidadosamente, com auxílio de uma alça de Drigalsky até sua completa absorção. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a (37 ± 1 °C) por (21 ± 3 h) para enumeração simultânea de *E. coli* e coliformes totais, que foram repetidas durante 28 dias.

4.2.10 Análises Reológicas

Os ensaios reológicos dos iogurtes foram desenvolvidos em reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, EUA), com geometria de placas paralelas, 60 mm de diâmetro e 1 mm de gap, a 10 °C. Para a acomodação das amostras no reômetro e relaxação de quaisquer tensões, foi fixado um intervalo de 2 minutos entre a adição dos iogurtes e o início de cada experimento. As curvas de fluxo foram obtidas a partir da variação da taxa de deformação de 0,01 a 100 s⁻¹ (curva ascendente I), de 100 s⁻¹ a 0,01 s⁻¹ (curva descendente) e novamente de 0,01 a 100 s⁻¹ (curva ascendente II), visando avaliar e reduzir efeitos da tixotropia (Cruz et al., 2013). As curvas ascendentes I e II foram analisadas utilizando-se os modelos Lei da Potência, de acordo com a Equação (2), e Herschel-Bulkley, de acordo com a Equação (3).

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (2)$$

$$\sigma = \sigma_0 + K\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

Onde: K é o índice de consistência (Pa.sn); σ a tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ a taxa de deformação (s⁻¹); e, n o índice de comportamento de fluxo (adimensional).

Os resultados foram analisados usando o software de análise de dados Advantage V.5.3.1 Reologia (TA Instruments, New Castle, EUA) e modelados usando solver (método GRG) do Excel. Os valores de tixotropia das amostras foram determinados a partir da área de histerese entre as curvas ascendente I e descendente utilizando o software Origin. Já os valores de viscosidade aparente foram determinados para a taxa de deformação fixa de 11 s⁻¹.

4.2.11 Análise Sensorial

A avaliação sensorial dos iogurtes foi realizada por meio de teste afetivo, a fim de avaliar a aceitação do consumidor ao produto utilizando-se escalas hedônicas. Recrutou-se aproximadamente 100 provadores, de ambos os sexos e diferentes faixas etárias. As amostras de iogurte foram mantidas sob refrigeração. Aos provadores foi solicitado assinalar, a cor, sabor, textura, aroma, aceitação, a frequência de consumo e a intenção de compra.

O modelo de ficha utilizada para preenchimento dos provadores se encontra no Anexo 1. As amostras (I – iogurte sem emulsão; IC – iogurte com emulsão com óleo de castanha do Brasil; IS – iogurte com emulsão com óleo de soja), foram apresentadas de forma codificada, em números contendo 3 algarismos, escolhidos de tabela estatística em ordem aleatória, dos dígitos 1 a 9 arranjados em grupos de 3 colunas (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1991).

O ensaio ocorreu com a prévia autorização do Comitê de Ética da FZEA/USP, de acordo com normas para Estudos com Humanos da Plataforma Brasil (Ministério da Saúde, Brasil), com número de protocolo 3.338.820. Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram assinados por cada um dos provadores em todas as sessões realizadas. Os referidos testes foram conduzidos no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos/FZEA - USP.

4.2.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System), versão 9.2, por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinações da influência da razão tensoativo/óleo (SOR) e da presença do tensoativo Brij 30 na formação das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão

Nesta etapa do estudo todas as amostras produzidas com $SOR = 1,75$ apresentaram uma viscosidade muito elevada, o que pode ter sido resultante da presença de tensoativo em excesso no sistema. Tal fato pode ter levado à formação de estruturas diferentes de emulsões, como fases hexagonais, que são bastante viscosas. O mesmo fato ocorreu com a amostra T10/S1,50, provavelmente pelo mesmo motivo.

Por outro lado, as amostras T10/S1,25, T30/S1,25 e T50/S1,25 com $SOR = 1,25$ apresentaram separação de fases em menos de 7 dias após a produção. No caso da amostra T30/S1,25 houve também a formação de bolhas durante a produção. Por sua vez, as amostras T30/S1,5, T50/S1,5 e T70/S1,5, com $SOR = 1,5$, assim como a amostra T70/S1,25, com $SOR = 1,25$, mantiveram-se visualmente estáveis e fluidas durante a estocagem.

Esse resultado corrobora resultados obtidos em estudos no grupo de pesquisa (BORRIN et al., 2016; DE CARLI, 2017; DE CARLI et al., 2018), em que amostras com $SOR = 1,5$ apresentaram maior estabilidade e melhores características (menores viscosidades e diâmetro médio de partícula) para aplicação em alimentos. Os resultados de diâmetro médio de gota podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões preparadas com óleo de soja, durante o período de 28 dias de estocagem

Amostra	Diâmetro médio (nm)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
T30/S1,5	349 ^A ± 8,0	507 ^B ± 3,8	999 ^C ± 6,2	-	-
T50/S1,5	375 ^A ± 3,5	423 ^A ± 7,4	483 ^B ± 5,2	539 ^C ± 2,1	712 ^C ± 3,9
T70/S1,25	282 ^A ± 2,8	244 ^A ± 3,2	202 ^A ± 2,2	218 ^A ± 7,2	242 ^A ± 4,2
T70/S1,5	265 ^A ± 3,2	268 ^A ± 2,5	289 ^A ± 1,6	307 ^B ± 1,2	329 ^B ± 2,3
T100/S1,5	177 ^A ± 5,3	165 ^A ± 2,8	197 ^A ± 3,1	215 ^A ± 2,2	231 ^A ± 1,1

A média das amostras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na mesma linha (ou seja, para cada formulação) não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

É válido ressaltar que análises preliminares revelaram que as emulsões formuladas apenas com Tween 80 apresentaram maior estabilidade em comparação às demais formulações. Devido a essas observações em relação às nanoemulsões produzidas com óleo de soja, decidiu-se dar continuidade ao trabalho utilizando-se as quatro formulações que permaneceram estáveis, além de uma amostra contendo somente Tween 80 como tensoativo (que é sabidamente estável por longos períodos de armazenamento), utilizando-se óleo de castanha do Brasil.

5.2 Produções de nanoemulsões com óleo de castanha do Brasil

As nanoemulsões com óleo de castanha do Brasil foram produzidas utilizando-se as formulações que permaneceram estáveis ao serem preparadas com o óleo de soja (T70/S1,25; T70/S1,5; T50/S1,5; T30/S1,5 e T100/S1,5). No entanto, o comportamento no que diz respeito à estabilidade das nanodispersões foi diferente, pois percebeu-se que as nanoemulsões produzidas com o óleo de castanha do Brasil apresentaram separação de fases num menor tempo em relação às produzidas com óleo de soja, conforme mostrado na Tabela 8.

A hipótese defendida para explicar esse comportamento pode estar relacionado com a presença de uma maior quantidade de fosfolípidios no óleo de castanha do Brasil do que no óleo de soja, devido a um processo menos eficiente de degomagem do óleo de castanha do Brasil, essa maior quantidade de fosfolípidios, acaba influenciando na estabilidade das emulsões, por estes apresentarem característica emulsificante, e conseqüentemente há uma concorrência com os tensoativos Tween 80 e/ou Brij 30, o que interfere diretamente no processo de formação das emulsões.

Tal hipótese tem como sustentação a análise do teor de fósforo presente no óleo de castanha do Brasil, que constatou um teor de 32 mg/kg, valor superior quando comparado a óleos que passaram por um processo mais eficiente de degomagem com valores de teor de fósforo < 10 mg/kg (Dijkstra, 2010; JIANG et. al, 2014; SAMPAIO e BARBOSA, 2018).

Tabela 8 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões produzidas com óleo de castanha do Brasil, durante o período de 28 dias de estocagem.

Amostra	Diâmetro médio (nm)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
T30/S1,5	203 ^A ± 3,4	-	-	-	-
T50/S1,5	234 ^A ± 4,1	505 ^B ± 8,7	728 ^C ± 3,1	-	-
T70/S1,25	191 ^A ± 3,5	-	-	-	-
T70/S1,5	186 ^A ± 3,1	265 ^B ± 2,5	299 ^C ± 2,3	319 ^D ± 2,5	359 ^E ± 3,6
T100/S1,5	151 ^A ± 3,6	163 ^A ± 1,9	198 ^B ± 4,6	212 ^C ± 2,9	225 ^D ± 4,7

A média das amostras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na mesma linha (ou seja, para cada formulação) não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

5.3 Produção de nanoemulsões com óleo de castanha do Brasil: variação de parâmetros operacionais

Dentre os parâmetros operacionais importantes no método EIP estão: intensidade de agitação mecânica, vazão de fase aquosa e tempo de agitação após a adição da fase aquosa sobre a fase oleosa. Portanto, foram realizados experimentos variando-se cada um desses parâmetros em separado.

Em relação ao tempo de agitação após a adição da fase aquosa, amostras produzidas com 5, 10 e 30 min não se mantiveram estáveis durante o armazenamento. De uma forma geral, é possível afirmar que a variação deste tempo de agitação após a adição da fase aquosa interferiu fortemente na estabilidade das nanoemulsões, pois quanto mais curto o tempo, menor a estabilidade dos sistemas formados. No entanto, nenhum dos três tempos utilizados foi suficiente para permitir a formação de nanoemulsões estáveis.

Observou-se que a nanoemulsão T50/S1,5 não apresentou separação de fases. No entanto, se apresentou altamente viscosa, o que pode sugerir a formação de estruturas que não sejam gotas emulsionadas.

Para os experimentos variando-se a intensidade de agitação, foram realizados testes utilizando-se 300 rpm e 700 rpm, uma vez que os experimentos preliminares com intensidade de agitação de 500 rpm resultaram em emulsões estáveis. Nas amostras T70/S1,5, pode-se observar que ocorreu separação de fases, enquanto nas amostras T50/S1,5, tal fato não ocorreu, mas estas se mostraram altamente viscosas e esse aumento da viscosidade pode estar relacionado com a formulação das emulsões. Os resultados obtidos em relação aos testes com variação da intensidade de agitação e os diâmetros médios das amostras estão descritos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões produzidas com óleo de castanha do Brasil, com intensidade de agitação de 300 rpm.

Amostra	Diâmetro médio (nm)		
	Dia 1	Dia 7	Dia 14
T30/S1,5	281 ^A ±1,6	497 ^B ±5,9	-
T50/S1,5	276 ^A ±2,0	503 ^B ±7,3	-
T70/S1,25	212 ^A ±4,3	547 ^B ±3,7	-
T70/S1,5	238 ^A ±5,3	499 ^B ±2,8	-

* A, B: a média das amostras seguidas pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

Tabela 10 - Diâmetros hidrodinâmicos médios de gota das nanoemulsões produzidas com óleo de castanha do Brasil, com intensidade de agitação de 700 rpm.

Amostra	Diâmetro médio (nm)		
	Dia 1	Dia 7	Dia 14
T30/S1,5	220 ^A ±3,8	415 ^B ±6,3	-
T50/S1,5	241 ^A ±3,6	331 ^B ±5,5	417 ^C ±8,4
T70/S1,25	190 ^A ±3,6	422 ^B ±3,8	-
T70/S1,5	213 ^A ±1,8	406 ^B ±3,7	-

* A, B, C: a média das amostras seguidas pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

Figura 13 - Resultados obtidos com a variação nas condições operacionais na produção das nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão.

Fonte: Própria Autoria

Portanto, de acordo com os resultados mais satisfatórios obtidos, Figura 12, em termos de estabilidade das nanoemulsões em relação ao diâmetro médio de partícula ao longo do tempo, determinou-se para a etapa seguinte deste trabalho a utilização das formulações apresentadas na Tabela 11:

Tabela 11 - Condições experimentais com os melhores resultados (formulação e operação), para as nanoemulsões produzidas com os óleos de castanha do Brasil ou soja.

Formulação			Condições operacionais		
Fase oleosa	SOR	Composição em tensoativos	Tempo de agitação após adição da fase aquosa	Intensidade de agitação	Vazão de fase aquosa
			(min)	(rpm)	(mL/min)
Soja	1,5	T70/S1,5	30	500	16
	1,5	T100/S1,5			
Castanha do Brasil	1,5	T70/S1,5	30	500	16
	1,5	T100/S1,5			

Fonte: Própria Autoria

5.4 Determinação do ponto de inversão da emulsão (EIP)

Para se determinar o ponto em que ocorre a inversão das fases durante a produção das nanoemulsões pelo método EIP, foram realizados testes para obtenção de curvas de condutividade enquanto a fase aquosa era adicionada ao sistema. A Figura 13 mostra as variações da condutividade elétrica em função da adição da fase aquosa durante a produção das nanoemulsões:

Figura 14 - Comportamento da condutividade, durante a adição da fase aquosa no processo de produção das nanoemulsões, com óleo de soja (azul); castanha do Brasil (vermelho) e presença de tensoativos Tween 80 e Brij 30 na proporção 70:30) e com óleo de soja (amarelo); castanha do Brasil (verde) e presença do tensoativo Tween 80).

Fonte: Própria Autoria

Pode-se observar que a condutividade elétrica permaneceu baixa enquanto baixas porcentagens de água estavam presentes no sistema, indicando que o óleo de ainda era a fase contínua. Houve um aumento da condutividade elétrica entre 10 e 30 % de fase aquosa adicionada no sistema com destaque para óleo de castanha que apresentou valores de condutividade elétrica ligeiramente maiores que o óleo de soja em ambos os experimentos.

Essa variação pode estar relacionada com a presença de eletrólitos na fase aquosa da emulsão, e que não são encontrados na fase oleosa. Ainda pode se levar em consideração que essa variação de condutividade tenha relação com a média e distribuição de tamanhos de gota, ou seja a condutividade da emulsão pode estar variando com a proporção de sua fase contínua (SALAGER, 2000).

Para ambos os óleos, há uma tendência de a condutividade continuar a crescer, porém de forma menos acentuada. Tal fato pode ser relacionado a concentração crítica de água para a inversão de fase catastrófica, devido ao fato do aumento do volume de gotículas de água. Resultados semelhantes foram obtidos por De Carli et al. (2018) e Borrin et. al. (2016), que determinaram o ponto de inversão das nanoemulsões produzidas pelo método de inversão catastrófica, ocorreu em torno de 30% de adição de fase aquosa.

5.5 Quantificação de vitamina D3 encapsulada nas nanoemulsões

Foram testadas três concentrações diferentes de vitamina D₃, a fim de tentar maximizar a adição de vitamina nas emulsões, baseado nas recomendações da Organização Mundial da Saúde. No entanto dentre as formulações testadas, constatou-se uma maior biodisponibilidade de vitamina D₃ durante o período de armazenamento, apenas as amostras com 12,5 mg de vitamina, por essa razão essa concentração foi a escolhida para dar continuidade ao trabalho

Os resultados de quantificação de vitamina D₃ nas nanoemulsões de óleo de soja e de castanha do Brasil podem ser visualizados na Figura 14:

Figura 15 - Quantificação da concentração de vitamina D₃ nas nanoemulsões durante o período de 30 dias de estocagem, produzidas com óleo de soja e castanha do Brasil, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30. Legenda: —●— soja T70/S1,5, —●— castanha do Brasil T100/S1,5, —●— soja T100/S1,5, —●— castanha do Brasil T70/S1,5.

Fonte: Própria Autoria

Em relação aos tensoativos, pode-se observar que a vitamina D₃ foi mais bem preservada nas nanoemulsões produzidas somente com Tween 80, o que pode estar relacionado com a estabilidade observada anteriormente, uma vez que formam emulsões mais estáveis em relação as emulsões com uma mistura de tensoativos (Brij30 + Tween 80).

Já na comparação entre os óleos, o óleo de soja favoreceu a preservação de praticamente toda a vitamina D₃ encapsulada nas nanoemulsões. Uma das hipóteses para tal fato pode ter relação com a quantidade de antioxidantes presentes em cada óleo. Esses antioxidantes devem estar em maior quantidade no óleo de soja, interferindo na proteção da vitamina, uma vez que parte desta vitamina está presente na interface das gotículas, exposta aos agentes oxidantes.

Consequentemente, tais antioxidantes protegeriam durante um maior período a vitamina D₃ ao longo do tempo de armazenagem da emulsão. Além disso, a provável presença de fosfolipídios no óleo de castanha do Brasil, como já mencionado devido ao alto teor de fósforo, tem direta relação com a maior instabilidade da interface formada nas gotas de nanoemulsões de óleo de castanha do Brasil, em comparação com as gotas de óleo de soja. Como essa interface é também responsável pela proteção do bioativo durante o período de armazenagem, pois é uma barreira à entrada de agentes oxidantes na gota de óleo, quanto menos estável ela for, provavelmente menos protegido o bioativo encapsulado estará.

5.6 Quantificação da oxidação lipídica nas nanoemulsões

Para determinação dos produtos primários da oxidação, fez-se a análise de índice de peróxido, enquanto a análise de TBARS foi utilizada para quantificar os produtos secundários da oxidação lipídica. Os resultados obtidos de índice de peróxido estão apresentados na Figura 15.

Figura 16 - Resultados da análise de índice de peróxidos das nanoemulsões contendo óleo de soja e castanha do Brasil, durante o período de 30 dias de estocagem, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30. Legenda: —●— soja T100/S1,5, —●— castanha do Brasil T100/S1,5, —●— soja T70/S1,5, —●— castanha do Brasil T70/S1,5).

Fonte: Própria Autoria

A partir dos resultados obtidos pode-se observar que todas as amostras apresentaram diferenças significativas na primeira semana de estocagem na estabilidade oxidativa, independentemente do óleo utilizado. Porém, a concentração de tensoativos pareceu interferir no resultado. Para todos os tratamentos, houve um decréscimo nos valores do índice de peróxido durante a estocagem. Além destes índices estarem abaixo de outros encontrados na literatura (DORM et al., 2017; OLIVEIRA, 2018).

O comportamento observado pode ser explicado pela ocorrência da auto oxidação dos lipídios que compõem o produto, sendo que nas primeiras etapas da oxidação a taxa de formação dos hidroperóxidos é superior à sua taxa de decomposição. No entanto, na segunda fase da oxidação esses hidroperóxidos começam a se decompor de uma forma mais acelerada à medida que sua taxa de formação aumenta (AKARPAT et al. 2008).

Em relação a valores absolutos todas as amostras apresentaram valores similares e baixos quando comparados aos resultados encontrados na literatura, não havendo grande discrepância durante todo o período de armazenamento (ZÁCARI, 2008). Fazendo um paralelo com os valores de TBARS, como não houve um aumento significativo durante o período de armazenamento, o que indicaria oxidação secundária. Pressupõe-se que os hidroperóxidos podem ter sido degradados em compostos que não podem ser detectados na análise de TBARS, tais como cetonas, álcoois, aldeídos, ácidos orgânicos voláteis ou epóxi, Tabela 12 (SHAHIDI e ZHONG, 2010).

Figura 17 - Resultados da análise de quantificação de produtos secundários da oxidação lipídica (por quantificação de TBARS) das nanoemulsões, durante o período de 30 dias de estocagem, produzidas com óleo de soja e castanha do Brasil, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30. Legenda: —●— soja T100/S1,5, —●— castanha do Brasil T100/S1,5, —●— soja T70/S1,5, —●— castanha do Brasil T70/S1,5.

Fonte: Própria Autoria

Tabela 12 - Quadro-resumo da estabilidade das nanoemulsões produzidas com óleo de soja e castanha do Brasil, com diferentes concentrações de tensoativos Tween 80 e Brij 30, encapsulando vitamina D3, durante o período de 30 dias de estocagem.

Dia	Concentração de vitamina D ₃				Índice de Peróxido				Oxidação Lipídica – TBARS			
	(µg/mL)				(meq O ₂ / kg de amostra)				(mg MDA/kg de amostra)			
	Soja T100/S1,5	Castanha T100/S1,5	Soja T70/S1,5	Castanha T70/S1,5	Soja T100/S1,5	Castanha T100/S1,5	Soja T70/S1,5	Castanha T70/S1,5	Soja T100/S1,5	Castanha T100/S1,5	Soja T70/S1,5	Castanha T70/S1,5
1	8,3 ^{Aa} ± 0,9	8,8 ^{Aa} ± 0,1	10,1 ^{Ab} ± 0,2	8,6 ^{Aa} ± 0,1	3,6 ^{Aa} ± 0,02	3,5 ^{Aa} ± 0,01	3,9 ^{Aa} ± 0,03	4 ^{Aa} ± 0,04	0,36 ^{Aa} ± 0,01	0,35 ^{Aa} ± 0,02	0,38 ^{Aa} ± 0,04	0,39 ^{Aa} ± 0,03
7	8,2 ^{Ab} ± 0,7	8,0 ^{Ab} ± 1,0	10,2 ^{Ac} ± 0,2	5,8 ^{Ba} ± 0,2	3,4 ^{Aa} ± 0,01	3,3 ^{Aa} ± 0,07	3,7 ^{Aa} ± 0,01	3,5 ^{Ba} ± 0,02	0,33 ^{Aa} ± 0,07	0,30 ^{AB,a} ± 0,01	0,37 ^{Aa} ± 0,02	0,35 ^{Ab} ± 0,01
14	8,1 ^{Ac} ± 0,4	6,4 ^{Bb} ± 0,2	10,2 ^{Ad} ± 0,3	2,9 ^{Ca} ± 0,3	3,1 ^{Aa} ± 0,03	3,1 ^{Aa} ± 0,04	3,3 ^{Ba} ± 0,02	3,3 ^{Ba} ± 0,03	0,29 ^{Ba} ± 0,04	0,32 ^{Aa} ± 0,03	0,33 ^{Ba} ± 0,03	0,33 ^{Ba} ± 0,02
21	8,1 ^{Ab} ± 0,4	6,4 ^{Bc} ± 0,2	10,2 ^{Ad} ± 0,3	1,4 ^{Da} ± 0,1	2,8 ^{ABa} ± 0,05	2,8 ^{Aa} ± 0,05	3,2 ^{Ba} ± 0,04	3,1 ^{B, C,a} ± 0,01	0,25 ^{Ba} ± 0,05	0,28 ^{Ba} ± 0,05	0,32 ^{Bb} ± 0,01	0,29 ^{Ca} ± 0,04
28	8,1 ^{Ac} ± 0,2	5,6 ^{Bb} ± 0,3	10,1 ^{Ad} ± 0,2	2,1 ^{Ca} ± 0,1	2,7 ^{Ba} ± 0,06	2,8 ^{Aa} ± 0,05	3,0 ^{Ba} ± 0,08	2,9 ^{Ca} ± 0,06	0,30 ^{Aa} ± 0,05	0,30 ^{AB,a} ± 0,06	0,29 ^{Ca} ± 0,06	0,29 ^{Ca} ± 0,08

* Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si (p < 0,05) para amostras com a mesma formulação em diferentes dias de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si (p < 0,05) para amostras com diferentes formulações no mesmo dia de armazenamento.

Fonte: Própria Autoria

A oxidação lipídica, determinada em termos de valores de TBARS, presentes nas nanoemulsões, está apresentados na Figura 16. Pode-se verificar que, para todos os tratamentos, as concentrações de substâncias reativação ácido tiobarbitúrico se mantiveram praticamente constantes durante o período de armazenamento. Durante as semanas analisadas, observou-se uma variação nos valores de TBARS. Porém, essas que permaneceram durante todo o período, se apresentaram não significativas como mostra a Tabela 12.

Os resultados indicaram baixo grau de oxidação lipídica, uma vez que foram detectadas baixa concentrações de MDA. Tal fato pode ser explicado pela presença de antioxidantes, pois se trata de óleos comerciais, bem como a quantidade de tensoativos, que podem ter colaborado na baixa oxidação lipídica observada, tanto para o óleo de soja quanto para o óleo de castanha do Brasil.

Analisando-se a Tabela 12, observa-se que as nanoemulsões preparadas com óleo de soja e maiores concentrações de Tween 80 mostraram melhores resultados de estabilidade em termos de oxidação, como previam os experimentos iniciais. Essa vantagem pode ser explicada pelo fato de o óleo de soja ter maior quantidade de antioxidantes advindos de sua produção industrial, além da interação do tensoativo, uma vez que na presença do tensoativo Brij 30 parece haver uma diminuição da estabilidade da nanoemulsão, quando comparado às emulsões produzidas apenas com Tween 80.

5.7 Avaliação da estabilidade das nanoemulsões em diferentes condições de processamento simuladas

A estabilidade físico-química das nanoemulsões contendo vitamina D₃ foi avaliada também em relação à influência de condições de *stress* características encontradas durante o processamento e o armazenamento de alimentos. Para isso, as nanoemulsões foram submetidas a diferentes condições de pH, presença de sacarose e temperatura (tais condições foram baseadas em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, GOMES et al., 2017).

Em relação aos experimentos com variação de pH, as amostras não sofreram grandes variações no diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões durante o período de armazenamento. Esse resultado era esperado uma vez que o pH da emulsão se apresenta em torno de 5, e os valores testados foram próximos a este. Vale ressaltar que os valores foram determinados em virtude das condições de processamento de alimentos que poderiam ser fortificados ou misturados à emulsão, como iogurtes e sorvetes. A Tabela 12 apresenta os resultados de estabilidade de tamanho hidrodinâmico encontrados com as variações de pH.

Tabela 13 - Variações dos diâmetros hidrodinâmicos (nm) das nanoemulsões, com variação de pH (3, 4, 5 e 6), medidos durante o período de armazenagem.

Nanoemulsão	pH															
	3				4				5				6			
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Castanha do Brasil (T70/S1,5)	218 ^A ±2,1	238 ^B ±1,5	255 ^C ±1,0	296 ^D ±3,6	212 ^A ±3,5	228 ^B ±1,3	236 ^C ±2,3	253 ^D ±2,6	218 ^A ±3,3	233 ^B ±2,5	242 ^C ±2,1	262 ^D ±2,8	224 ^A ±0,5	235 ^B ±2,6	249 ^C ±3,0	269 ^D ±2,6
Castanha do Brasil (T100/S1,5)	228 ^A ±0,4	230 ^A ±3,8	238 ^B ±0,8	278 ^C ±2,1	218 ^A ±1,6	225 ^B ±1,3	229 ^B ±0,9	246 ^C ±1,2	225 ^A ±2,1	235 ^B ±4,6	235 ^B ±3,2	260 ^C ±6,4	231 ^A ±2,6	238 ^A ±4,1	246 ^B ±2,3	255 ^C ±0,6
Soja (T70/S1,5)	221 ^A ±1,8	229 ^A ±2,2	241 ^B ±3,2	287 ^C ±1,1	217 ^A ±2,3	226 ^B ±4,1	237 ^C ±2,3	251 ^D ±3,2	220 ^A ±1,7	233 ^B ±1,9	246 ^C ±4,2	258 ^D ±0,4	225 ^A ±1,3	236 ^B ±5,3	251 ^C ±1,2	264 ^D ±1,1
Soja (T100/S1,5)	190 ^A ±4,5	201 ^B ±1,7	219 ^C ±2,7	246 ^D ±0,4	195 ^A ±5,2	210 ^B ±3,4	223 ^C ±0,8	236 ^D ±1,7	196 ^A ±3,5	211 ^B ±0,7	225 ^C ±1,1	239 ^D ±2,7	197 ^A ±1,9	205 ^B ±3,2	224 ^C ±0,8	243 ^D ±3,4

* A, B, C e D: a média das amostras seguidas pelas mesmas letras na mesma linha, para cada formulação e pH, não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

Já em relação aos testes de congelamento e descongelamento, foram utilizadas as temperaturas de -2 °C e 25 °C, a fim de simular o congelamento e descongelamento em produto armazenado em refrigerador doméstico (como sorvete, por exemplo). Foram realizados dois ciclos de congelamento e descongelamentos e com duração de 24h cada etapa. Nesses experimentos as amostras contendo Brij 30 apresentaram um ligeiro aumento no diâmetro médio de gota durante o período de armazenamento. No entanto, as amostras contendo apenas Tween 80 mantiveram-se estáveis em relação ao diâmetro médio hidrodinâmico.

Figura 18 - Diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos para as nanoemulsões após dos ciclos de congelamento e descongelamento das amostras produzidas com óleo de castanha do Brasil com Tween 80 e Brij 30 A temperatura de congelamento (-2 °C) está representada em azul; a temperatura de descongelamento (25 °C) está representada em vermelho. Foram realizados dois ciclos e os diâmetros hidrodinâmicos medidos em cada etapa.

* A e B: a média das amostras seguidas pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

Por sua vez, para se avaliar a influência da presença de sacarose na estabilidade das nanoemulsões foram utilizadas concentrações de 1, 1,5, 2 e 2,5 g sacarose/ 100 g, a fim de simular a concentração de sacarose presente em alimentos que possam ser enriquecidos com a emulsão encapsulando a vitamina D₃. Esperava-se que a adição de um sólido solúvel como a sacarose interferisse na estabilidade das nanoemulsões, uma vez que a sacarose diminui a atividade de água, diminuindo dessa forma a disponibilidade de água livre, podendo aumentar a influência da presença de interações hidrofóbicas.

No entanto, as concentrações de sacarose adicionadas não foram capazes de interferir significativamente na estabilidade das emulsões, uma vez que o diâmetro médio das partículas sofreu pequenas alterações durante o período de armazenamento, como pode ser observado na Tabela 13. Uma explicação para esse fato pode estar ligada à baixa concentração de sacarose utilizada nos testes.

Tabela 14 - Diâmetro hidrodinâmicos médios (nm) das nanoemulsões, com diferentes concentrações de sacarose (1, 1,50, 2 e 2,5 g/100 g), medidos durante o período de armazenagem.

Nanoemulsão	Concentração de sacarose (g/100 g)															
	1				1,50				2				2,50			
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Castanha do Brasil (T70/S1,5)	221 ^A ±2,7	235 ^B ±5,2	250 ^C ±3,1	263 ^D ±6,2	217 ^A ±3,2	231 ^B ±3,1	239 ^B ±3,2	255 ^C ±4,3	222 ^A ±6,2	228 ^A ±2,3	246 ^B ±3,4	265 ^C ±4,1	221 ^A ±2,4	231 ^B ±4,3	250 ^C ±5,1	271 ^D ±4,5
Castanha do Brasil (T100/S1,5)	224 ^A ±1,3	233 ^B ±2,1	241 ^C ±1,2	257 ^D ±5,0	226 ^A ±4,6	228 ^A ±1,8	243 ^B ±2,5	254 ^C ±2,9	229 ^A ±3,1	236 ^B ±2,7	234 ^B ±2,3	268 ^C ±3,7	229 ^A ±3,1	237 ^B ±4,0	249 ^C ±2,9	253 ^D ±4,1
Soja (T70/S1,5)	220 ^A ±2,9	231 ^B ±1,4	237 ^B ±1,6	262 ^C ±2,7	223 ^A ±2,2	224 ^A ±1,4	239 ^B ±2,7	249 ^C ±3,4	221 ^A ±2,1	236 ^B ±2,0	248 ^C ±4,1	260 ^C ±2,5	224 ^A ±2,7	239 ^B ±3,5	247 ^C ±3,8	267 ^D ±2,6
Soja (T100/S1,5)	194 ^A ±2,8	207 ^B ±0,5	219 ^C ±4,3	235 ^D ±1,7	187 ^A ±2,4	226 ^B ±2,3	231 ^B ±2,7	240 ^C ±0,9	193 ^A ±3,3	213 ^B ±1,1	227 ^C ±2,2	241 ^D ±3,6	197 ^A ±0,8	207 ^B ±2,3	220 ^C ±2,8	242 ^D ±1,7

* A, B, C e D: a média das amostras seguidas pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

Já na avaliação da influência da temperatura na estabilidade das nanoemulsões, foi utilizado binômio tempo vs. temperatura 15 s vs. 72 °C, a fim de simular o processo de pasteurização rápida do leite. Esperava-se que o aquecimento interferisse na estabilidade das nanoemulsões, uma vez que a tensão superficial diminui com o aumento de temperatura. Durante o aquecimento o grau de agitação térmica das moléculas diminui as forças de atração, podendo interferir em sua tensão superficial, e alterar as forças de coesão existentes.

No entanto, durante o período observado a taxa de aquecimento utilizadas não foi capaz de interferir significativamente na estabilidade das nanoemulsões, fato observado pela manutenção do seu diâmetro médio, conforme mostrado na Figura 18:

Figura 19 - Diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos para as nanoemulsões, após exposição ao binômio tempo X temperatura (15 s X 72 °C).

* A, a média das amostras seguidas pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

5.8 Formulação dos iogurtes de coco

Para a avaliação da incorporação das nanoemulsões em um sistema alimentício, escolheu-se o iogurte de coco. Tal escolha se deu devido à coloração das nanoemulsões (brancas), que seria compatível com tal produto. Foram produzidos quatro tipos diferentes de iogurte (tratamentos), conforme descritas na Tabela 5 do capítulo Material e Métodos.

5.9 Análises microbiológicas do iogurte

Nas formulações de iogurtes preparados foram realizadas as análises microbiológicas, contagem de fungos filamentosos e leveduras, contagem de bactérias lácteas e contagem de coliformes totais e termotolerantes, conforme apresentado na Tabela 15. Em relação à contagem de fungos e leveduras, todas as formulações resultaram em valores $< 10^2$ UFC/g, durante o período de armazenamento de 28 dias, estando dessa forma dentro dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2007). Resultado similar foi obtido em relação a contagem de coliformes totais e termotolerantes, baseado na legislação brasileira, uma vez que durante o período de armazenamento dos iogurtes analisados, houve uma pequena variação na contagem de coliformes entre 7 e 8 NMP/mL, entre os iogurtes, contudo abaixo dos valores máximos permitidos, de 10 NMP/mL de iogurte (BRASIL, 2007).

Já em relação a contagem de bactérias lácticas, houve um decréscimo no número de UFC/mL, nos primeiros dias de armazenagem dos iogurtes contendo emulsões com óleo de soja. No entanto os valores voltaram a subir, durante os 28 dias em que os iogurtes foram analisados. Porém toda as amostras se mantiveram de acordo com a legislação brasileira, que estabiliza a quantidade mínima viável na faixa de 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /mL (BRASIL,2007), Tabela 14.

Essa variação na quantidade de bactérias pode estar relacionada à pequena diferença de pH entre as emulsões, pois os valores de pH implicam na atividade metabólica das bactérias, o que pode favorecer um grupo de micro-organismos em detrimento do outro (SILVA, 2014).

Tabela 15 - Valores médios referentes a contagem de fungos filamentosos e leveduras, bactérias lácticas e coliformes totais e termotolerantes (C – óleo de castanha do Brasil; S – óleo de soja).

Análise microbiológica	logurte															
	T100/S1,5 (C)				T70/S1,5 (C)				T100/S1,5 (S)				T70/S1,5 (S)			
	Dias				Dias				Dias				Dias			
	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
Contagem de fungos filamentosos e Leveduras (UFC/g)	12	13	13	14	25	25	26	27	13	13	14	14	23	24	24	26
Bactérias lácticas (UFC/mL)	2,9x10 ⁷	4,5x10 ⁷	6,2x10 ⁷	8,2x10 ⁸	2,3x10 ⁷	4,7x10 ⁷	6,9x10 ⁷	8,3x10 ⁸	2,7x10 ⁷	3,3x10 ⁷	6,2x10 ⁷	8,0x10 ⁸	2,1x10 ⁷	4,4x10 ⁷	6,8x10 ⁷	8,4x10 ⁸
Coliformes totais e termotolerantes (NMP/g)	6	7	7	8	5	6	7	8	5	6	7	8	6	6	7	7

Fonte: Própria Autoria

5.10 Análises Reológicas

As curvas de fluxo dos iogurtes com formulações ST70, ST100, CT70, CT100 e Branco foram avaliadas nos dias 01 e 15 de armazenamento, para o estudo dos efeitos da incorporação das emulsões produzidas com diferentes óleos e proporções de tensoativos nas propriedades reológicas, bem como na estabilidade das amostras.

Os dados experimentais obtidos foram, inicialmente, analisados utilizando o modelo Lei da Potência, conforme ilustrado na Figura 19, e os parâmetros estão disponíveis na Tabela 16. Os valores de coeficiente de correlação revelaram que tal modelo se ajustou adequadamente aos dados, principalmente para as amostras contendo as emulsões ($R^2 > 0,99$). Além disso, os valores do índice de comportamento de fluxo (n) menores que 1 revelaram que os iogurtes apresentaram comportamento de fluido não-newtoniano pseudoplástico, ou seja, a viscosidade aparente dos sistemas decrescia com o aumento da taxa de deformação aplicada.

Segundo a literatura este comportamento é típico de iogurtes (Debon et al., 2010; Castro et al., 2009b; Hennigsson et al., 2006; Paseephol et al., 2008), e tal resultado mostra que, embora a incorporação das gotículas de emulsão tenha alterado as características dos sistemas (como verificado a partir dos diferentes valores de tensão de cisalhamento, K e n), o padrão de comportamento reológico das amostras não foi afetado.

Como verificado da Tabela 16, dentre as amostras contendo emulsões, aquelas com formulação ST100 apresentaram maiores valores de K , seguidas de CT100. Os menores valores, por sua vez, foram obtidos para iogurtes com formulações ST70 e CT70, cujos parâmetros foram estatisticamente iguais. Esses resultados evidenciaram que as diferentes proporções dos tensoativos aplicados afetaram nas características e intensidade das interações entre as gotículas de emulsão e a rede formada pelo iogurte, que por sua vez influenciaram nas propriedades reológicas dos sistemas.

Segundo a literatura, esses iogurtes podem ser classificados como géis carregados com emulsões, uma vez que consistem em gotículas lipídicas aprisionadas em sistemas gelificados (DICKINSON, 2012; OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015). Sabe-se que as propriedades de géis carregados com emulsões dependem das características da rede gelificada, das propriedades de superfície das emulsões determinadas pelos tensoativos aplicados, bem como das interações existentes entre os componentes dos sistemas (DICKINSON, 2012).

Os resultados obtidos indicaram que para emulsões estabilizadas apenas com Tween 80, as interações das gotículas com a matriz do iogurte eram possivelmente mais intensas que aquelas formadas por Tween 80 e Brij 30. Tal fato foi verificado também a partir dos valores de tensão de cisalhamento atingidos por cada uma das amostras, como ilustrado na Figura 19. Enquanto iogurtes com formulações ST100 e CT100 apresentaram valores maiores que o iogurte sem emulsão (Branco), as amostras com formulações ST70 e CT70 apresentaram valores mais próximos a tal formulação, indicando uma menor alteração no comportamento reológico dos iogurtes devido a interação dos tensoativos com a rede.

Com relação à estabilidade das amostras, verificou-se que os parâmetros K e n não apresentaram diferenças significativas entre os dias 01 e 15 de armazenamento, exceto pelo branco, cujo valor de K aumentou durante esse período.

Figura 20. Curva de fluxo (segundo aumento de taxa de deformação) para amostras de iogurte nos dias 01 (A) e 15 (B) de armazenamento com ajuste do modelo Lei da Potência.

(A)

(B)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 16. Parâmetros do modelo Lei da Potência obtidos por meio do ajuste aos dados de curva de fluxo dos iogurtes no primeiro e segundo aumento de taxa de deformação.

Dia de armazenamento	Formulação	K	N	R²
Dia 01	Branco	6,4611 ^{bA} ± 0,0925	0,2559 ^{aB} ± 0,0046	0,9234
	ST70	0,4052 ^{aC} ± 0,0398	0,9920 ^{aA} ± 0,0269	0,9991
	ST100	2,3242 ^{aB} ± 0,1099	0,9561 ^{aA} ± 0,0092	0,9999
	CT70	0,3974 ^{aC} ± 0,0207	0,9950 ^{aA} ± 0,0234	0,9985
	CT100	2,4545 ^{aB} ± 0,0998	0,9539 ^{aA} ± 0,0123	0,9996
Dia 15	Branco	6,7698 ^{aA} ± 0,1653	0,2619 ^{aB} ± 0,004	0,9687
	ST70	0,4042 ^{aC} ± 0,024	0,9740 ^{aA} ± 0,0118	0,9992
	ST100	2,4016 ^{aB} ± 0,2204	0,9614 ^{aA} ± 0,0073	0,9998
	CT70	0,4187 ^{aC} ± 0,0219	0,9568 ^{aD} ± 0,0335	0,9980
	CT100	2,4866 ^{aB} ± 0,0699	0,9563 ^{aA} ± 0,0001	0,9999

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com a mesma formulação em diferentes dias de armazenamento. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com diferentes formulações no mesmo dia de armazenamento.

As amostras também foram analisadas utilizando o modelo de Herschel–Bulkley (HB) e os resultados estão disponíveis na Figura 20 e Tabela 17. Segundo a literatura, a avaliação do comportamento reológico de iogurtes utilizando tal modelo é importante uma vez que ele considera e analisa a existência de uma tensão de cisalhamento inicial, que é fundamental para o processamento do produto em questão (Molina et al., 2019).

De acordo com Mendonça (2002), o comportamento de amostras com tensão inicial pode ser explicado em termos das estruturas internas dos sistemas, as quais podem ser capazes de impedir o movimento dos sistemas para valores de tensão de cisalhamento menores do que um valor limite. A partir desse valor limite a estrutura interna colapsa, permitindo que haja escoamento. Por esse motivo, a tensão de cisalhamento inicial pode ser usada para caracterizar a firmeza de iogurtes (Smith, 1978; Felix-da-Silva et al., 2017).

Como verificado na Tabela 17, o comportamento das amostras sem emulsão (Branco) foi melhor representado pelo modelo HB que pelo modelo Lei da Potência. Já para amostras com formulações ST100 e CT100, o comportamento dos sistemas foi satisfatoriamente modelado a partir das duas abordagens, como verificado a partir dos valores de coeficiente de correlação maiores que 0,99. Para sistemas com formulações ST70 e CT70, porém, o modelo HB não conseguiu representar os dados de forma tão satisfatória quando o modelo Lei da Potência, possivelmente devido a inexistência ou existência de tensões iniciais reduzidas.

Tal fato, evidenciado pelos menores valores de σ para iogurtes com formulações ST70 e CT70 (Tabela 17), reforçam a hipótese levantada anteriormente de que a presença do Brij 30 na superfície das gotículas de emulsão comprometeu a interação destas com a rede do iogurte, fazendo com que este não apresentasse a resistência inicial ao escoamento, que segundo Felix-da-Silva et al (2017) é vinculada à existência de uma estrutura interativa ou reticulada.

Já para sistemas com formulações ST100 e CT100, os valores de σ_0 foram maiores que para as amostras sem emulsão (Branco), indicando que a presença das gotículas estabilizadas com Tween 80 aumentaram a resistência dos iogurtes ao escoamento quando submetidos à determinados valores de tensão inferiores à inicial crítica. Tal resultado reforçou também a hipótese levantada anteriormente, de que as gotículas estabilizadas com Tween 80 interagem com a rede do iogurte aumentando a “força” das estruturas.

Os efeitos dessas diferentes interações entre as gotículas estabilizadas com os diferentes tensoativos e a rede de iogurte foram também verificadas a partir dos valores de K e n, que foram significativamente maiores para as amostras com formulações ST100, CT100 e branco, em comparação às amostras com formulações ST70 e CT70.

Recentemente em seu trabalho, Molina et al. (2019) avaliou o efeito da incorporação de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) estabilizadas com isolado proteico de soja nas propriedades de iogurtes e verificaram que os valores de K foram maiores para o controle (sem as MLS). Segundo os autores, isso pode ser explicado pelo fato de as dispersões de MLS serem compostas em 94% por água, sendo assim, os iogurtes contendo essas estruturas tinham aproximadamente 5% a mais de água que o controle, e tal adição de água foi o que resultou em valores mais baixos de K. Essa explicação pode ajudar na compreensão dos resultados obtidos para amostras com emulsões estabilizadas com Tween 80 e Brij (CT70 e ST70), mas confirmam a hipótese de que as interações entre tensoativos e rede gelificada são fundamentais para a determinação do comportamento reológico dos iogurtes.

Os parâmetros do modelo HB, disponíveis na Tabela 17, também confirmaram a elevada estabilidade das amostras contendo emulsão ao longo dos 15 dias de armazenamento. Para a formulação sem emulsão, no entanto, foi verificado um aumento de K e redução de n nesse período, indicando que a presença das gotículas reduziu a intensidade e velocidade dos rearranjos estruturais da rede dos iogurtes, decorrentes de processos espontâneos.

Figura 21. Curva de fluxo (segundo aumento de taxa de deformação) para amostras de iogurte nos dias 01 (A) e 15 (B) de armazenamento com ajuste do modelo Herschel–Bulkley.

(A)

(B)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 17. Parâmetros do modelo Herschel–Bulkley obtidos por meio do ajuste aos dados de curva de fluxo dos iogurtes no primeiro e segundo aumento de taxa de deformação.

Dia de armazenamento	Formulação	σ_0	K	n	R ²
Dia 01	Branco	2,5441 ^{aB} ± 0,1175	2,7711 ^{bA} ± 0,0658	0,4967 ^{aB} ± 0,0057	0,9981
	ST70	1,5199 ^{aC} ± 0,1406	1,3485 ^{aB} ± 0,1346	0,6671 ^{aB} ± 0,0265	0,8937
	ST100	2,9698 ^{aA} ± 0,1451	2,8059 ^{aA} ± 0,2330	0,8964 ^{aA} ± 0,0107	0,9942
	CT70	1,4376 ^{aC} ± 0,0936	1,6955 ^{aAB} ± 0,8886	0,6130 ^{aB} ± 0,1448	0,8491
	CT100	2,9523 ^{aA} ± 0,1763	2,7922 ^{aA} ± 0,2579	0,9017 ^{aA} ± 0,0177	0,9948
Dia 15	Branco	2,6183 ^{aB} ± 0,0227	3,0813 ^{aA} ± 0,1386	0,4727 ^{bC} ± 0,0034	0,9976
	ST70	1,5328 ^{aC} ± 0,2589	1,6570 ^{aA} ± 0,9478	0,6346 ^{aBC} ± 0,1513	0,8514
	ST100	2,9809 ^{aAB} ± 0,1357	2,8228 ^{aA} ± 0,2210	0,9032 ^{aA} ± 0,0092	0,9950
	CT70	1,2971 ^{aC} ± 0,1473	2,1434 ^{aA} ± 0,9811	0,5578 ^{aC} ± 0,1627	0,8181
	CT100	3,0587 ^{aA} ± 0,0030	2,9494 ^{aA} ± 0,0054	0,8997 ^{aAB} ± 0,0046	0,9949

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com a mesma formulação em diferentes dias de armazenamento. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com diferentes formulações no mesmo dia de armazenamento.

Como esperado, as diferentes interações entre as gotículas de emulsão e a rede dos iogurtes também influenciaram nos valores de viscosidade aparente dos sistemas, como verificado na Tabela 18. Pelos mesmos motivos citados anteriormente, amostras com formulações ST100 e CT100 apresentaram valores de viscosidade significativamente maiores que o Branco, indicando um fortalecimento microestrutural dos sistemas, enquanto as amostras com formulações ST70 e CT70 foram significativamente menos viscosas. Neste caso também, a estabilidade dos sistemas ao longo dos 15 dias analisados foi elevada, uma vez que os valores de viscosidade aparente se mantiveram os mesmos.

Segundo a literatura, para os fluidos dependentes do tempo, tais como o iogurte, a viscosidade aparente depende da duração da taxa de deformação, e tais sistemas podem ser subdivididos em tixotrópicos e reopéticos. Para amostras tixotrópicas, a uma taxa de deformação fixa, a viscosidade decresce com o tempo, enquanto para as reopéticas a viscosidade aumenta (SKELLAND, 1967; Mendonça, 2002).

Nos estudos encontrados na literatura envolvendo a caracterização reológica de iogurtes, as amostras apresentam características tixotrópicas e pseudoplásticas (Debon et al., 2010; Hennigsson et al., 2006; Paseephol et al., 2008), que também foram verificadas nos sistemas avaliados no presente trabalho.

Segundo Cruz et al. (2013), tixotropia é verificada em estruturas frágeis, cuja rede tridimensional formada é destruída. Visto que a energia necessária para romper a estrutura original dos iogurtes é proporcional à área de histerese, os valores de tal parâmetro podem ser estimados a partir da diferença entre as áreas sob as curvas da taxa de tensão de cisalhamento (STEFFE, 1996; SATO E CUNHA, 2007; CRUZ et al., 2013). No caso do presente trabalho, as curvas utilizadas para tal cálculo foram as curvas ascendentes e descendentes, e os resultados de tixotropia (área de histerese) obtidos estão disponíveis na Figura 21.

Tais resultados revelaram que amostras com formulações CT70 e ST70 apresentaram valores de tixotropia estatisticamente iguais às amostras sem emulsão (Branco), porém significativamente menores que as amostras com formulações CT100 e ST100. Tais resultados confirmaram, mais uma vez, a maior força dos sistemas contendo as emulsões estabilizadas apenas com Tween 80, discutida anteriormente. Além disso, verificou-se que os valores de tixotropia dos sistemas não foram alterados durante os 15 dias de armazenamento, confirmando a estabilidade dos sistemas no período avaliado.

Após o 20º dia de armazenamento, no entanto, as amostras começaram a apresentar odor e aspecto visual desagradáveis, com aparente contaminação microbiana. Segundo a literatura, isso já era esperado, uma vez que, devido às suas características físico-químicas, o iogurte é um alimento classificado como consumo rápido, principalmente depois de aberto (ALMEIDA et al., 2015).

Tabela 18. Valores de viscosidade aparente determinadas a 11 s^{-1} das amostras de iogurte em diferentes dias de armazenamento.

Formulação	Dia 01	Dia 15
Branco	$1,1180^{aB} \pm 0,0050$	$1,1043^{aB} \pm 0,0270$
ST70	$0,3884^{aC} \pm 0,0115$	$0,3797^{aC} \pm 0,0143$
ST100	$2,1320^{aA} \pm 0,090$	$2,2300^{aA} \pm 0,1580$
CT70	$0,3788^{aC} \pm 0,0185$	$0,3769^{aC} \pm 0,0253$
CT100	$2,1797^{aA} \pm 0,0461$	$2,3000^{aA} \pm 0,0650$

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com a mesma formulação em diferentes dias de armazenamento. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com diferentes formulações no mesmo dia de armazenamento.

Figura 22. Valores de tixotropia calculados a partir da área de histerese entre a primeira rampa ascendente e rampa descendente.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com a mesma formulação em diferentes dias de armazenamento. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para amostras com diferentes formulações no mesmo dia de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

É importante ressaltar também que todos os resultados apresentados revelaram que as propriedades reológicas dos géis dependeram das proporções dos tensoativos utilizados, porém não foram amplamente afetadas pelo tipo de óleo utilizado, visto que amostras ST70 e CT70 apresentaram propriedades muito semelhantes entre si, bem como as amostras ST100 e CT100.

5.11 Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada apenas com as amostras de iogurtes ST70, CT70 e o iogurte puro (branco), pois era de interesse entender a percepção sensorial quando parte da emulsão utilizada nas formulações do iogurte apresentou Brij 30, uma vez que a intenção era diminuir o sabor adstringente que o Tween 80 causa no alimento. A análise sensorial contou com a colaboração de 104 provadores, que avaliaram a sabor, cor, textura, aroma, aceitação e intenção de compra do iogurte enriquecido. Além desses questionamentos, foi avaliado o consumo de iogurte por parte dos provadores, para entender o consumidor, e os resultados dessa avaliação indicaram que pouco mais de 58% dos provadores consomem iogurte frequentemente.

Os resultados obtidos mostraram que as notas referentes ao atributo cor foram muito próximas entre as amostras. Isso pode ser explicado devido à coloração tanto do iogurte quanto da emulsão, que são próximas tornando os iogurtes muito homogêneos em relação a este atributo.

Em relação aos atributos aroma e sabor, pode-se dizer que não houve comentários negativos dos provadores devido à incorporação da emulsão. Entretanto, o que ficou evidenciado para alguns foi a polpa de coco, obtendo alguns comentários, como “parece que engorda”; “um pouco doce demais”; “parece natural” - porém nenhum extremamente negativo.

Observa-se na Figura 21 que, assim como no atributo cor, não houve diferença nas notas atribuídas para o sabor entre as amostras, bem como as notas de aroma de todos os tratamentos foram similares estatisticamente. Tal fato pode ser explicado devido a formulação com adição de polpa e aroma, que conseguiu minimizar o impacto organoléptico que seria provavelmente causado pela presença dos tensoativos Tween 80 e Brij 30, o que poderia ter influenciado nas notas finais da análise sensorial. Em relação a textura dos iogurtes, não foi possível observar diferença significativa dentre os tratamentos, mostrando uma boa aceitação dos consumidores.

Para a avaliação quanto a intenção de compra do iogurte enriquecido com vitamina D₃, os resultados obtidos demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$), porém em média a intenção de compra do produto foi relativamente alta, com as notas variando em uma escala hedônica de 1 a 5 (1 = certamente não compraria; 5 = certamente compraria).

Esse fato pode ser explicado comparando-se com o resultado de aceitabilidade do produto, que utilizou uma escala de múltipla escolha, variando de gostei muito a desgostei muito, a qual não apresentou diferenças significativas ($p < 0,5$), no entanto a maior parcela dos provadores foi favorável ao sabor do iogurte, conforme indicado pela Figura 22.

Em suma, os iogurtes enriquecidos obtiveram uma boa aceitação por parte dos provadores, o que demonstra seu potencial como possível produto enriquecido com vitamina D₃.

Figura 23 – Notas da avaliação sensorial das amostras de iogurte enriquecido com vitamina D₃ encapsulado em nanoemulsões (I – iogurte sem adição de emulsão; IC – iogurte enriquecido com nano emulsão produzida com óleo de castanha do Brasil, CT70; IS – iogurte enriquecido com nano emulsão produzida com óleo de soja, ST70).

* A média das amostras seguidas pela mesma letra para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria Autoria

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados experimentais obtidos no presente trabalho de Mestrado, foi possível concluir que:

- Foi possível produzir nanoemulsões pelo método EIP, utilizando tanto somente o tensoativo Tween 80 quanto a mistura Tween 80 e Brij 30;
- Os melhores parâmetros de produção obtidos foram: vazão de adição de fase aquosa de 16 ml / min, e da intensidade de agitação (500 rpm), 20% de óleo de soja e/ou castanha do Brasil o tensoativo Tween 80 na razão SOR = 1,5;
- As emulsões contendo óleo de soja apresentaram melhor distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos, e preservação da vitamina encapsulada, maior estabilidade quanto à oxidação lipídica, em comparação com as emulsões contendo óleo de castanha;
- As formulações de iogurtes enriquecidos com tais emulsões apresentaram boa aceitação global, mostrando a capacidade de utilização destas como forma de enriquecimento de alimentos com vitamina D₃.

Assim, a produção de nanoemulsão pelo método EIP, contendo óleo de castanha do Brasil, mesmo sendo ligeiramente inferior na comparação com o óleo de soja, com o uso dos mesmos parâmetros apresentados no presente trabalho, pode ser considerada promissora para encapsulação de bioativos e também para aplicação em matrizes alimentícias, como foi o caso com o iogurte de coco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. D. et al. Determinação do tempo de vida de prateleira de iogurte com de polpa de fruta por meio da população de bactérias lácticas totais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 9, n. 1, p. 1671-1681, 2015.
- ALMOUAZEN, E. et al. Nano encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and in Vitro Evaluation. *Pharmaceutical Research*, 30, 1137–1146, 2013.
- ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185–199, 2008.
- ANTON, N.; VANDAMME T. F. The University of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 377, 142-147, 2009.
- ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado proteico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. *Alimentos e Nutrição*, 15, 107-114, 2008.
- ARES, G.; GIMENEZ, A.; DELIZA, R. Influence of three non-sensory factors on consumer choice of functional yogurts over regular ones. *Food Quality and Preference*, 21, 351-367, 2010.
- ASSIS, R. P. Efeito da curcumina e carotenoides em iogurte sobre biomarcadores fisio-metabólicos e de estresse oxidativo em modelos de diabetes mellitus tipo 1 e de obesidade/resistência insulínica. 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC: AOAC, 1997.
- AZZINI, R. G. Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.
- BARRAL, D.; BARROS, A.C.; ARAÚJO, R.P.C. Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, v. 7, p. 309-315, 2007.
- BARBOSA, P. M.; GALLINA, D. A., Viabilidade de bactérias (starter e probióticas) em bebidas elaboradas com iogurte e polpa de manga. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 72, n. 2, p. 85-95, 2017.

BECHER, S. E.; SCHICK, M. J. Macroemulsions. In: Schick, M. J., Surfactant Science Series, Noionic Surfactants – Physical Chemistry. Editorial Marcel Dekker Inc., New York, 1987, v. 23, p. 435-491.

BERNEWITZ, R. et al. Structure of and diffusion in O/W/O double emulsions by CLSM and NMR—comparison with W/O/W. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 458, p. 10-18, 2014.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37, 911-917, 1959.

BORRIN, T. R. et al. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physico-chemical stability. Journal of Food Engineering, v. 169, p. 1-9, 2016.

BORRIN, T. R., Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina: parâmetros de produção, estabilidade físico-química e incorporação em sorvete. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Resolução RDC N°12 de 02 de Janeiro de 2001. Brasília: ANVISA.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, 2 de janeiro de 2001. Aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br =>. Acesso em: 19 de janeiro de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Instrução Normativa nº 46, de 23/10/2007. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p. 4-7.

CARLI, C Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP): estabilidade físico-química e avaliação da atividade antioxidante in vitro e em produto cárneo. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

CARVALHO, M. W. et al., Propriedades e simulação gastrointestinal in vitro de iogurte adicionado de extrato de Stevia Rebaudiana (Bert.) em pó. 2017.

Castro, F.P., Cunha, T.M., Barreto, P.L.M., Amboni, R.D.M.C., Prudêncio, E.S., Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. *Int. J. Dairy Technol.* 62, 74–82. 2009.

CHAVES, M.A.; OSELIERO-FILHO, P.L.; JANGE, C.G.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; OLIVEIRA, C.L.P.; PINHO, S.C. Structural characterization of multilamellar liposomes coencapsulating curcumin and vitamin D₃. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 549, 112-121.

COCO, D.; PALAZZO, A. O mercado de iogurtes no Brasil: crescendo além da crise. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/conteudo/o-mercado-de-iogurtes-no-brasil-crescendo-alem-da-crise.html#.WwWnJu4vzIV>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

COLPO, E. et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition*, v. 30, p. 459-465, 2014.

COMUNIAN, T.A.; CHAVES, I.E.; THOMAZINI, M.; MORAES, I.C.F.; FERRO-FURTADO, R.; CASTRO, I.A.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. *Food Chemistry*, 237, 948-956, 2017.

CRODA, Emulsão Aquosa Concentrada. Disponível em: <<https://www.crodacropcare.com/pt-br/products-and-applications/concentrated-aqueous-emulsion>>. Acesso em: 30 de jan. de 2018.

CRUZ, A. G. et al., Developing a prebiotic yogurt: Rheological, physico-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology. *Journal of food engineering*, v. 114, n. 3, p. 323-330, 2013.

DA SILVA, D. F. et al. Physical, microbiological and rheological properties of probiotic yogurt supplemented with grape extract. *Journal of food science and technology*, v. 54, n. 6, p. 1608-1615, 2017.

DE CARLI, C. Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP): estabilidade físico-química e avaliação da atividade antioxidante in vitro e em produto cárneo. 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

DE CARLI, C.; MORAES-LOVISON, M.; PINHO, S. C. Production, physicochemical stability of quercetin-loaded nanoemulsions and evaluation of antioxidant activity in spreadable chicken pâtés. *LWT*, v. 98, p. 154-161, 2018.

- DE CASTRO, F. P. et al., Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. *International Journal of Dairy Technology*, v. 62, n. 1, p. 68-74, 2009.
- DAVIES, J. T. A quantitative kinetic theory of emulsion type: I. Physical chemistry of the emulsifying agent, gas/liquid and liquid/liquid interface. *Proceedings of the International Congress of Surface Activity*, p. 426 – 438, 1957.
- 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.
- FEMKE, B. et al. Vitamin D: Modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 10, p. 482–496, 2010.
- FERNANDEZ, P. et al. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.251, p.53-58, 2004
- FERRARI, M. Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1998.
- GAO, Y. et al. Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays. *Food Chemistry*, v. 110, p. 769–776, 2008.
- GARMUS, T. T. et al., Avaliação sensorial e físico-química de iogurte enriquecido com farinha de linhaça Sensory evaluation and physical chemistry of yogurt enriched with flaxseed flour. *AMBIÊNCIA*, v. 12, n. 1, p. 251-258, 2016.
- GOMES, G. V. L. et al. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of beta-carotene-loaded lipid nanoparticles of cupuacu butter (*Theobroma grandiflorum*) produced by phase inversion temperature (PIT) method. *Journal of Food Engineering* v. 10, p. 192 – 193, 2017.
- GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, 276–290, 2010.
- GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by HLB, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. v. 1, p. 311 – 326, 1949.
- GUIRGUIS, N.; BROOME, M.C.; HICKEY, M.W. The effect of partial replacement of skim milk powder with whey protein concentrate on the viscosity and syneresis of yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 91, 33- 35, 1984.
- GUPTA, A., ERAL, H. B., HATTON, T. A., and DOYLE, P. S. Nanoemulsions: Formation, properties and applications, *Soft Matter*. v. 12, p. 2826–2841, 2016.

HENNINGSSON, M.; ÖSTERGREN, K.; DEJMEK, P., Plug flow of yoghurt in piping as determined by cross-correlated dual-plane electrical resistance tomography. *Journal of food engineering*, v. 76, n. 2, p. 163-168, 2006. HUNTER, R. J. *Foundations of colloid Science*, Oxford University Press, 2001.

HUNTER, R. J. *Foundations of colloid science*. Oxford: Oxford University Press, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Versão eletrônica. 1020f. São Paulo. 2008.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas básica e Aplicada*, v. 29, p. 81-96, 2008.

JAFARI, S. M., ASSADPOOR, E. H. Y.; BHANDARI, B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification, *Food Hydrocolloids*. v. 22, p. 1191 – 1202, 2008.

JAHANZAD, F. et al. Catastrophic phase inversion via formation of multiple emulsions: a prerequisite for formation of fine emulsions. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 87, p. 492-498, 2009.

JHON, A.J.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of functional foods*, v. 2, p. 196 – 209, 2010.

JUNIOR, E. N. M. et al., Elaboração de iogurte grego de leite de búfala e influência da adição de calda de ginja (*Eugenia uniflora* L.) no teor de ácido ascórbico e antocianinas do produto. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 71, n. 3, p. 131-143, 2016.

KOMAIKO, J. S.; McCLEMENTS, D. J. Formation of food-grade nanoemulsions using low energy preparation methods: A review of available methods. *Comprehensive Reviews, Food Science and Food Safety*. v. 15, p. 331–352, 2016.

KRUGLYAKOV, P. M. Hydrophile-lipophile balance of surfactants, *Hydrophile-Lipophile Balance of Surfactants and Solid Particles*. p. 146 – 266, 2000.

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.

LUO, X. et al. HPLC-ESI-MS analysis of Vitamin B12 in food products and in multivitamins-multimineral tablets. *Analytica Chimica Acta*, v. 562, p. 185–189, 2006.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamina D3. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 836-843, 2012.

MAIA FILHO, D. C. Efeito do Envelhecimento Sobre as Características de Emulsões de Petróleo do Tipo Água-em-Óleo. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

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

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

MASSI, F. P. et al. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 186, p. 14-21, 2014.

MAYER, S.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Vitamin-E enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: factors influencing droplet size and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 402, p. 122-130, 2013.

McCLEMENTS, D. J. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews, Food Science and Nutrition*. v. 47, p.611–649, 2007.

McCLEMENTS, D. J. *Food emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 51, p. 285-330, 2011.

McCLEMENTS, D.J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 17, p. 235–245, 2012.

McCLEMENTS, D.J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 285-330, 2011.

MCGuire, R. G.; Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, v. 27, n. 12), p. 1254- 1255, 1992.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory evaluation techniques*. 2nd ed. Boca Raton, EUA: CRC Press, 1991.

MENDONÇA, Elisângela et al. Estudo do comportamento reológico de iogurtes comerciais. Dissertação (mestrado) – Universidade de Santa Catarina, 2002.

MOLINA, Camila V. et al. Physicochemical characterization and sensory evaluation of yogurts incorporated with beta-carotene-loaded solid lipid microparticles stabilized with hydrolyzed soy protein isolate. Food science and biotechnology, v. 28, n. 1, p. 59-66, 2019.

MORAIS, J. M.; ROCHA, P. A.; BURGESS, D. J. Influence of phase inversion on the formation and stability of one-step multiple emulsions. Langmuir. v. 25, p. 7954-7961, 2008.

NORMAN, A.W.; HENRY, H.L. Vitamin D. IN ERDMAN; J.W.; MACDONALD, I.A.; ZEISEL, S.H. Present Knowledge in Nutrition. 10a ed, Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2012.

Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4ª ed. Campinas (SP): Ed. NEPAUNICAMP; p. 161, 2011.

OLIVEIRA, J. O., Metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de animais diabéticos tratados com iogurte enriquecido com curcumina. 2015.

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

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. Journal of Colloid and Interface Science. v. 388, p. 95-102, 2012.

PASEEPHOL, T., Small, D.M., Sherkat, F., Rheology and texture of set yoghurt as affected by inulin addition. J. Texture Stud. 39, 617–634, 2008

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

PEIXOTO, E.C.D.; RODRIGUES, C.E.C.; MEIRELLES, A.J.A. Estudo do equilíbrio líquido-líquido do sistema óleo de soja refinado/ácido linoleico comercial/etanol hidratado, a 25°C. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UNICAMP. 2005.

QUEIROGA, V. et al. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil: Characterization and thermal stability. Revista de biologia e farmácia, v.3, p. 33-42, 2009.

RIBEIRO, M. B. N. et al. Brazil nut stock and harvesting at different patial scales in south e a stern Amazonia. *Forest Ecologyand Management*, v.319, p. 67-74, 2014.

ROLIM, F. N. A., Desenvolvimento de sistemas emulsionados contendo óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*); Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 2016.

ROXO, D. F. et al., ACT. Iogurte enriquecido com curcumina e metformina reduz a dislipidemia e o estresse oxidativo em ratos diabéticos. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies*, v. 37, n. 1, 2016.

SAITO, T. et al. Novel gemini vitamina D3 analogs have potent antitumor activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 112, p. 151–156. 2008.

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; YIANNESKIS, M. Catastrophic phase inversion of abnormal emulsions in the vicinity of the locus of transitional enversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 240, p. 149-155, 2004.

SALAGER, J. L, et al. Using emulsion inversion in industrial processes. *Advances in Colloid and Interface Science*. v. 108-109, p. 259-272, 2004.

SALAGER, J. L. Emulsion phase inversion phenomena. *Emulsions and Emulsion Stability*, v. 2, p. 185 – 226, 2006.

SANTANA, R. C.; PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. High and low energy emulsifications for food applications: a focus on process parameters. *Food Engineering Reviews*, 5, 107-122, 2013.

SATO, A.C.K., Cunha, R.L., 2007. Influence of temperature on the rheological behavior

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.

SILVA, L. C. et al. Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados Na região de Santa Maria – RS. *Disciplinarum. Scientia. Série: Ciências da Saúde*, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-120, 2012.

SISTEMA BRASILEIRO DO AGRONEGÓCIO. Consumo de iogurte aumenta no Brasil e laticínios investem na produção. 2015. Disponível em: <<http://www.sba1.com/>>. Acesso em: 04 fev. 2018.

SKELLAND, A. H. P., Non-Newtonian flow and heat transfer(Book on quantitative relationships for non- Newtonian systems, considering classification and fluid behavior of materials with anomalous flow properties). NEW YORK, JOHN WILEY AND SONS, INC., 1967. 469 P, 1967.

SMITH EG (1978) Routine quality control technics. J Histotechnol 1:99–99.
doi:10.1179/014788878794582220

SOARES, P. I. et al,. Elaboração e caracterização físico-química de iogurtes de ameixa adicionados da farinha de chia. MAGISTRA, v. 30, p. 78-85, 2019.

SOLANS, C.; SOLÈ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. Current Opinion in Colloid & Interface Science. v. 17, p. 246-254, 2012.

SOUZA, J. L. F., Farinha do mesocarpo do pequi (caryocar brasiliense cambess): cinética da secagem, propriedades nutricionais, funcionais e enriquecimento de iogurtes. 2015.

SOUSA, J. R. et al. Efeito da suplementação com vitamina D em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: uma revisão sistemática. Revista Brasileira de Reumatologia, 2017.

STEFFE, J.F., Rheological Methods in Food Process Engineering, second ed. Freeman Press, East Lansing, p. 412, 1996.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. Advances in Colloid and Interface Science, 108-109, 303-318, 2004.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. Advances in Colloid and Interface Science. v. 108-109, p. 303-318, 2004.

VAZ, M. A. et al. Suplementação na infância e a prevenção da carência de micronutrientes: Artigo de revisão. Revista de Medicina e Saúde de Brasília, 6, 2017.

VECCHIO, R.; VAN LOO, E.J.; ANNUNZIATA, A. Consumers' willingness to pay for conventional, organic and functional yogurt: evidence from experimental auctions. Journal of Consumer Studies, 40, 368-378, 2016.

VENKATACHALAM, M.; SHATE, S. K.; Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. Journal of agricultural and food chemistry, v.54, p. 4705 - 4714, 2006.

VONDERHEIDE, A. P. et al. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. Journal of agricultural and food chemistry, v.50, p.5722 - 5728, 2002.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability, *Langmuir*. v. 24, p. 12758 - 12765, 2008.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 1573-1580, 2009.

ZAMBRANO, N. et al. Emulsion Catastrophic Inversion from Abnormal to Normal Morphology. 1. Effect of the Water-to-Oil Ratio Rate of Change on the Dynamic Inversion Frontier, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. v. 42, p. 57-61, 2003.

8. ANEXOS

Análise sensorial de iogurte de coco enriquecido com Vitamina D₃ Este iogurte é enriquecido com uma emulsão de óleo de castanha do Brasil, na qual a vitamina D ₃ está nanoencapsulada.
Nome: _____	
Idade: _____	Amostra _____
Preencha os campos abaixo a partir da escala dada.	
5- Gostei muito	Cor: ()
4 - Gostei regularmente	Sabor: ()
3- Não gostei, nem desgostei	Textura: ()
2- Desgostei regularmente	Aroma: ()
1- Desgostei muito	Aceitação global: ()
Você consome iogurte frequentemente?	
Sim () Não ()	
Intenção de compra	
A partir da amostra dada, por favor, preencha qual seria sua intenção de compra para este produto.	
5- Certamente compraria	Nota ()
4 - Provavelmente compraria	
3- Indiferente	
2- Provavelmente não compraria	
1- Certamente não compraria	
Comentários gerais:	

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa: “*Avaliação sensorial de iogurtes enriquecidos com vitamina D3 encapsulada em nanoemulsões de óleo de castanha do Brasil*”.

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

CEP: _____ Fone: _____

Justificativa: A vitamina D₃ é uma substância lipofílica (solúvel em óleo) com benefícios para a saúde humana, mas sua baixa solubilidade em água e, portanto, baixa biodisponibilidade no trato gastrointestinal, tornam mais difíceis a sua absorção e sua incorporação direta em alimentos. As nanoemulsões são uma via de aplicação destes bioativos em alimentos, encapsulando-os, protegendo-os e eventualmente aumentando sua biodisponibilidade. Neste contexto, nanoemulsões encapsulando vitamina D₃ foram produzidos visando fornecer os benefícios do da vitamina citados de maneira eficiente para o consumo humano por meio da aplicação em iogurte de coco.

Objetivos do projeto: Avaliar a aceitação sensorial de iogurte natural de coco, estando o produto incorporada com nanoemulsões contendo vitamina D₃ encapsulados.

Procedimentos: A análise onde seres humanos avaliam diversos atributos de qualidade de alimentos é chamada de ANÁLISE SENSORIAL. Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão os seguintes:

- Cem (100) provadores farão a avaliação sensorial dos produtos.
- Serão testadas formulações de iogurte de coco com diferentes formulações, contendo vitamina D₃ encapsulada.
- O provador deverá avaliar (olhar, cheirar, provar) os produtos e responder às perguntas solicitadas na Ficha de Avaliação.
- A duração do teste para cada pessoa será de aproximadamente 10 minutos.
- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Os provadores não terão qualquer tipo de despesas em decorrência da participação na pesquisa.

ATENÇÃO: O produto avaliado proporciona baixo risco devido à sua ingestão, uma vez que os ingredientes utilizados são inteiramente seguros, de boa qualidade e procedência e sua produção seguirá as normas de Boas Práticas de Fabricação, e sua produção será realizada pela empresa Jamava LTDA. O iogurte passará pelo processo de fabricação descrito na metodologia e será armazenado sob refrigeração (7-10°C). A aplicação do teste não implicará em nenhum desconforto aos consumidores.

O risco que é oferecido é para provadores que sejam portadores de intolerância/alergia a algum dos componentes/ingredientes a serem utilizados na produção do iogurte (p.ex., intolerantes/alérgicos a lactose e/ou intolerantes/alérgicos a coco). Os ingredientes usados na produção das nanoemulsões são: água deionizada, óleo de castanha do Brasil, polisorbato 80, éter dodecílico de polioetilenoglicol e benzoato de sódio.

- Em função do exposto no item anterior, não há previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto.

- Os testes para avaliação sensorial do iogurte de coco, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos serão acompanhados pela docente proponente (Samantha Cristina de Pinho) e pelos alunos de Mestrado (Eng. Alimentos Ricardo Matos) e de Iniciação Científica (Augusto Santos Pansarim), participantes do projeto.
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu,

_____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "*Avaliação sensorial de iogurtes enriquecidos com vitamina D3 encapsulada em nanoemulsões de óleo de castanha do Brasil*". Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores. Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Docente responsável: Prof^a Dr^a Samantha Cristina de Pinho – Eng^a Química
(samantha@usp.br)

Aluno de Mestrado responsável: Eng. de Alimentos Ricardo Matos
(ricardo.matos@usp.br)

Pirassununga, _____ de _____ de _____.

Assinatura:

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO SENSORIAL DE IOGURTES ENRIQUECIDOS COM VITAMINA D3 ENCAPSULADA EM NANOEMULSÕES DE CASTANHA DO BRASIL

Pesquisador: RICARDO MATOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09503719.8.0000.5422

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.338.820

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa envolve a utilização de seres humanos na avaliação sensorial (cor, sabor, odor, aparência e espalhabilidade) de produto alimentício (iogurte). Os iogurtes produzidos serão enriquecidos com vitamina D3 encapsulada em nanoemulsões de Castanha do Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é a produção e caracterização de iogurte de coco enriquecido com vitamina D3 encapsulada em nanoemulsões produzidas com óleo de castanha do Brasil obtidas pelo método de ponto de inversão de fase da emulsão (EIP).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliação de Riscos: No formulário de informações básicas da PB, o pesquisador menciona que há riscos mínimos, mas não os descreve. No entanto, no TCLE, que é o documento mais importante pois traz as informações aos participantes, os riscos foram descritos. O pesquisador informa que os riscos de consumo das amostras do produto da pesquisa são os mesmos do consumo cotidiano de modo que o documento está adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Recomendamos que os provadores sejam esclarecidos, mesmo que se forma verbal, quanto ao número de amostras que deverão ser testadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados o formulário de informações básicas, o projeto de pesquisa, a folha de rosto assinada e o TCLE corrigido. O cronograma de pesquisa está adequado aos prazos para avaliação da pesquisa pelo CEPH.

Recomendações:

Recomenda-se que seja incluído o número de amostras a ser oferecido aos provadores. É preciso colocar um campo para a assinatura do pesquisador no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEPH FZEA aprova o desenvolvimento da pesquisa, porém recomenda que seja adicionado campo para assinatura do pesquisador no TCLE.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1290341.pdf	09/05/2019 13:09:40		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Corrigido.docx	09/05/2019 13:05:24	RICARDO MATOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	21/02/2019 03:33:28	RICARDO MATOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Sensorial.doc	29/01/2019 12:25:07	RICARDO MATOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado