UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

THAIS CARVALHO BRITO OLIVEIRA

**Curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas incorporadas em géis carregados:
um estudo comparativo com géis proteicos e géis biopoliméricos mistos obtidos a frio**

Pirassununga
2017

THAIS CARVALHO BRITO OLIVEIRA

**Curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas incorporadas em géis carregados:
um estudo comparativo com géis proteicos e géis biopoliméricos mistos obtidos a frio**

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

2017

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

Brito-Oliveira, Thais Carvalho

B862c Curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas incorporadas em géis carregados: um estudo comparativo com géis proteicos e géis biopoliméricos... / Thais Carvalho Brito-Oliveira ; orientadora Prof^a Dr^a Samantha Cristina de Pinho. -- Pirassununga, 2017.

209 f.

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

1. Curcumina. 2. Gelificação a frio. 3. Géis carregados com emulsões. 4. Géis biopoliméricos mistos. 5. Partículas lipídicas sólidas. I. de Pinho, Samantha Cristina, orient. II. Título.

Data da aprovação: 14/06/2017

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Samantha Cristina de Pinho

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

Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Angelo Luiz Fazani Cavallieri

Instituição: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Osvaldo Hector Campanella

Instituição: Universidade de Purdue (Purdue University – PU)

Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Freitas Moraes

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

Aos meus pais, Elaine e Brito, que sempre me ensinaram a buscar e a amar o conhecimento.

Ao meu marido Welton, que é minha grande fonte de força e incentivo.

Aos meus irmãos, Guilherme e Gustavo, que dão leveza às minhas jornadas.

Vocês dão sentido à minha vida.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata:

A Deus, por ter me guiado e me carregado no colo ao longo destes anos.

À Prof^a Dr^a Samantha Cristina de Pinho, que exerce tantos papéis em minha vida, por ter me ensinado muito sobre a pesquisa, o mundo acadêmico e a vida. Sou grata por trabalhar ao seu lado e poder ver, diariamente, você exercendo com tamanha maestria a sua profissão. Você é minha referência e grande inspiração!

Aos meus pais, Elaine e Brito, por terem me apontado o caminho e, principalmente, por terem confiado em mim, e me dado a liberdade e as ferramentas necessárias para segui-lo.

Ao meu marido Welton, por ter apoiado meus sonhos e, principalmente, por estar vivendo-os comigo. Você é a minha fonte de força!

Ao meu irmão Guilherme, por estar sempre ao meu lado, me deixando louca, mas sendo um dos principais motivos da minha lucidez.

Ao meu irmão Gustavo, meu presente de Deus, por trazer tanta leveza e amor aos meus dias.

À Prof^a Dr^a Izabel C.F. Moraes, por ter me ensinado tanto sobre reologia e por ter me apoiado tanto ao longo deste projeto.

Ao Prof. Dr. Osvaldo H. Campanella, por ter me recebido com tanto carinho na Universidade de Purdue, e por ter me orientado e me ajudado tanto com as análises de dicroísmo circular, microscopia eletrônica de varredura, testes de fluência e recuperação e modelagem matemática dos dados. Além de ter me ensinado muito sobre reologia, o senhor sempre será minha grande referência de profissionalismo, competência e humildade.

Aos profissionais: Marcelo Thomazini, Carla Mônaco, Ana Mônica Quinta Barbosa Bittante, Ednelí Soraya Monterrey e Fábio Gallo, pela ajuda com os ensaios realizados na USP/FZEA, e ao Dr. Robert L Seiler (Life Science Microscopy Facility/Purdue University) e Dr^a Patricia Bishop (Chemistry Department/Purdue University) pela assistência técnica com as análises de microscopia eletrônica de varredura e dicroísmo circular, respectivamente.

Aos meus amigos Nyssa Lilovich, Jason Rakoczy, Clayton DeVault e Sasha Lilovich, por todo o carinho e apoio durante os 4 meses nos Estados Unidos, nunca esquecerei dos dias vividos com vocês (I miss you guys!).

Aos amigos do Laboratório de Coloides e Funcionalidade de Macromoléculas (ZEA/FZEA), por todo o companheirismo e apoio ao longo desses anos.

À aluna de graduação Marina Bispo por ter me ajudado tanto com as partículas lipídicas sólidas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Mestrado nacional (processo FAPESP nº 2014/26106-2) e pela bolsa BEPE (processo FAPESP nº 2016/03271-3).

Enfim... A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento profissional ou pessoal ao longo destes anos.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.” - Marie Curie

RESUMO

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

A curcumina é considerada um composto interessante para a indústria de alimentos por apresentar diversas propriedades bioativas e cor amarela intensa, porém sua elevada hidrofobicidade e instabilidade limitam sua aplicação em grande escala. Uma alternativa para a redução de tais problemas consiste na encapsulação deste bioativo em partículas lipídicas sólidas, que, quando estáveis, podem ser aplicadas para a produção de géis carregados com emulsões. Tais sistemas vêm sendo foco de diversas pesquisas por possibilitarem a obtenção de produtos com diferentes propriedades estruturais e sensoriais, a partir da aplicação combinada de diferentes agentes gelificantes e tensoativos. Nesse contexto, o presente projeto de mestrado teve como principais objetivos: a produção, caracterização e estudo da estabilidade de géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas (MLS), produzidos com isolado proteico de soja (IPS) comercial, na presença e ausência de polissacarídeos (goma xantana - GX e goma locusta - GL), bem como a avaliação da estabilidade da curcumina encapsulada nos diferentes sistemas. Para o desenvolvimento desse estudo comparativo, três formulações de géis não-carregados, obtidos a frio, foram selecionadas: formulação G1 (15% IPS, 10 mM CaCl_2 , na ausência de polissacarídeos), formulação G2 (15% IPS, 0,1% GX e 5 mM de CaCl_2) e formulação G3 (15% IPS, 0,2% GL e 15 mM CaCl_2), todas em pH 7 e pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos. Tais sistemas foram utilizados também para a produção de géis carregados com MLS de estearina de palma, estabilizadas com tween 80 e span 80. Géis carregados e não-carregados foram adequadamente caracterizados a partir de ensaios de perfil de textura, avaliações da capacidade de retenção de água, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal de varredura a laser e ensaios reológicos de pequena e grande deformação. Os resultados obtidos mostraram que a presença dos diferentes polissacarídeos alterou de formas distintas a organização estrutural dos géis de IPS, porém, em ambos os casos, as interações entre os biopolímeros resultaram no fortalecimento das estruturas formadas. Além disso, foi verificado que, nos géis carregados, as MLS mostraram-se ativas, fortalecendo a estrutura dos diferentes sistemas analisados. Já a partir do estudo da estabilidade da curcumina encapsulada nos diferentes sistemas, verificou-se que, o bioativo encapsulado em MLS em dispersão apresentou elevada estabilidade ao longo dos 60 dias de armazenamento, por outro lado, em géis carregados, a estabilidade da curcumina foi reduzida após 15 dias de estocagem. Esses resultados estão possivelmente relacionados às alterações estruturais dos géis carregados, verificados a partir de análises de perfil de textura e capacidade de retenção de água, que levaram ao colapso dos sistemas entre os dias 30 e 40 de armazenamento, indicando a necessidade de melhorias nas formulações utilizadas.

ABSTRACT

BRITO-OLIVEIRA, T.C. **Curcumin encapsulated in lipid microparticles incorporated in emulsion filled gels: a comparative study with cold-set protein gels and mixed biopolymer gels.** 2017. 209 f. M. Sc. Dissertation – College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2017.

Curcumin is considered an interesting compound for the food industry, once it presents many bioactive properties and an intense yellow color, however its high hydrophobicity and instability limit its large-scale application. One of the alternatives applied in order to reduce these problems, consists in encapsulating this bioactive in solid lipid particles, which can also be applied for the production of emulsion filled gels. These systems have been frequently studied, once they allow the obtention of products with different structural and sensory properties, through the combined application of different gelling agents and surfactants. In this context, the objectives of this study were: the production, characterization and evaluation of the stability of cold-set emulsion filled gels, produced with commercial soy protein isolate (SPI), at presence and absence of polysaccharides (xanthan gum – XG and locust bean gum – LBG), and also the evaluation of the stability of encapsulated curcumin at the different systems. In order to develop this comparative study, three formulations of cold-set unfilled gels were selected: formulation G1 (15% SPI, 10 mM CaCl_2 , without polysaccharides), formulation G2 (15% SPI, 0,1% XG e 5 mM de CaCl_2) and formulation G3 (15% SPI, 0,2% LBG and 15 mM CaCl_2), all of them produced at pH 7 and pre-heated at 80 °C for 30 minutes. These systems were also applied for the production of emulsion filled gels through the incorporation of solid lipid microparticles (SLM) of palm stearine, stabilized with tween 80 and span 80. Unfilled and emulsion filled gels were characterized through texture profile analysis, water holding capacity evaluations, scanning electron microscopy, confocal laser scanning microscopy and rheological tests (small and large deformations). The results showed that the presence of the polysaccharides – XG and LBG - altered in different ways the structural organizations of the SPI gels, however, in both cases, the interactions between the biopolymers resulted in the strengthening of the structures. Besides, it was verified that the SLM incorporated at EFG were active, reinforcing the structures of the different systems analyzed. On the other hand, through the evaluation of encapsulated curcumin stability, it was verified that the bioactive encapsulated in SLM dispersions presented high stability throughout the 60 days of storage, on the other hand, in EFG, the stability of curcumin started to decrease after 15 days of storage. These results are probably related to the structural alterations of EFG, verified through texture profile analysis and water holding capacity evaluations, which led to the collapse of the systems after 30-40 days of storage, indicating that, in all cases, formulation improvements are required.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da molécula de curcumina	30
Figura 2 Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida.....	32
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura cristalina de núcleos de partículas lipídicas produzidas com lipídios puros (a) e mistura de moléculas lipídicas (b)	33
Figura 4 Representação esquemática da estrutura de géis carregados com emulsão obtidos por (a) gelificação da fase contínua e (b) agregação das gotículas da emulsão.....	35
Figura 5 Esquema ilustrativo dos processos de gelificação por indução térmica e a frio de géis proteicos.	43
Figura 6 Representação esquemática dos três tipos de interações que podem ocorrer em sistemas ternários, constituídos por dois biopolímeros e um solvente.	46
Figura 7 Representação esquemática dos três comportamentos observados em géis biopoliméricos mistos.....	47
Figura 8 Estrutura química das moléculas de goma xantana (A) e goma locusta (B).....	49
Figura 9 Esquema ilustrativo da produção das micropartículas lipídicas sólidas de estearina de palma.	59
Figura 10 Esquema ilustrativo do processo de obtenção a frio dos géis de isolado proteico de soja.....	64
Figura 11 Esquema ilustrativo do processo de obtenção a frio dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e diferentes polissacarídeos.....	66
Figura 12 Modelo esquemático para a compreensão do conceito de potencial zeta.	77
Figura 13 Comportamento do potencial zeta das dispersões de isolado proteico de soja não tratado e após diferentes tratamentos térmicos em diferentes condições de pH.	77
Figura 14 Resultados da análise de solubilidade proteica do isolado proteico de soja gelificante em diferentes condições de pH. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$).....	79

Figura 15 Resultados obtidos a partir da análise de calorimetria diferencial de varredura do IPS submetido a diferentes condições de pH.	80
Figura 16 Resultados da análise de hidrofobicidade superficial das amostras de IPS não tratado.	81
Figura 17 Resultados da análise de hidrofobicidade superficial das amostras de IPS submetidas a diferentes condições de pH e tratamento térmico.	82
Figura 18 Espectro de fluorescência do isolado proteico de soja.	84
Figura 19 Efeito da alteração de pH e diferentes tratamentos térmicos no espectro de dicroísmo circular do IPS	85
Figura 20 Esquema ilustrativo do processo de dobramento/enovelamento de proteínas	87
Figura 21 Distribuição de tamanho de partícula das amostras de MLS produzidas com formulações: (A) EHL-1.1; (B) EHL-1.2; (C) EHL-1.3; (D) EHL-1.4; (E) EHL-1.5; (F) EHL-1.6.	90
Figura 22 Aspecto visual das amostras de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) produzidas com concentração de curcumina igual a: (A) 0,03% (m/m); (B) 0,045% (m/m); (C) 0,063% (m/m).	92
Figura 23 Aspecto visual das amostras de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) produzidas com 0,03% (m/m) de curcumina adicionada, após processo de centrifugação.	93
Figura 24 Diâmetros médios das partículas com 0,03% (m/m) de curcumina encapsulada, após centrifugação, ao longo do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$) para a mesma amostra em diferentes dias de armazenamento.	93
Figura 25 Distribuição de tamanho das partículas nas amostras com 0,03% (m/m) de curcumina encapsulada, após centrifugação, ao longo do período de armazenamento.	94
Figura 26 Resultados das quantificações de curcumina encapsulada nas MLS, ao longo do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$) para a mesma amostra em diferentes dias de armazenamento.	94

Figura 27 Valores dos parâmetros Croma (A), Ângulo de Hue (B) e diferença total de cor (C) das amostras de MLS com 0,03%(m/m) de curcumina encapsulada, após centrifugação, ao longo de 60 dias de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).	95
Figura 28 Diagrama CieLab indicando a sequência de nuances de cores e a orientação do ângulo de Hue.	95
Figura 29 Imagem obtida por microscopia de fluorescência das dispersões de MLS (A) e representação do perfil de intensidade de fluorescência ao longo do diâmetro das MLS (B). ..	96
Figura 30 Estruturas obtidas no processo de obtenção a frio do gel de isolado proteico de soja classificadas como (A) amostra com separação de fases; (B) dispersão pouco viscosa; (C) dispersão viscosa; (D) dispersão muito viscosa; (E) gel não sustentável; (F) gel sustentável fraco; (E) gel sustentável forte.....	97
Figura 31 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis de isolado proteico de soja, submetidas à pré-tratamento térmico a: 60 °C por 15 min (A); 60 °C por 30 min (B).	98
Figura 32 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis de isolado proteico de soja, submetidas à pré-tratamento térmico a: 80 °C por 15 min (A); 80 °C por 30 min (B).	101
Figura 33 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 7 analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).	104
Figura 34 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 9 analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.	106
Figura 35 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 11 analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de	

mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.	108
Figura 36 CRA das amostras de géis produzidas em pH: (A) 7; (B) 9; (C) 11. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.....	109
Figura 37 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana, submetidas à pré-tratamento térmico a: 60 °C por 15 min (A); 60 °C por 30 min (B).	113
Figura 38 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana, submetidas à pré-tratamento térmico a: 80 °C por 15 min (A); 80 °C por 30 min (B).	114
Figura 39 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 7, 15% IPS (m/v) e 0,1% GX (m/v) analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).....	119
Figura 40 CRA das amostras de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana, com diferentes concentrações de CaCl_2 e condições de pré-aquecimento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.	119
Figura 41 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta, submetidas à pré-tratamento térmico a: 60 °C por 15 min (A); 60 °C por 30 min (B).	120
Figura 42 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta, submetidas à pré-tratamento térmico a: 80 °C por 15 min (A); 80 °C por 30 min (B).	121

Figura 43 Resultados da análise de perfil de textura dos géis produzidos com pH 7, 15% IPS (m/v), submetidos a 80 °C/30 min. e diferentes concentrações de GL e CaCl₂, analisados quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal. 125

Figura 44 CRA das amostras de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta, com diferentes concentrações de CaCl₂ e condições de pré-aquecimento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal. 125

Figura 45 Avaliação do efeito das diferentes proporções de substituição da água por dispersões de MLS nas formulações de géis de IPS (G1) e géis biopoliméricos mistos de IPS com GX (G2) e com GL (G3). 126

Figura 46 Aspectos visuais dos géis carregados produzidos a partir da substituição diferentes proporções (25%, 50%, 75% e 100%) de água por dispersão de MLS em sistemas com formulações G1 (A), G2 (B) e G3 (C). 127

Figura 47 Resultados da análise de perfil de textura dos géis carregados com MLS, a partir da substituição de diferentes proporções de água por dispersão de partículas, nas formulações G1, G2 e G3, quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes substituições de água por MLS. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma substituição de água por MLS. 128

Figura 48 CRA dos géis carregados com MLS, a partir da substituição diferentes proporções de água por dispersão de partículas nas formulações G1, G2 e G3. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes substituições de água por MLS. Médias seguidas de letras

maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma substituição de água por MLS.	130
Figura 49 Resultados das análises de microscopia confocal de varredura a laser dos géis com formulação G1 não-carregado (A) e carregado (B).....	132
Figura 50 Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos, de géis não-carregados (A, B, C) e carregados (D, E, F) produzidos com formulação G1	132
Figura 51 Resultados das análises de microscopia confocal de varredura a laser dos géis com formulação G2 não-carregado (A) e carregado (B).....	133
Figura 52 Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos, de géis não-carregados (A, B, C) e carregados (D, E, F) produzidos com formulação G2.	133
Figura 53 Resultados das análises de microscopia confocal de varredura a laser dos géis com formulação G3 não-carregado (A) e carregado (B).....	134
Figura 54 Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos, de géis não-carregados (A, B, C) e carregados (D, E, F) produzidos com formulação G3	134
Figura 55 Resultados dos testes de varredura de deformação para os géis com formulações G1, G2 e G3, não-carregados (A) e carregados com MLS (B).	146
Figura 56 Resultados dos testes de varredura de frequência para os géis, não-carregados com MLS, de formulações G1, G2 e G3.	147
Figura 57 Valores de $\tan \delta$ (G''/G') em função da frequência para os géis, não-carregados (A) e carregados (B) com MLS, de formulações G1, G2 e G3.....	148
Figura 58 Resultados dos testes de varredura de tensão dos géis não-carregados (A) e carregados (B) com MLS, produzidos com formulações G1, G2 e G3.....	149
Figura 59 Resultados dos testes de fluência e recuperação dos géis não-carregados (A) e carregados com MLS (B) com formulações G1, G2 e G3.	152

Figura 60 Taxas de recuperação dos géis carregados e não-carregados com MLS com formulações G1, G2 e G3. Médias identificadas com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para os mesmos sistemas (géis carregados ou não-carregados) produzidos com diferentes formulações (G1, G2 e G3). Médias identificadas com letras maiúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para sistemas diferentes produzidos com as mesmas formulações (G1, G2 e G3).	153
Figura 61 Resultados dos testes de fluência e recuperação dos géis não-carregados (A) e carregados com MLS (B) com formulações G1, G2 e G3, representados pelo modelo de Burger.	155
Figura 62 Resultados dos testes de fluência e recuperação dos géis não-carregados (A) e carregados com MLS (B) com formulações G1, G2 e G3, representados pelo modelo baseado na abordagem da derivada fracionária.	159
Figura 63 Resultados das análises de compressão uniaxial dos géis carregados e não-carregados com MLS, com formulações G1, G2 e G3. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas iguais (carregados ou não-carregados) produzidos com formulações distintas (G1, G2 ou G3). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas distintos, produzidos com a mesma formulação.	163
Figura 64 Resultados das análises de compressão uniaxial dos géis carregados com MLS, com formulações G1, G2 e G3, realizadas com diferentes velocidades de compressão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas produzidos com formulações distintas (G1, G2 ou G3) e analisados com a mesma velocidade de compressão. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas distintos, produzidos com a mesma formulação e analisados com velocidades de compressão distintas.	165
Figura 65 Aspecto visual dos géis não-carregados contendo curcumina livre, com formulações G1, G2 e G3.	166
Figura 66. Aspectos visuais dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina, com formulações G1, G2 e G3	166

Figura 67 Resultados dos ensaios de colorimetria instrumental dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem..... 173

Figura 68 Resultados dos ensaios de colorimetria instrumental dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem..... 174

Figura 69 Resultados dos ensaios de TPA dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem..... 178

Figura 70 CRA dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem. 179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valor de EHL e estrutura molecular dos tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas.....	55
Tabela 2 Formulações testadas para determinação do EHL da estearina de palma e otimização das condições de produção das micropartículas lipídicas sólidas.	61
Tabela 3 Variáveis testadas para a otimização das condições de produção dos géis de isolado proteico de soja obtidos a frio.....	64
Tabela 4 Variáveis testadas para a otimização das condições de produção a frio dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta.	66
Tabela 5 Variáveis testadas para a otimização das condições de produção a frio dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana.	66
Tabela 6 Formulações utilizadas para a produção dos géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas.	67
Tabela 7 Composição centesimal do isolado proteico de soja utilizado neste trabalho de Mestrado, em base seca	75
Tabela 8 Proporções das diferentes conformações estruturais obtidas por meio da análise do espectro de dicroísmo circular de amostras de IPS não tratadas e submetidas a diferentes condições de pH e tratamentos térmicos	87
Tabela 9 Valores de span das amostras de MLS produzidas com formulações contendo diferentes proporções Tween 80/Span 80.....	91
Tabela 10. Parâmetros das equações tipo lei de potência dos géis e géis carregados com emulsão (EFG) produzido com diferentes formulações.	148
Tabela 11 Parâmetros do modelo de Burger utilizados para descrever os resultados de fluência e recuperação de géis carregados (EFG) e não-carregados com MLS produzidos com formulações G1, G2 e G3.....	156
Tabela 12 Contribuição de cada elemento do modelo de Burger na compliança máxima de géis carregados (EFG) e não-carregados com MLS, produzidos com formulações G1, G2 e G3.	156

Tabela 13 Parâmetros do modelo baseado na abordagem da derivada fracionária utilizados para descrever os resultados de fluência e recuperação de géis carregados (EFG) e não-carregados com MLS produzidos com formulações G1, G2 e G3.....	160
Tabela 14. Resultados dos ensaios de colorimetria instrumental dos géis não-carregados contendo curcumina livre e géis carregados com MLS encapsulando curcumina no primeiro dia de estocagem.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS	– ácido 8-anilino naftaleno-sulfônico
CRA	– capacidade de retenção de água
DC	- Dicroísmo circular
DMSO	– dimetilsulfóxido
DSC	– calorimetria diferencial de varredura
DTC	- diferença total de cor
EHL	– equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EFG	– géis carregados com emulsão
EP	– estearina de palma
FTIC	– fluoresceína-5-isotiocianato
GX	– goma xantana
GL	– goma locusta
IPS	– isolado proteico de soja
MEV	– microscópio eletrônico de varredura
MLS	– micropartículas lipídicas sólidas
Phe	– fenilalanina
RVL	– região de viscoelasticidade linear
SAOS	– <i>small amplitude oscillatory shear</i> , testes oscilatórios de pequena amplitude
TPA	– análise de perfil de textura
Trp	– triptofano
Tyr	– tirosina
UE	– umidade espremível
WP	– proteína de soro
WPI	– isolado proteico de soro

LISTA DE SÍMBOLOS

ζ - potencial zeta (mV)

EM - mobilidade eletroforética ($\mu\text{m.s}^{-1}/\text{volt.cm}^{-1}$)

η - viscosidade do meio de dispersão

D - constante dielétrica do meio

CaCl_2 – cloreto de cálcio

G' – módulo de armazenamento

G'' – módulo de perda

K' e K'' - constantes de Lei da Potência

n' e n'' – expoentes de frequência do modelo Lei da Potência

ω - frequência angular.

J₀ - compliança instantânea (Pa^{-1})

η_0 - viscosidade do amortecedor do modelo de Maxwell (Pa.s)

J₁ - compliança associada ao elemento de Kelvin-Voigt (Pa^{-1})

λ_{ret} - tempo de retardamento associado ao elemento de Kelvin-Voigt (s)

t₁ - tempo em que a tensão é removida

J(t) - compliança (%/Pa)

$\varepsilon(t)$ - deformação instantânea (%)

σ_0 - tensão aplicada (Pa)

t_m - tempo experimental em que a tensão é removida e a análise de recuperação é iniciada, Γ é a função gama,

α - grau de elasticidade

λ_1 - inverso do módulo de elasticidade na análise de fluência

λ_2 - inverso do módulo de elasticidade na análise de recuperação

E_g - módulo de Young

σ_H - tensão de Hencky

ε_H - deformação de Hencky

°C – graus Celsius

L* – luminosidade variando do preto ao branco

a* – cromaticidade no eixo variando de vermelho verde

b* – cromaticidade no eixo variando do amarelo ao azul

L₀*, a₀* e b₀*- parâmetros obtidos no dia zero de estocagem

L*, a* e b*- parâmetros obtidos no dia de amostragem

C^*ab – croma (saturação da cor)

h° – ângulo de Hue (tonalidade definida em graus)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1	CURCUMINA: ESTRUTURA E PROPRIEDADES.....	30
2.2	PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	31
2.3	GÉIS CARREGADOS COM EMULSÕES (emulsion-filled gels)	34
2.4	ISOLADO PROTEICO DE SOJA (IPS).....	38
2.4.1	Isolado proteico de soja: composição proteica e efeitos da desnaturação.....	38
2.4.2	Propriedades funcionais do isolado proteico de soja: gelificação a frio e sua importância na indústria de alimentos.....	40
2.5	GÉIS BIOPOLIMÉRICOS MISTOS.....	45
2.6	REOLOGIA NA CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS	50
3	HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA	51
4	OBJETIVOS	54
5	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1	MATERIAIS	55
5.2	MÉTODOS	56
5.2.1	Caracterização do isolado proteico de soja	56
5.2.1.1	Determinação da composição centesimal.....	56
5.2.1.2	Determinação do ponto isoelétrico.....	56
5.2.1.3	Índice de solubilidade de nitrogênio	56
5.2.1.4	Determinação do comportamento térmico por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	

5.2.1.5	Determinação da hidrofobicidade superficial.....	57
5.2.1.6	Fluorescência intrínseca do triptofano	58
5.2.1.7	Dicroísmo Circular.....	58
5.2.2	Encapsulação da curcumina em micropartículas lipídicas sólidas de estearina de palma estabilizadas com tween 80 e span 80	59
5.2.2.1	Determinação do valor do EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) para produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) de estearina de palma	60
5.2.2.2	Encapsulação da curcumina	61
5.2.2.3	Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula	61
5.2.2.4	Quantificação da curcumina encapsulada nas micropartículas lipídicas sólidas.....	62
5.2.2.5	Colorimetria instrumental	62
5.2.2.6	Microscopia de fluorescência.....	63
5.2.3	Produção dos géis carregados e não-carregados com micropartículas lipídicas sólidas, obtidos a frio	63
5.2.3.1	Determinação das melhores condições de produção dos géis de isolado proteico de soja	63
5.2.3.2	Determinação das melhores condições de produção dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e diferentes polissacarídeos (goma xantana e goma locusta)	64
5.2.3.3	Determinação das melhores condições de produção dos géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas	67
5.2.3.4	Construção dos diagramas visuais e caracterizações preliminares.....	67
5.2.4	Caracterização dos géis carregados e não-carregados com micropartículas lipídicas sólidas	67
5.2.4.1	Perfil de textura (TPA).....	68
5.2.4.2	Capacidade de retenção de água.....	68
5.2.4.3	Análise por microscopia confocal de varredura a laser.....	69

5.2.4.4	Análise por microscopia eletrônica de varredura	69
5.2.4.5	Ensaio de varredura de deformação e varredura da frequência	70
5.2.4.6	Ensaio de fluência e recuperação.....	71
5.2.4.6.1	Modelagem matemática: Modelo de Burger	71
5.2.4.6.2	Modelagem matemática: abordagem da derivada fracionária.....	72
5.2.4.7	Análise de compressão uniaxial	72
5.2.5	Avaliação da estabilidade da curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas sólidas incorporadas em géis carregados.....	73
5.2.6	Análises Estatísticas	74
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.1	CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE SOJA.....	74
6.1.1	Composição centesimal.....	74
6.1.2	Determinação do ponto isoeletrico.....	75
6.1.3	Análise de solubilidade proteica.....	78
6.1.4	Determinação do comportamento térmico do IPS por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	79
6.1.5	Hidrofobicidade superficial.....	80
6.1.6	Fluorescência intrínseca do triptofano	82
6.1.7	Dicroísmo circular.....	84
6.2	ENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA EM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	89
6.3	DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO A FRIO DOS GÉIS DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA.....	96
6.3.1	Construção dos diagramas visuais.....	96
6.3.2	Perfil de textura	103

6.3.3	Capacidade de retenção de água.....	109
6.4	DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO A FRIO DOS GÉIS BIOPOLIMÉRICOS MISTOS.....	111
6.4.1	Géis biopoliméricos mistos produzidos com isolado proteico de soja e goma xantana..	112
6.4.1.1	Construção dos diagramas visuais.....	112
6.4.1.2	Perfil de textura e capacidade de retenção de água	117
6.4.2	Géis biopoliméricos mistos produzidos com isolado proteico de soja e goma locusta...	119
6.4.2.1	Construção dos diagramas visuais.....	119
6.4.2.2	Perfil de textura e capacidade de retenção de água	123
6.5	DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO A FRIO DOS GÉIS BIOPOLIMÉRICOS MISTOS CARREGADOS COM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	125
6.6	CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS NÃO-CARREGADOS E CARREGADOS COM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PRODUZIDOS COM DIFERENTES FORMULAÇÕES: ESTUDO COMPARATIVO	131
6.6.1	Microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura.....	131
6.6.2	Ensaio de varredura de deformação e varredura da frequência	139
6.6.3	Ensaio de fluência e recuperação.....	148
6.6.3.1	Modelagem matemática: Modelo de Burger	153
6.6.3.2	Modelagem matemática: Abordagem da derivada fracionária.....	156
6.6.4	Ensaio de compressão uniaxial.....	160
6.6.4.1	Efeito da adição de polissacarídeos e da incorporação de micropartículas lipídicas sólidas nos géis de isolado proteico de soja	160
6.6.4.2	Efeito da aplicação de diferentes velocidades de compressão nas propriedades dos géis carregados	163

6.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS GÉIS CARREGADOS COM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ENCAPSULANDO CURCUMINA.....	165
6.7.1 Colorimetria instrumental	165
6.7.2 Perfil de textura e capacidade de retenção de água	175
7 CONCLUSÕES.....	179
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182
APÊNDICES.....	204
APÊNDICE A - Aspecto visual dos géis sustentáveis de isolado proteico de soja obtidos a frio produzidos com pH 7, não-carregados com MLS.....	204
APÊNDICE B - Aspecto visual dos géis sustentáveis de isolado proteico de soja obtidos a frio produzidos com pH 9, não-carregados com MLS.....	205
APÊNDICE C - Aspecto visual dos géis sustentáveis de isolado proteico de soja obtidos a frio produzidos com pH 11, não-carregados com MLS.....	206
APÊNDICE D - Aspecto visual dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e diferentes polissacarídeos (goma xantana – GX e goma locusta – GL), obtidos a frio, classificados como géis sustentáveis fortes, não-carregados com MLS.....	207
ANEXOS.....	208
ANEXO A – Ficha de especificação do isolado proteico de soja comercial, disponibilizada pelo fornecedor (Marsul Proteínas LTDA).	208
ANEXO B – Ficha de especificação da estearina de palma, disponibilizada pelo fornecedor (Agropalma).	209

1 INTRODUÇÃO

A curcumina é um polifenol hidrofóbico obtido do rizoma da cúrcuma, muito interessante para a indústria de alimentos graças à sua cor e às suas diversas propriedades funcionais. Tal composto pode ser utilizado como aditivo, aromatizante, conservante e corante, uma vez que ela não apresenta toxicidade, mesmo em altas concentrações. Apesar de tantos benefícios, algumas características desse bioativo tornam sua aplicação em larga escala desafiadora, como, por exemplo, a hidrofobicidade e a instabilidade a condições extremas de acidez, alcalinidade e exposição à luz. Para reduzir tais limitações de formulação e bioacessibilidade, muitas alternativas vêm sendo estudadas, como, por exemplo, a encapsulação da curcumina em matrizes lipídicas que são capazes de encapsular uma grande quantidade de materiais hidrofóbicos, e podem aumentar a absorção de bioativos lipofílicos.

Nesse contexto, surge o interesse na aplicação de partículas lipídicas sólidas, que podem ser definidas como carreadores lipídicos similares às emulsões óleo em água (o/w), nos quais o óleo é substituído por um lipídio sólido ou mistura de lipídios sólidos à temperatura ambiente. Essas partículas são utilizadas para encapsular, proteger e liberar componentes funcionais lipofílicos e apresentam diversas vantagens, como por exemplo, a capacidade de controlar a liberação dos ativos encapsulados, a proteção de substâncias sensíveis à degradação química, a facilidade de escalonamento de produção, o baixo custo, a matriz lipídica composta por lipídios biocompatíveis, o uso de processos que independem de solventes orgânicos e o controle da liberação do material encapsulado, graças à pequena mobilidade deste no núcleo sólido das partículas.

A partir da adequada caracterização, dispersões estáveis de partículas lipídicas sólidas podem ser utilizadas, por exemplo, para a produção de géis carregados com emulsões (neste texto denominados apenas como “géis carregados”), que consistem de gotículas ou partículas lipídicas aprisionadas em matrizes gelificadas. Tais sistemas vêm sendo foco de diversas pesquisas por possibilitarem a redução do teor lipídico dos produtos sem reduções extremas na qualidade sensorial dos mesmos. Esses estudos visam à caracterização completa dos géis carregados para a compreensão da influência de fatores, como as características da matriz gelificada, os tensoativos utilizados, a concentração lipídica e as interações entre os diversos componentes, nas propriedades finais dos géis carregados. As características reológicas dos sistemas, características de degradação da matriz de gel e as interações entre gotículas de óleo e matriz podem ser amplamente utilizadas como ferramentas analíticas para a obtenção de

conhecimentos fundamentais sobre a organização estrutural, interações dos componentes e, consequentemente, sobre as características sensoriais dos géis carregados.

Dentre os diversos ingredientes aplicados para a formação de tais matrizes gelificadas está o isolado proteico de soja (IPS). O IPS é muito interessante para a indústria de alimentos por apresentar alto valor nutricional e diversas propriedades funcionais, que dependem de fatores como a composição, estrutura, grau de dissociação, desnaturação ou agregação dos principais componentes desse ingrediente: as globulinas 11S e 7S. A produção de géis de IPS, por meio de uma série de processos que aumentam as interações moleculares do sistema até a formação de uma rede contínua com propriedades viscoelásticas características, é comumente realizada por indução térmica, porém, a gelificação em temperaturas baixas ou ambiente vem sendo estudada e aplicada, visando à redução das perdas de qualidade do produto final ocasionadas pelo tratamento térmico.

Embora alguns estudos sobre a gelificação a frio do IPS tenham sido desenvolvidos, a maior parte dos pesquisadores utiliza IPS obtido em laboratório, o que dificulta a posterior aplicação do processo em escala industrial, uma vez que IPS comerciais geralmente sofrem modificações estruturais em decorrência do processo de obtenção da matéria prima, o que resulta, por exemplo, em redução da solubilidade e das propriedades funcionais desejáveis de tal ingrediente.

Uma das alternativas para reduzir essa problemática consiste na aplicação combinada de IPS e polissacarídeos, como a goma xantana e a goma locusta, que podem contribuir para a estabilização das estruturas proteicas e, consequentemente, melhorar suas propriedades funcionais. Por esse motivo, o estudo de géis biopoliméricos mistos também é interessante para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

Nesse contexto, o presente projeto tem como principal objetivo a produção, caracterização e estudo da estabilidade de géis produzidos com isolado proteico de soja comercial, na presença e ausência de polissacarídeos (goma xantana e goma locusta), carregados com micropartículas lipídicas sólidas estabilizadas com Tween 80 e Span 80, bem como o estudo da estabilidade da curcumina encapsulada nos diferentes sistemas (dispersão e géis carregados com diferentes formulações).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CURCUMINA: ESTRUTURA E PROPRIEDADES

A curcumina (1,7-bis[4-hidroxi-3-metoxifenil]-1,6-heptadieno-3,5-diona), cuja estrutura química está ilustrada na Figura 1, é um polifenol hidrofóbico que representa aproximadamente 77% do total de pigmentos encontrados no rizoma da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008; PRASAD et al., 2014). Tal composto, conhecido por apresentar cor amarela intensa e o odor característico, vem sendo muito abordado na literatura devido às suas diversas alegadas propriedades funcionais, relacionadas fundamentalmente com sua característica antioxidante, tais como as atividades anti-inflamatória, antiviral, anticarcinogênica, neuroprotetora, cardioprotetora, renoprotetora e antimicrobiana (BAYRAK et al. 2008; CHOUDHURI et al., 2005; LIM et al. 2001; MANIKANDAN et al., 2004; RAMIREZ-TOSTOSA et al. 1999; SA; DAS, 2008; XIA et al. 2007).

Figura 1 Estrutura da molécula de curcumina

CHEN, L. et al. Encapsulation of curcumin in recombinant human H-chain ferritin increases its water-solubility and stability. **Food Research International**, Great Britain, v. 62, p. 1147–1153, 2014.

Essas propriedades funcionais e características físico-químicas fazem da curcumina um ingrediente interessante para a indústria de alimentos, uma vez que pode ser aplicada como aromatizante, conservante e corante, em substituição aos corantes amarelos artificiais alergênicos como a tartrazina (amarelo #5) e o amarelo crepúsculo (amarelo #6), além de não apresentar toxicidade, mesmo em altas concentrações (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; CHEN et al., 2014; MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007; SILVA FILHO et al., 2009; SIVIERO et al., 2015; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008).

Embora apresente muitas vantagens, a aplicação da curcumina em produtos alimentícios é limitada devido à sua elevada hidrofobicidade e instabilidade a diferentes condições de pH e exposição à luz, que reduzem sua absorção e a bioacessibilidade, além do

sabor picante característico desse composto, que pode alterar significativamente as propriedades sensoriais dos produtos finais (ANAND et al., 2007; KIDD, 2009).

Dentre as diversas alternativas que vêm sendo estudadas e desenvolvidas para a redução desses problemas de formulação, estabilidade e bioacessibilidade da curcumina está a encapsulação deste bioativo em matrizes lipídicas, tais como as partículas lipídicas sólidas (GOTA et al., 2010; KIM et al., 2014; RAHMAN; RAMANATHAN; SANKAR, 2014), lipossomas (BARUI et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2008; TIKEKAR; PAN; NITIN, 2013; SILVA et al., 2017) e nanoemulsões (ANUCHAPREEDA et al., 2012; BORRIN et al., 2016; SARI et al., 2015), que se mostram interessantes, por serem capazes de encapsular uma grande quantidade de materiais hidrofóbicos e aumentar a absorção de bioativos lipofílicos (JEONG; PARK; PARK, 2007; LI; BRAITEH; KURZROCK, 2005; MAITI et al. 2007; MARCZYLO et al., 2007; PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007).

2.2 PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

O crescente interesse das indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos no desenvolvimento e domínio de técnicas de encapsulação de compostos hidrofóbicos em carreadores lipídicos é justificado pela necessidade da aplicação, administração e liberação controlada de drogas e substâncias com propriedades bioativas, que geralmente apresentam baixa solubilidade em água, baixa estabilidade físico-química e baixa bioacessibilidade. Nesse contexto, sistemas compostos por matrizes lipídicas, tais como os lipossomas (AKBARZADEH et al., 2013; MEURE; FOSTER; DEHGHANI, 2008), as emulsões e nanoemulsões (MCCLEMENTS, 2007; ROUSSEAU, 2000) e as partículas lipídicas sólidas (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002) são considerados interessantes por serem capazes de encapsular uma grande quantidade de substâncias hidrofóbicas e aumentar a bioacessibilidade das mesmas (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; PARADA; AGUILERA, 2007).

Dentre esses sistemas, as partículas lipídicas sólidas destacam-se por combinarem todas as vantagens de aplicação dos demais, e apresentarem elevada estabilidade, biocompatibilidade, elevada capacidade de proteção de substâncias sensíveis à degradação química, possibilidade de escalonamento de produção, custo relativamente baixo e uso de processos livres de solventes orgânicos (LA TORRE; PINHO, 2015; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000).

Tais carreadores lipídicos são similares às emulsões óleo em água (o/w), porém apresentam núcleos constituídos de um lipídio sólido ou mistura de lipídios sólidos à temperatura ambiente, como ilustrado na Figura 2, o que limita a mobilidade dos materiais encapsulados, se comparados com uma emulsão convencional e resulta em um elevado controle da liberação dos compostos encapsulados (SOUTO, 2005; SOUTO; MÜLLER, 2006).

Figura 2 Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida

Fonte: Adaptado de EKAMBARAM, P. et al. Solid lipid nanoparticles: a review. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 2, n. 1, p. 80-102, 2012.

Para uma aplicação satisfatória das partículas lipídicas sólidas, os sistemas devem ser adequadamente caracterizados, principalmente, quanto ao tamanho das partículas, o potencial zeta e o grau de cristalinidade lipídica. A determinação do grau de cristalinidade é fundamental, uma vez que as propriedades dos lipídios utilizados podem ser drasticamente alteradas quando ele é trazido para o estado coloidal disperso, interferindo na capacidade de incorporação e nas taxas de liberação do material encapsulado (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

As diferentes formas e transformações polimórficas dos lipídios, ou seja, as diferentes formas com que estes podem cristalizar são influenciadas por fatores como o tipo de lipídio utilizado, o tipo e concentração de emulsificantes e a taxa de resfriamento dos sistemas (HIMAWAN; STAROV; STAPLEY, 2006; TIMMS, 1984).

As características e o grau de pureza dos lipídios utilizados para a produção das partículas lipídicas sólidas afetam diretamente na capacidade de proteção do material encapsulado e, nesse contexto, existem, basicamente, dois tipos de sistemas: (i) dispersões produzidas com lipídios altamente purificados; (ii) dispersões produzidas a partir de uma mistura de lipídios, como ilustrado na Figura 3. Quando as partículas lipídicas sólidas são produzidas com lipídios altamente purificados, estruturas cristalinas muito organizadas podem

ser formadas, com pouco espaço para “acomodar” moléculas encapsuladas, o que pode acarretar na expulsão do material encapsulado, resultando no aceleração do processo de oxidação do mesmo, devido à maior exposição a agentes oxidantes (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; TIKEKAR; NITIN, 2011). Por outro lado, quando as partículas lipídicas sólidas são produzidas com uma mistura de lipídios, são formadas estruturas cristalinas mais “desorganizadas”, menos cristalinas e com imperfeições ou lacunas (e eventualmente amorfas), nas quais uma maior quantidade de bioativo pode ser acomodada, acarretando em uma maior capacidade de carga e, conseqüentemente, na prevenção da expulsão do ativo (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura cristalina de núcleos de partículas lipídicas produzidas com lipídios puros (a) e mistura de moléculas lipídicas (b)

Fonte: Adaptado de SOUTO, E.B. **SLN and NLC for topical delivery of antifungals**. 2005. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia, Química e Farmácia, Freie Universität Berlin, Berlin, Alemanha, 2005.

Além do tipo de lipídio, as características e a concentração dos tensoativos utilizados para a produção das partículas lipídicas sólidas também são fatores importantes e que influenciam muito estabilidade dos sistemas formados (MEHNERT; MÄDER, 2001).

Sabe-se que os tensoativos são constituídos por moléculas anfífilas que apresentam regiões hidrofílicas e hidrofóbicas em sua estrutura e, por esse motivo, são geralmente capazes de adsorver nas interfaces óleo/água durante a produção de partículas lipídicas sólidas e reduzir a tensão interfacial dos sistemas (GRIFFIN, 1949; HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997; MEHNERT; MÄDER, 2001; ZANIN et al., 2002). Por outro lado, sabe-se também que as intensidades das contribuições hidrofóbicas e hidrofílicas de cada tensoativo variam com as características específicas de suas moléculas, e afetam diretamente na capacidade dos

ingredientes em questão em estabilizar os sistemas coloidais formados (GRIFFIN, 1949; ZANIN et al., 2002).

Nesse contexto, um dos métodos mais amplamente aplicados para o estudo do grau de hidrofobicidade e hidrofiliidade de tensoativos e, conseqüentemente, para a otimização das condições de produção de sistemas coloidais, tais como emulsões e partículas lipídicas sólidas, consiste na determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) dos sistemas (GRIFFIN, 1949; ZANIN et al., 2002). Segundo a literatura, valores que EHL permitem conclusões a respeito dos balanços entre os tamanhos e os momentos dipolares das moléculas e, conseqüentemente, determinam a capacidade emulsificante de determinado tensoativo (ou conjunto de tensoativos), bem como a estabilidade de sistemas formados (GRIFFIN, 1949).

Além de serem determinantes para a estabilidade partículas lipídicas sólidas, as propriedades dos tensoativos podem afetar diretamente o grau de cristalinidade da fase lipídica dispersa, uma vez que uma grande fração das moléculas lipídicas interage com os emulsificantes, devido ao tamanho reduzido das partículas, e o tensoativo é, por tanto, capaz de modular o processo de cristalização e alterar a estabilidade cinética do cristal gerado (BUNJES; KOCH; WESTESEN, 2003; HELGASON et al. 2009; MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Frente a essa discussão, é evidente que a caracterização detalhada das dispersões de partículas lipídicas sólidas é fundamental para sua adequada aplicação, porém a incorporação desses sistemas em alimentos exige ainda cuidados especiais quanto à qualidade sensorial dos produtos, uma vez que a percepção de partículas pode variar com as características do sistema (tipo, a forma, o tamanho, a dureza, e a forma com as partículas dispersas) e também do tipo de alimento, visto que em alguns produtos as partículas não são percebidas enquanto em outros a presença é evidente (CHOJNICKA-PASZUN; DOUSSINAULT; DE JONGH, 2014).

2.3 GÉIS CARREGADOS COM EMULSÕES (*emulsion-filled gels*)

Dispersões de partículas lipídicas sólidas ou emulsões estáveis podem ser utilizadas para a produção de sistemas conhecidos como géis carregados com emulsões (neste texto, denominados apenas como “géis carregados”).

Tais sistemas consistem de gotículas ou partículas lipídicas incorporadas em matrizes gelificadas, e podem ser obtidos a partir de uma emulsão estável por meio da gelificação da fase contínua, ou por agregação das gotículas da emulsão provocadas por algum tipo de operação, como tratamento térmico, acidificação e tratamento enzimático, como

esquemático na Figura 4 (DICKINSON, 2012; OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; SALA et al., 2009; VAN VLIET, 1988).

Figura 4 Representação esquemática da estrutura de géis carregados com emulsão obtidos por (a) gelificação da fase contínua e (b) agregação das gotículas da emulsão.

Fonte: 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.

Esses sistemas são amplamente encontrados em produtos alimentícios (por exemplo, iogurtes, queijos frescos, gelatinas e sobremesas lácteas) e vem sendo apontados como alternativas interessantes para a redução do conteúdo lipídico de produtos sem reduções significativas na qualidade sensorial dos mesmos (LIU et al. 2015; OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; PARADISO et al. 2015; SALA et al., 2007).

Uma vez que a percepção sensorial ocorre fundamentalmente durante a mastigação, o grau de deformação e as propriedades estruturais dos alimentos durante esse processo estão amplamente relacionadas à aceitabilidade dos produtos (ABHYANKAR; MULVIHILL; AUTY, 2011). Nesse contexto, análises reológicas de pequenas e grandes deformações, bem como técnicas de observações microscópicas, tem sido utilizadas como ferramentas analíticas para a compreensão da organização estrutural dos géis carregados, permitindo um ganho de conhecimento e maior controle das características sensoriais dos mesmos (ABHYANKAR; MULVIHILL; AUTY, 2011; DICKINSON, 2012; LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013; SALA et al., 2007; SALA et al., 2008; VAN AKEN; OLIVER; SCHOLTEN, 2015).

Diversos estudos encontrados na literatura mostraram que as propriedades reológicas e de ruptura desses sistemas são influenciadas pelas características da matriz gelificada (por exemplo, agente gelificante, processo de gelificação) (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013; SALA et al, 2008; SALA et al., 2009a), da fase lipídica dispersa (por exemplo,

tensoativos apliados, características do lipídio, distribuição das gotículas ou partículas) (SALA et al., 2009b; VAN AKEN; OLIVER; SCHOLTEN, 2015) e das interações entre os componentes do sistema (SALA et al., 2007).

A partir do comportamento reológico e da natureza da interação entre os componentes dos géis carregados, diversos autores classificam as gotículas ou partículas lipídicas como ativas ou inativas (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; SALA et al., 2007; VAN AKEN; OLIVER; SCHOLTEN, 2015; VAN VLIET, 1988). Segundo a literatura, as gotículas são consideradas ativas quando estão mecanicamente ligadas ao gel, e, neste caso, podem aumentar ou diminuir o módulo elástico do sistema, dependendo da sua concentração, reduzir a deformação de fratura e aumentar da tensão de fratura. Por outro lado, são consideradas inativas quando não estão mecanicamente ligadas à matriz gelificada, e, neste caso, tendem a reduzir o módulo elástico, reduzir ou aumentar a deformação de fratura e reduzir a tensão de fratura (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015).

Tal classificação é geralmente feita a partir de avaliações dos resultados de testes de compressão uniaxial (SALA et al., 2007; SALA et al., 2009a,b), porém, segundo Sala et al. (2007), em alguns casos, pequenas variações nas interações entre as gotículas ou partículas lipídicas e a matriz gelificada não podem ser observadas a partir do módulo elástico e propriedades de fratura dos géis, obtidos por meios dos testes de grande deformação, fazendo-se necessária a aplicação de testes de pequena deformação. Segundo Tabilo-Munizaga e Barbosa-Cánovas (2005), a aplicação de diversos testes reológicos é fundamental, uma vez que nenhum ensaio é capaz de fornecer todas as informações necessárias para a caracterização completa e adequada dos comportamentos reológicos de sistemas complexos, tais como os géis carregados.

Dentre os autores que investigaram as características de tais sistemas estão estão Abhyankar, Mulvihill e Auty (2011), que estudaram o comportamento reológico e microestrutural de modelos de géis alimentícios, produzidos com proteína de soro de leite (WP), contendo caseinato de sódio (NaCN) ou emulsões produzidas com óleo de girassol e estabilizada com WP ou NaCN, com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), e verificaram que as gotículas de óleo estabilizadas tanto com WP quanto com NaCN encontravam-se ligadas à matriz de gel de WP. Os autores verificaram também que a intensidade das interações variou com o tensoativo. Além disso, os resultados mostraram que a concentração e o tamanho das gotículas de óleo nos géis carregados também afetaram, em diferentes proporções, as propriedades estruturais dos sistemas. Com relação às alterações microestruturais na proteína e na fase oleosa dos géis carregados durante os ensaios

reológicos de grande deformação e ruptura, não foram verificadas grandes diferenças entre as amostras com emulsões estabilizadas com WP e NaCN.

Sala et al. (2007), por sua vez, investigaram o efeito das interações entre as gotículas e a matriz biopolimérica nas propriedades de grande deformação de géis carregados produzidos com gelatina, isolado proteico de soro de leite (IPLS) ou κ -carragena, como agentes gelificantes, e IPSL, agregados de IPSL, lisozima ou Tween 20, como tensoativos. Os autores verificaram que para os géis de gelatina, emulsões estabilizadas com IPSL e lisozima aumentaram o módulo elástico dos sistemas (gotículas ativas), enquanto aquelas estabilizadas com Tween 20, reduziram tal propriedade (gotículas inativas). Para os géis de IPSL, as emulsões estabilizadas com agregados de IPSL, lisozima e baixas concentrações de Tween 20 aumentaram o módulo dos géis (gotículas ativas). Segundo os autores, as variações observadas no módulo de elasticidade dos géis de κ -carragena foram relacionadas a interação entre a matriz e os agentes gelificantes presentes no meio aquoso. Também foi observado que a deformação de fratura dos sistemas reduziu com o aumento da concentração de lipídica para as gotículas ativas, e manteve-se constante para as inativas.

Sala et al. (2008), por outro lado, buscaram compreender o efeito da concentração de óleo e do tipo de gel na percepção sensorial de géis carregados com emulsão. Os autores compararam géis de isolado proteico de soro (WPI), obtidos a frio, gelatina, κ -carragena e mistura de κ -carragena e ι -carragena, carregados com emulsões O/A, estabilizadas com WPI nativo e agregados de WPI. Os autores verificaram que o comportamento dos módulos de cisalhamento, com o aumento da concentração da emulsão, foi dependente do tipo de agente gelificante aplicado. Além disso, o estudo mostrou que a maioria dos atributos abordados na análise descritiva quantitativa (ADQ), como, por exemplo, a cremosidade e fraturabilidade, foi afetada por alterações na concentração de emulsão e pelo tipo de gel.

Kim, Renkema e van Vliet (2001) investigaram o efeito da concentração de emulsão estabilizada com IPS nas propriedades reológicas dos géis de IPS carregados com emulsão obtidos por indução térmica, na ausência e na presença de cloreto de sódio (0,2 M). Os módulos de armazenamento e de perda foram maiores na presença de sal, e aumentaram com o aumento da concentração de emulsão no sistema. Tais aumentos foram maiores que os teoricamente previstos, o que, segundo os autores, ocorreu devido à agregação das gotículas de emulsão antes e durante o processo de gelificação.

Embora diversos estudos encontrados na literatura tenham investigado as características de géis carregados produzidos com proteínas (CHEN; DICKINSON, 1998; CHEN; DICKINSON; EDWARDS, 1999; DICKINSON, 2012; VAN VLIET, 1988; XIONG;

AGUILERA; KINSELLA, 1991) ou polissacarídeos (CHOJNICKA et al., 2009; LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013; PIAZZA; BENEDETTI, 2010; SALA et al., 2007; WEISS; SCHERZE; MUSCHIOLIK, 2005), investigações a respeito das características de géis biopoliméricos mistos carregados e géis produzidos com isolado proteico de soja comercial são escassas.

2.4 ISOLADO PROTEICO DE SOJA (IPS)

2.4.1 Isolado proteico de soja: composição proteica e efeitos da desnaturação

A soja (*Glicine max* L.), cultivada há mais de 3000 anos em diversas regiões da China e outros países asiáticos, tem recebido grande importância econômica devido à sua composição lipídica, elevado valor nutricional, alta produtividade, baixo custo de produção e elevado conteúdo proteico (*i.e.*, 40% do total de matéria seca do grão). Tais características possibilitam a obtenção de produtos como o isolado proteico de soja, que representa 90% em base seca da semente desidratada e desengordurada (FERRARI; DEMIATTI, 2001; FUKUSHIMA, 1994; FUKUSHIMA, 2004; KINSELLA, 1979; KITAMURA, 2010; NISHINARI, 1988; NISHINARI et al. 2014; SGARBIERI, 1996).

Para a produção do isolado proteico de soja, a farinha de soja desengordurada é dispersa em meio aquoso, neutro ou alcalino (pH 7-10), para a extração de proteína e carboidratos solúveis, centrifugada para a remoção dos resíduos insolúveis, e submetida à pH 4,5 (ponto isoelétrico) para a precipitação das proteínas, que são, então, separadas por decantação mecânica, lavadas, neutralizadas e secas ou desidratadas (LIU, 1997; SGARBIERI, 1996).

Devido às suas características nutricionais, ao elevado conteúdo proteico, ao baixo custo de produção e às suas propriedades funcionais (por exemplo, capacidades gelificante, emulsificante e espumante), o isolado proteico de soja é muito aplicado na indústria de alimentos, principalmente no processamento de produtos cárneos (*beef patties*, embutidos), molhos e sopas, produtos emulsificados e produtos lácteos (leite, queijo e iogurte de soja) (DAMODARAN, 1997; KINSELLA, 1979; LIU, 1997; VISSER; THOMAS, 1987).

As propriedades funcionais do IPS, ou seja, as propriedades físico-químicas que afetam seu comportamento em sistemas alimentícios durante o processamento, estocagem, preparo e consumo dependem das características dos principais componentes deste ingrediente: a globulina 11S, ou glicina, e a globulina 7S, ou β -conglícinina (ARRESE et al., 1991; PUPPO; SORGENTINI; AÑÓN, 2003; UTSUMI; MATSUMURA; MORI, 1997). Enquanto a glicina é um hexâmero de massa molecular de aproximadamente 300-380 kDa, cujas

subunidades são formadas por polipeptídeos ácidos (35 kDa) e básicos (20 kDa) unidos por ligações dissulfeto (BADLEY et al., 1975; FUKUSHIMA, 2004; NISHINARI et al. 2014; PENG et al., 1984; STASWICK; HERMODSON; NIELSEN, 1984), a β -conglícinina é uma glicoproteína trimérica, de massa molecular de aproximadamente 150-200 kDa, constituída por subunidades α , α' e β , que apresentam massas moleculares, respectivamente, 68, 72 e 52 kDa (FUKUSHIMA, 2004; THANH; SHIBASAKI, 1977).

As características de tais componentes podem variar com alterações nas propriedades do meio ao qual o isolado proteico de soja é submetido, tais como mudanças de pH, força iônica, temperatura, composição do solvente, dentre outros, que podem acarretar em alterações moleculares e o estabelecimento de novas estruturas de equilíbrio (DAMODARAN, 2010).

Enquanto mudanças sutis na estrutura proteica são conhecidas como “adaptabilidade conformacional”, grandes alterações nas estruturas secundária, terciária e quaternária são conhecidas como desnaturação. A desnaturação proteica é definida como um processo com estado inicial bem definido, formado sob condições fisiológicas, e com um estado final mal definido, sob condições não fisiológicas, que ocorre devido à ação de um agente desnaturante (DAMODARAN, 2010). Dependendo da extensão do processo de desnaturação, fenômenos como agregação das cadeias polipeptídicas desnaturadas, dissociação da proteína em subunidades, desdobramento da estrutura proteica e exposição de seus grupos hidrofóbicos podem ser observados (ARRESE et al., 1991; PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994; PETRUCCELLI; AÑÓN, 1995).

Embora a desnaturação proteica seja com frequência associada a consequências negativas (por exemplo, perda de propriedades biológicas), ela pode ser utilizada para alterações desejáveis nas propriedades funcionais de proteínas alimentares (DAMODARAN, 2010; FOEGEDING; DAVIS, 2011). Para esse propósito, são necessários o desenvolvimento de métodos adequados e o controle dos efeitos dos diferentes fatores que afetam a estabilidade estrutural das proteínas em sistemas alimentícios, tais como temperatura e pH (YAMAUCHI; YAMAGISHI; IWABUSHI, 1991).

O efeito da temperatura na estrutura das proteínas da soja é muito investigado, uma vez que o tratamento térmico é necessário para eliminação fatores antinutricionais e para o aumento da digestibilidade dessas proteínas (SGARBIERI, 1996; WILSON, 1995), além de provocar uma melhoria das propriedades funcionais das mesmas, em muitos casos (KINSELLA, 1979; LIU, 1997; PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994; RENKEMA et al. 2000).

Em geral, assume-se que as temperaturas de desnaturação parcial e total da fração 7S das proteínas da soja ocorrem a, respectivamente, 60° C e 70° C, enquanto da fração 11S

ocorrem a 80° C e 100° C (GARCIA et al., 1997). Porém, como a sensibilidade das globulinas 7S e 11S dependem de diversos fatores, como, por exemplo, a força iônica do meio, o pH, a concentração protéica, dentre outros, alguns valores de temperatura de desnaturação diferentes podem ser encontrados na literatura (GARCIA et al., 1997; YAMAUCHI; YAMAGISHI; IWABUSHI, 1991). Sorgentini, Wagner e Añon (1995), por exemplo, estudaram o efeito do tratamento térmico nas características e na estrutura do isolado proteico de soja e observaram que após tratamento térmico a 80 °C a fração 7S das proteínas foi completamente desnaturada, enquanto na fração 11S a desnaturação foi parcial. Já após o tratamento térmico a 100 °C, os autores verificaram que ambas as frações proteicas foram completamente desnaturadas.

Além da temperatura, outro agente desnaturante muito discutido na literatura é o pH do meio. De maneira geral, o comportamento das proteínas globulares em diferentes condições de pH é determinado pelo número e natureza dos grupos ionizáveis dos resíduos de aminoácidos, uma vez que essas características vão determinar a carga líquida positiva ou negativa da proteína em pH neutro. O pH em que a carga líquida da proteína é zero é conhecido como pH isoelétrico e, nesta condição, as proteínas são mais estáveis à desnaturação (DAMODARAN, 2010; SGARBIERI, 1996).

Com a alteração do pH do meio para valores muito ácidos ou muito básicos as proteínas adquirem uma alta carga líquida, ocasionando um aumento na repulsão eletrostática que resulta na expansão e desdobramento da molécula e, conseqüentemente, a desnaturação proteica. Geralmente, o grau de desnaturação é maior em condições extremas de alcalinidade, uma vez que ocorre a ionização dos grupos carboxílicos, sulfidril e fenólico, que levam ao desenovelamento da cadeia polipeptídica. Embora a desnaturação ocasionada por alterações de pH seja, em muitos casos, reversível, alguns fenômenos como destruição de grupos sulfidril em pHs alcalinos, hidrólises parciais de ligações peptídicas e agregação, podem torná-la um processo irreversível (DAMODARAN, 2010; SGARBIERI, 1996). Muitos trabalhos encontrados na literatura têm estudado o efeito da variação do pH em propriedades funcionais do isolado proteico de soja (JIANG; CHEN; XIONG, 2009; RENKEMA et al. 2000; RENKEMA; GRUPPEN, VLIET, 2002).

2.4.2 Propriedades funcionais do isolado proteico de soja: gelificação a frio e sua importância na indústria de alimentos

As propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas, segundo Pour-El (1981), em cinco grupos distintos: propriedades de hidratação ou hidrofílicas (por exemplo,

solubilidade, capacidade de hidratação e capacidade de retenção de água), propriedades interfásicas (por exemplo, capacidades emulsificante e espumante), propriedades intermoleculares (por exemplo, gelificação, formação de massa visco-elástica, formação de fibras de proteína), propriedades reológicas (por exemplo, viscosidade) e propriedades organolépticas (por exemplo, textura, cor, gosto) (SGARBIERI, 1996). Outros autores, porém, as classificam em três grupos: propriedades de hidratação (interação proteína-água), propriedades relacionadas à interação proteína-proteína e propriedades superficiais (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1993; MESSENS; VAN CAMP; HUYGHEBAERT, 1997). Todas essas propriedades são influenciadas, de diferentes formas, por fatores físico-químicos relacionados à estrutura proteica (tamanho, forma, composição e sequência de aminoácidos, carga líquida, distribuição de cargas, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, estruturas secundária, terciária e quaternária, flexibilidade e rigidez molecular), às características do meio (pH, temperatura e força iônica) e às interações com outros ingredientes nos alimentos (DAMODARAN, 1989; DAMODARAN, 1997; LAKEMON et al., 2000; PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994).

Dentre as propriedades funcionais das proteínas mais exploradas pela indústria alimentícia está a capacidade de formar géis por meio de uma série de processos que aumentam as interações moleculares até a formação de uma rede tridimensional contínua com propriedades de elasticidade macroscópica características (ALTING, 2003; DAMODARAN, 2010; FOEGEDING; DAVIS, 2011; GOSAL; ROSS-MURPHY, 2000; SGARBIERI, 1996). A formação de géis proteicos envolve, basicamente, dois tipos de interações, que ocorrem em diferentes proporções e intensidades: as interações covalentes, que conferem ao gel resistência e estabilidade, e as interações não-covalentes (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas), que são consideravelmente mais fracas (FOEGEDING; DAVIS, 2011; SGARBIERI, 1996).

As propriedades dos géis, tais como a capacidade de retenção de água, permeabilidade, textura e aparência, dependem do tipo e da composição em aminoácidos da proteína, da concentração proteica e das condições do meio (pH, temperatura e força iônica) (BRYANT; McCLEMENTS, 2000; DAMODARAN, 1989; MARANGONI et al., 2000; TOTOSAUS et al., 2002). Dependendo das características dos sistemas obtidos, os géis proteicos podem ser classificados, por exemplo, como coágulos (géis particulados, opacos) ou transparentes (filamentosos, translúcidos). Os géis do tipo coágulo são geralmente formados em condições de pH próximas ao pH isoeletrico da proteína. Durante o processo de desnaturação, as moléculas de proteínas sofrem processo de agregação, e os agregados

insolúveis formados se associam aleatoriamente, formando uma rede desordenada, responsável pelo espalhamento de luz e, conseqüentemente, pela opacidade dos géis obtidos, que são, geralmente, fracos e propensos à sinérese (BARBUT, 1995; DAMODARAN, 2010).

Por outro lado, os géis transparentes ou filamentosos são formados em pHs distantes do pH isoelétrico da proteína. Nesse caso, e em condições de baixa força iônica, a repulsão eletrostática entre os grupos proteicos favorece a formação de agregados mais ordenados, com estrutura homogênea, formada principalmente por interações de pontes de hidrogênio, que geralmente permitem a passagem de luz pelo sistema e apresentam, por tanto, aspectos mais transparentes (BARBUT, 1995; CAVALLIERI, 2007; DAMODARAN, 2010; OAKENFUL; PEARCE; BURLEY, 1997). Nesse contexto, sabe-se que a escolha adequada das condições e métodos de produção é um fator fundamental para a obtenção de sistemas com propriedades desejáveis.

Dentre os diversos métodos aplicados para a obtenção de géis de proteínas globulares, os mais comuns são aqueles que envolvem indução térmica. A formação de uma matriz de gel termicamente induzida pode ser descrita por 3 etapas principais: a etapa de desnaturação ou desdobramento, na qual as proteínas globulares passam de seu estado nativo para um estado desnaturado, com exposição de sítios reativos que favorecem as ligações intermoleculares, a etapa de agregação ou coagulação, na qual ocorre a formação de agregados moleculares lineares em função das ligações entre as proteínas desdobradas, e última etapa que consiste na formação de ligações cruzadas entre as estruturas de agregados lineares e, conseqüentemente, na formação do gel (MANGINO, 1984; TOBITANI; ROSS-MURPHY, 1997). Embora tais métodos sejam comumente aplicados, a gelificação a frio vem sendo investigada e discutida como uma alternativa interessante para a obtenção de produtos finais com qualidade diferenciada (BRITTEN; GIROUX, 2001).

Diferentemente dos métodos de indução térmica, os métodos de indução a frio envolvem apenas duas etapas: a desnaturação proteica pelo calor, seguida de indução da gelificação, em temperatura baixa ou ambiente (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000; TOTOSAUS et al., 2002). A primeira etapa consiste no aquecimento da dispersão proteica em condições que não produzam gel, isto é, em baixa força iônica e em pH diferente do ponto isoelétrico da proteína. Esse processo é necessário para promover a “abertura” da molécula e, conseqüentemente, expor seus aminoácidos reativos (ALTING, 2003; BRYANT; MCCLEMENTS, 2000). Já a segunda etapa consiste na indução do processo de gelificação por meio da neutralização da repulsão eletrostática entre as moléculas, que pode ser realizada pela adição de sal, ácido ou enzimas (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000; TOTOSAUS et al.,

2002). Por tanto, enquanto nos métodos de gelificação a frio a desnaturação parcial e o processo de agregação não ocorrem juntamente com a etapa de gelificação, nos métodos de gelificação por indução térmica todos os processos ocorrem simultaneamente, como ilustrado na Figura 5 (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000; TOTOSAUS et al., 2002).

Figura 5 Esquema ilustrativo dos processos de gelificação por indução térmica e a frio de géis proteicos.

Fonte: CAVALLIERI, A.L.F. **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos.** Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2007.

Além dos métodos de gelificação a frio possibilitarem a adição de compostos sensíveis ao processo de aquecimento, tais como agentes flavorizantes e texturizantes, e reduzirem as perdas de qualidade acarretadas pelo tratamento térmico excessivo, eles também possibilitam a determinação de algumas propriedades dos sistemas antes mesmo da etapa de gelificação, uma vez que na etapa de pré-aquecimento os blocos de agregados protéicos são formados, para posteriormente formarem a rede proteica, ou gel (BRITTEN; GIROUX, 2001; CAVALLIERI, 2007).

Embora os processos de gelificação a frio de proteínas sejam muito explorados na literatura, a maioria dos estudos investiga as propriedades de sistemas produzidos com isolado proteico de soro de leite (IPSL) (BOLDER et al., 2006; BRYANT; MCCLEMENT, 2000; CAVALLIERI; CUNHA, 2008; HONGSPRABHAS; BARBUT, 1997, 1999; JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009; JU; KILARA, 1998). Géis de isolado proteico de soja (IPS)

obtidos a frio ainda são pouco abordados (MALTAIS et al., 2005; MALTAIS; REMONDETTO; SUBIRADE, 2008; MALTAIS; REMONDETTO; SUBIRADE, 2009) e, na maioria dos estudos, os autores utilizam a matéria prima obtida em laboratório, sob condições controladas, o que pode vir a dificultar a posterior aplicação do processo em escala industrial (GARCIA et al., 1998; HERMANSSON, 1986).

Diniz (2007), por exemplo, estudou o efeito do tratamento térmico na fase de produção do isolado proteico de soja (IPS) e o efeito da adição de CaCl_2 na formação de géis de IPS obtidos a frio. O IPS utilizado no estudo foi obtido a partir de farinha desengordurada de soja comercial, e, após a etapa de neutralização, foi tratado a 60 ou 80 °C por 15 ou 30 minutos. A autora verificou que a formação de géis, com valores de G' , G'' e $\tan \delta$ característicos de sólidos viscoelásticos, só foi possível a partir de isolados tratados a 80° C, nas concentrações de 12 e 14% de proteína (p/p), com e sem a adição de CaCl_2 (5 e 15 mM).

Maltais et al. (2005), por sua vez, estudaram o efeito da concentração de proteína e de íons de cálcio nas características de géis de isolado proteico de soja obtidos a frio. Os autores observaram que a formação de géis só foi possível em sistemas com concentrações de proteína entre 6% e 9% e concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) entre 10 e 20 mM. Além disso, o estudo mostrou que as características de opacidade, capacidade de retenção de água e módulo de elasticidade dos géis obtidos foram fortemente dependentes das concentrações de proteína e sal.

Os mesmos autores, posteriormente, realizaram uma detalhada pesquisa a respeito da influência da etapa de pré-aquecimento (105 °C/ 30 min) e da concentração dos íons de cálcio (10 e 20 mM m) na estrutura dos géis de IPS obtidos a frio. Maltais, Remondetto e Subirade (2008) verificaram, por meio de análise de tamanho de partícula e análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IR), que o IPS nativo sofreu processo de desnaturação e agregação com o tratamento térmico aplicado. Além disso, os resultados de FT-IR após a adição de CaCl_2 mostraram um espectro semelhante ao verificado na etapa anterior, indicando que os agregados formados no pré-aquecimento são a base estrutural para a formação do gel. Por meio de análises microscópicas, os autores verificaram também que os géis formados com 10 mM de CaCl_2 eram compostos por filamentos finos e homogêneos, enquanto aqueles formados com 20 mM de CaCl_2 eram compostos por estruturas mais irregulares e com aspectos granulares. Segundo os autores, esses resultados podem ser justificados pela velocidade de redução das forças repulsivas entre os agregados proteicos, que é fortemente influenciada pela concentração de sal adicionada.

2.5 GÉIS BIOPOLIMÉRICOS MISTOS

Texturas e propriedades sensoriais de produtos alimentícios são, muitas vezes, determinadas pela presença de biopolímeros gelificantes, tais como as proteínas e polissacarídeos (ALVAREZ et al., 2012; JONG; VAN DE VELDE, 2007; PEREZ et al., 2009; PICONE; CUNHA, 2010). Esses ingredientes são muito explorados pela indústria de alimentos por apresentarem propriedades interessantes quando aplicados individualmente, e também por possibilitarem o desenvolvimento de produtos com características diferenciadas, quando aplicados em conjunto (JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009).

As características de sistemas mistos produzidos com proteínas e polissacarídeos são geralmente complexas e dependem das propriedades específicas de cada componente, da natureza das interações (atrativas e repulsivas) e das condições do meio (BERTRAND; TURGEON, 2007; CÈSARO et al., 1999; DICKINSON, 1993; LI; ELEYDA; GUNASEKARAN, 2006; SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998).

Em um sistema ternário, constituído por dois biopolímeros e um solvente, três situações de equilíbrio podem ser obtidas: miscibilidade, segregação ou coacervação, como ilustrado na Figura 6 (KRUIF; TUINIER, 2001; SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998). A miscibilidade instantânea é obtida quando as características dos biopolímeros e do ambiente permitem uma interação semelhante à de hidrocoloides iguais. A segregação ou incompatibilidade ocorre quando há repulsão entre as moléculas dos biopolímeros e, conseqüentemente, formação de duas fases aquosas distintas, cada uma rica em um dos componentes (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; KRUIF; TUINIER, 2001; SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998). Finalmente, a coacervação ocorre quando há uma forte atração entre as moléculas dos diferentes biopolímeros que resulta na formação de uma fase aquosa rica nos dois biopolímeros e outra pobre, como ilustrado na Figura 6 (TOLSTOGUZOV, 2003).

Figura 6 Representação esquemática dos três tipos de interações que podem ocorrer em sistemas ternários, constituídos por dois biopolímeros e um solvente.

Fonte: KUHN, K. R.; PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Food Gels. In: TÉLIS, V. R. N. (Org.). **Biopolymer Engineering in Food Processing**. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2012, v. 1, p. 111.

Dada à complexidade das interações, o interesse no estudo e caracterização de sistemas mistos, tais como os géis biopoliméricos produzidos com proteínas e polissacarídeos, é crescente (BI et al., 2017; CHANG ET AL., 2014; KUHN; CAVALLIERI; CUNHA, 2011; MONTEIRO et al., 2013; VAN DE VELDE et al., 2015; VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011). Segundo a literatura, as organizações estruturais de géis biopoliméricos mistos são divididas em três padrões: redes interpenetrantes, redes conjugadas ou redes com separação de fases, ilustrados na Figura 7 (MORRIS, 1997). Dentre eles, os mais comumente encontrados são os sistemas com separação de fases, resultantes da incompatibilidade termodinâmica e consequente repulsão entre as diferentes moléculas. Tal fenômeno pode ser prejudicial, se for macroscopicamente evidente em alimentos, ou desejável, se utilizado para a obtenção de novos produtos e texturas (DICKINSON, 1998; KUHN; CAVALLIERI; CUNHA, 2011; MORRIS, 1997; SANCHEZ et al., 1997). Segundo Jong, Jan Klok e Van De Velde (2009) as características microestruturais e, consequentemente as propriedades desses sistemas, são resultados do balanço entre os processos de separação de fases e de gelificação, que, por sua vez é muito afetado pela carga dos ingredientes aplicados, principalmente dos polissacarídeos.

Figura 7 Representação esquemática dos três comportamentos observados em géis biopoliméricos mistos.

Fonte: CAVALLIERI, A.L.F. **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos.** Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2007.

Diversos trabalhos encontrados na literatura investigam a obtenção e o comportamento de géis biopoliméricos mistos (BRAGA et al., 2006; BRYANT; MCCLEMENTS, 2000; CAVALLIERI; CUNHA, 2008; CAVALLIERI; CUNHA 2009; HUA; CUI; WANG, 2003; IPSEN, 1995; JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009) e muitos autores afirmam que os polissacarídeos podem auxiliar na estabilização das estruturas proteicas, melhorando assim suas propriedades funcionais (CÈSARO et al., 1999; DICKINSON, 1993; KASRAN; CUI; GOFF, 2013; TOLSTOGUZOV, 1997; WANG et al., 2011). Apesar dessa vasta literatura, pesquisas a respeito da obtenção a frio de géis mistos de IPS e polissacarídeos são mais escassas (VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011; CHANG et al., 2014; BI et al., 2017).

Vilela, Cavallieri e Cunha (2011), por exemplo, estudaram a influência da taxa de gelificação nas propriedades de géis mistos de isolado proteico de soja e goma gelana, produzidos por meio de adição de diferentes sais (KCl e CaCl₂). Os autores verificaram que, além da concentração e da composição dos biopolímeros utilizados, o tipo de sal e a velocidade de incorporação do mesmo também foram fatores de influência na estrutura, na sinérese e nas propriedades mecânicas dos géis obtidos. Segundo os autores, nos casos de adição direta de sal as estruturas dos géis eram constituídas por duas redes independentes interpenetradas, uma mais fina e dominante formada pela goma gelana, e outra particulada formada pelo isolado proteico de soja. Além disso, foi verificado que o aumento da concentração de goma gelana levou à formação de redes mais contínuas de polissacarídeo,

uma vez que as moléculas de proteína não foram capazes de se organizar e formar estruturas tubulares, observadas em menores concentrações de polissacarídeo. Nos casos de adição lenta de sal, foram verificadas estruturas diferentes, dependentes do tipo de sal adicionado.

Chang et al. (2014), por outro lado, estudaram a influência da adição de goma xantana e goma guar nas propriedades reológicas e na microestrutura dos géis de isolado proteico de soja obtidos por indução ácida e verificaram que com o aumento da concentração de polissacarídeos, os valores de viscosidade aparente das soluções de biopolímeros aumentaram, assim como os módulos de armazenamento (G') e perda (G''). Segundo os autores, esses resultados podem ser justificados pelas elevadas massas moleculares das gomas e pelas fortes interações existentes entre as moléculas de proteína e de polissacarídeos. Além disso, os autores também verificaram que a adição de polissacarídeos resultou em géis com microestrutura menos homogênea, devido à competição existente entre os processos de gelificação dos agregados proteicos e de separação de fase entre tais agregados e as moléculas de goma xantana e goma guar.

Estudos envolvendo a goma xantana, são muito interessantes, visto que este ingrediente é amplamente aplicado na indústria de alimentos. Este polissacarídeo aniônico natural é produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* e apresenta a estrutura química ilustrada na Figura 8(A), com uma cadeia principal composta por unidades de β -D-glicose ligadas nas posições 1 e 4, e cadeias laterais de trissacarídeos compostas por uma unidade de ácido D-glicurônico, entre duas unidades D-manose. Devido às suas características de compatibilidade com outros ingredientes, estabilidade frente a alterações de temperatura e propriedades reológicas pseudoplásticas, a goma xantana é muito utilizada como estabilizante e espessante (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Outro polissacarídeo muito aplicado na indústria de alimentos é a goma locusta (GL), uma galactomanana obtida por meio da moagem do endosperma da semente da árvore *Ceratonia siliqua* (HIGIRO et al., 2007; MAIER et al., 1993; RAMÍREZ et al., 2002). Esse polissacarídeo, assim como as outras galactomananas (por exemplo, gomas guar e tara), é constituída de uma cadeia principal de unidades de β -D-manopiranosil unidas por ligações (1-4) a ramificações de uma única unidade de α -D-galactopiranosil na posição O-6, como ilustrado na Figura 8(B) (BEMILLER; HUBER, 2010; MANNION et al. 1995). A principal diferença entre as galactomananas é a razão manose/galactose (M/G), que confere a esses polissacarídeos diferentes propriedades e comportamentos na matriz alimentícia, apesar de todos apresentarem cadeias longas, relativamente rígidas, e serem capazes de produzir

soluções de alta viscosidade (BEMILLER; HUBER, 2010). A razão M/G da goma locusta é aproximadamente 3,55 e suas características permitem sua vasta aplicação em produtos lácteos e sobremesas congeladas (BEMILLER; HUBER, 2010; DEA et al., 1977). Muitos estudos encontrados na literatura exploram o efeito sinérgico da goma locusta com outros polissacarídeos, como a goma xantana (BEMILLER; HUBER, 2010; HIGIRO et al., 2007; RAMÍREZ et al., 2002), por exemplo, mas a aplicação deste polissacarídeo com proteínas não é amplamente abordada (BI et al., 2017; MONTEIRO et al., 2013).

Figura 8 Estrutura química das moléculas de goma xantana (A) e goma locusta (B).

Fonte: (A) ROSALAM, S; ENGLAND, R.. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 197–207, 2006. (B) BARAK, S; MUDGIL, D. **Locust bean gum: Processing, properties and food applications - A review**. International Journal of Biological Macromolecules, New York, v. 66, p. 74–80, 2014.

2.6 REOLOGIA NA CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS

Ensaio reológico são muito importantes para a indústria de alimentos, uma vez que são amplamente aplicados para a obtenção de informações fundamentais a respeito das matérias primas, produtos finais e condições de processamento (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; RAO, 2014). Nos casos específicos de amostras gelificadas (como os géis proteicos, géis biopoliméricos mistos e géis carregados com emulsões, discutidos anteriormente) a reologia é indispensável para a compreensão das características e interações existentes entre os diversos componentes desses sistemas, que são considerados complexos.

Frente a esta complexidade, sabe-se a adequada caracterização de sistemas gelificados só é possível a partir da aplicação de diversas técnicas reológicas em conjunto, incluindo testes de pequena e grande deformação (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

Segundo a literatura, testes de pequena deformação incluem os ensaios oscilatórios, que fornecem informações importantes a respeito da natureza viscoelástica dos sistemas (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; RAO, 2014). A partir destes ensaios, que, por sua vez, englobam testes de varredura de frequência, varredura de temperatura e varredura de tempo, os valores dos módulos de armazenamento (G'), perda (G'') e tangente de delta ($\tan \delta$) podem ser determinados na região de viscoelasticidade linear das amostras, e podem ser utilizados para conclusões a respeito da força dos sistemas, das características das interações e ligações entre os grupos constituintes e, conseqüentemente para a classificação de géis (ex. géis fortes, com características de géis covalentes, géis fracos, etc) (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; RAO, 2014).

Além destes, outros testes amplamente aplicados para a caracterização de géis incluem os ensaios de fluência e recuperação, que consistem no monitoramento da deformação de amostras submetidas a uma tensão constante (que pode ou não estar na região viscoelástica linear do material) durante um período de tempo pré-estabelecido (etapa de fluência) e, em seguida, na remoção da tensão e avaliação da capacidade do sistema em recuperar sua forma ou estado de deformação original (etapa de recuperação) (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008). Os dados experimentais obtidos a partir de tais ensaios são amplamente avaliados em estudos encontrados na literatura por meio do seu ajuste matemático ao modelo de Burger, que consiste na associação em série de um elemento Maxwell e um elemento Kelvin-Voigt (CHANG ET AL., 2014; DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008; LORENZO et al., 2011; LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013). No entanto, o grande número de parâmetros reológicos, com significados físicos pouco claros, desse modelo, bem como a sua limitada capacidade de descrever, simultaneamente, dados de fluência e

recuperação, tornam a interpretação dos resultados muito complexa (SCHAFFTER; CORVALAN; CAMPANELLA, 2015).

Nesse contexto, uma alternativa interessante para analisar os resultados de ensaios de fluência e recuperação consiste na aplicação da abordagem da derivada fracionária, que apresenta um número menor de parâmetros, todos com significados físicos claros e também permitem o ajuste satisfatório de ambas as etapas do teste (SCHAFFTER; CORVALAN; CAMPANELLA, 2015; SPOTTI et al., 2016; TARHAN et al., 2016).

Outro ensaio amplamente aplicado para a caracterização de géis proteicos (CAVALLIERI; CUNHA, 2008), biopoliméricos mistos (BRAGA et al, 2006; VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011) e carregados (SALA et al., 2007; SALA et al., 2009a,b) consiste na compressão uniaxial das amostras para a avaliação da força necessária para a obtenção de determinada deformação, da deformação resultante de determinada força ou mesmo das propriedades (tensão e deformação) de ruptura dos sistemas (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005). Segundo Sala et al. (2009a, b), os testes de compressão uniaxial são fundamentais, uma vez que propriedades de grande deformação e ruptura de sistemas apresentam uma melhor correlação com o comportamento dos mesmos durante a mastigação ou processamento dos alimentos.

3 HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA

Dentro do exposto na Revisão Bibliográfica, pode-se observar que a incorporação de bioativos hidrofóbicos em alimentos é uma problemática relevante. O interesse na aplicação da curcumina é justificado pelas características físico-químicas e propriedades funcionais desse bioativo, que possui alto potencial de atividade antioxidante, além de apresentar uma cor interessante para a substituição de corantes artificiais, sabidamente alergênicos. Micropartículas lipídicas sólidas são uma alternativa interessante para a incorporação de curcumina nos alimentos, por serem dispersíveis em meio aquoso, e possibilitarem um aumento na bioacessibilidade do polifenol em questão, devido à sua natureza lipídica. Além disso, técnicas de microencapsulação podem eliminar o sabor picante, característico da curcumina, que pode ter um impacto sensorial indesejável em alguns produtos. Sabe-se que dispersões estáveis de partículas lipídicas sólidas podem ser também utilizadas para a produção de géis carregados com emulsões, que vêm sendo foco de diversas pesquisas por possibilitarem a obtenção de produtos com diferentes propriedades estruturais e sensoriais, a partir da aplicação combinada de diferentes agentes gelificantes e tensoativos. Embora géis

proteicos e géis biopoliméricos mistos produzidos com proteínas e polissacarídeos sejam amplamente explorados na literatura e aplicados na indústria de alimentos, pouco se sabe a respeito das características de sistemas produzidos com isolado proteico de soja comercial, na ausência e presença de polissacarídeos, tais como as gomas xantana e locusta. Além disso, a escolha do método de gelificação a frio, aplicado no presente trabalho, provém do fato de o processo ser menos agressivo às micropartículas lipídicas sólidas, que podem, dependendo de sua composição, ser sensíveis a tratamentos térmicos intensos, além de permitir a adição de outros compostos (por exemplo, agentes flavorizantes) para o desenvolvimento de futuros produtos alimentícios.

Nesse contexto, o presente projeto de Mestrado justificou-se pelos seguintes motivos:

- (i) Necessidade do desenvolvimento e do aperfeiçoamento contínuo de tecnologias de encapsulação de bioativos hidrofóbicos, como a curcumina, que permitam a sua aplicação em alimentos, protegendo-a da degradação ao longo do tempo de armazenagem e permitindo um bom aproveitamento das suas propriedades funcionais;
- (ii) Interesse no estudo da propriedade gelificante do isolado proteico de soja comercial, comumente aplicado na indústria de alimentos, uma vez que este ingrediente apresenta características nutricionais e propriedades funcionais interessantes, porém baixa solubilidade em meios ácidos e neutros;
- (iii) Necessidade do desenvolvimento de alternativas para o melhor aproveitamento das propriedades funcionais do isolado proteico de soja comercial, por meio da interação deste ingrediente com polissacarídeos, tais como a goma xantana e goma locusta, amplamente aplicadas na indústria de alimentos;
- (iv) Interesse no estudo do processo de gelificação a frio do IPS, na presença e ausência de polissacarídeos, que surge como uma alternativa interessante para a exploração da propriedade gelificante deste ingrediente, sem reduções da qualidade dos sistemas, geralmente ocasionadas pelo tratamento térmico excessivo;
- (v) Interesse no desenvolvimento de géis carregados com emulsões, produzidos com IPS, na presença e ausência de polissacarídeos, bem como na caracterização de tais protótipos de produtos, por meio da aplicação combinada de diferentes ferramentas analíticas, tais como ensaios reológicos e microscopias, para a compreensão das

propriedades da matriz e interações entre os diferentes componentes (IPS, polissacarídeos e partículas).

4 OBJETIVOS

A presente Dissertação teve como principal objetivo o desenvolvimento de géis produzidos com isolado proteico de soja comercial, na presença e ausência de polissacarídeos (goma xantana e goma locusta), carregados com micropartículas lipídicas sólidas estabilizadas com Tween 80 e Span 80, bem como o estudo da estabilidade da curcumina encapsulada nos diferentes sistemas (dispersão e géis carregados com diferentes formulações). Para alcançar tal objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

- (i) Caracterização do isolado proteico de soja (IPS) não tratado e submetido à diferentes condições de pH (7, 9 e 11) e pré-tratamento térmico (60 e 80 °C);
- (ii) Determinação das melhores condições operacionais para a produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) estáveis com estearina de palma como fase lipídica e a combinação de tween 80 e span 80 como tensoativos para a encapsulação de curcumina;
- (iii) Determinação das melhores condições operacionais para a produção de géis de IPS e géis mistos de IPS e diferentes polissacarídeos (goma xantana (GX) e goma locusta (GL)), obtidos a frio, com aspecto estruturado;
- (iv) Determinação das melhores condições operacionais para a produção a frio dos géis carregados com partículas lipídicas sólidas, com aspecto estruturado, com diferentes formulações;
- (v) Caracterização dos géis carregados e não-carregados para estudo comparativo das organizações estruturais e propriedades dos diferentes sistemas;
- (vi) Estudo da estabilidade da curcumina encapsulada nos diferentes sistemas: dispersões, géis carregados com MLS produzidos com IPS, géis carregados com MLS produzidos com IPS e GX e géis carregados com MLS produzidos com IPS e GL, ao longo do período de armazenamento;
- (vii) Estudo da estabilidade dos géis carregados, produzidos com diferentes formulações, ao longo do período de armazenamento.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para a produção dos géis proteicos foram: isolado proteico de soja (Protimarti M-90 - Marsul, Montenegro, RS, Brasil), cloreto de cálcio dihidratado (Kyma, Americana, SP, Brasil), goma xantana (Grindsted Xanthan 80®, doada pela Du Pont, Cotia, SP, Brasil) e goma locusta (Viscogum LBG®, doada pela Cargill, Campinas, SP, Brasil). Para a produção das micropartículas lipídicas sólidas foram utilizados: estearina de palma (doada pela Agropalma, Belém, PA, Brasil) como fase lipídica, polisorbato 80 (Tween 80, St. Louis, MO, EUA) como tensoativo hidrofílico, éster de monooleato de sorbitan (Span 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como tensoativo lipofílico e a curcumina (CAS 458-37-7, Merck, Darmstadt, Alemanha) como bioativo encapsulado. A Tabela 1 apresenta as informações sobre os valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), siglas e estruturas moleculares dos tensoativos utilizados. Para a quantificação de curcumina encapsulada durante o período de monitoramento das amostras foi utilizado solvente dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha). Em todas as etapas deste estudo, água deionizada ultrapurificada Direct Q3 (Millipore, Billerica, MA, EUA) foi utilizada. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Tabela 1 Valor de EHL e estrutura molecular dos tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas.

Tensoativo	EHL*	Sigla	Estrutura molecular*
Polisorbato 80 (Tween 80)	15,0	PS80	$(x + y + z = 20)$
Span 80	4,3	SP80

*Fonte: Davies, Graham e Vincent (1987).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Caracterização do isolado proteico de soja

5.2.1.1 Determinação da composição centesimal

Para a determinação da composição centesimal do isolado proteico de soja foram utilizados os métodos oficiais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Kjeldahl, por meio das etapas de digestão da proteína e a destilação do nitrogênio (AOAC, 1997), o conteúdo lipídico do isolado proteico de soja foi determinado pelo método de Bligh e Dyer (1959), e os teores de umidade e cinzas das amostras foram determinados por métodos gravimétricos, após secagem em estufa e mufla, respectivamente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

5.2.1.2 Determinação do ponto isoeletrico

Os pontos isoeletricos das amostras de IPS não tratado e tratado foram determinados por mobilidade eletroforética em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA), seguindo metodologia adaptada de Chen e Soucie (1986). Inicialmente foram preparadas dispersões com concentração de 1% (m/v) de IPS em água deionizada com diferentes valores de pH no intervalo entre 3 e 11. Posteriormente, as amostras foram diluídas em solução 1 mM de KCl e a mobilidade eletroforética foi calculada pelo equipamento utilizando a equação de Helmholtz–Smoluchowski (Equação 1), em que ζ é o potencial zeta (mV), EM é a mobilidade eletroforética ($\mu\text{m.s}^{-1}/\text{volt.cm}^{-1}$), η é a viscosidade do meio de dispersão e D é a constante dielétrica do meio (HENDRICKS, 2006). Os resultados obtidos representam a média das 10 corridas realizadas por amostra.

$$\zeta = \frac{4\pi.\eta.EM}{D} \quad (1)$$

5.2.1.3 Índice de solubilidade de nitrogênio

Para a determinação da solubilidade do isolado proteico de soja em diferentes condições de pH foi utilizado protocolo adaptado do método de Morr et al. (1985). Inicialmente foram preparadas soluções com concentração de 1% (m/v) de IPS em água deionizada, com pHs 3, 5, 7, 9 e 11, em triplicata.

Após o ajuste de pH, as amostras foram agitadas por uma hora em temperatura ambiente e centrifugadas a 20.000 g por 30 minutos à 5 °C (centrífuga Beckman, modelo J2-21, rotor

J2-21 102). Os sobrenadantes obtidos foram, então, filtrados em papel Whatman nº 1. E submetidos à análise de teor de proteína pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1997).

A porcentagem de proteína solúvel (PS) foi calculada por meio da Equação 2.

$$PS = \frac{A}{W.S} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

PS = teor de proteínas solúveis presentes no isolado proteico de soja em %;

A = teor de proteínas no sobrenadante (g/ml);

W = massa da amostra (g);

S = teor de proteínas na amostra (g/ml);

5.2.1.4 Determinação do comportamento térmico por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para a avaliação do comportamento térmico do IPS (10% m/v em água deionizada) submetido a diferentes condições de pH (não tratado, 7, 9 e 11), foram realizados ensaios de calorimetria diferencial de varredura (DSC). O intervalo de 0 a 110°C foi analisado, com rampa de aquecimento de 10° C/min, em equipamento TA5000 (TA Instruments, New Castle, DE, , EUA), utilizando-se cadinho de alumínio vazio como referência, sob atmosfera inerte (45 mL/min N₂) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

5.2.1.5 Determinação da hidrofobicidade superficial

A determinação da hidrofobicidade superficial das amostras de IPS foi realizada por meio do protocolo adaptado de Hayakawa e Nakai (1985). Foram analisadas amostras de IPS não tratado e de IPS submetido a diferentes tratamentos térmicos (60 e 80 °C por 30 minutos) e alterações de pH (7, 9 e 11).

Inicialmente as amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) até concentração de 2,5 mg/mL de IPS e agitadas magneticamente por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as dispersões foram centrifugadas a 4000 g por 15 minutos a 4°C (centrífuga Sorvall Legend MACH 1.6R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O sobrenadante foi, então, coletado e diluído 50 vezes em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), antes das medições.

A cada amostra de 3 mL, foram adicionadas alíquotas de 5 μ L de sonda fluorescente ácido 8-anilino naftaleno-sulfônico (ANS) (2mM), até a saturação da amostra. As medições foram realizadas em espectrofluorímetro (Perkin Elmer modelo LS55, Waltham, MA, EUA), no Laboratório de Biossensores e Sistemas Microeterogêneos do Departamento de Física e Química, FCFRP/ USP, utilizando-se comprimento de onda de excitação de 363 nm e comprimento de onda de emissão varrendo de 383 a 650 nm em abertura de fenda de 10 nm.

5.2.1.6 Fluorescência intrínseca do triptofano

As medidas de fluorescência intrínseca do triptofano das amostras de isolado proteico de soja foram realizadas utilizando-se espectrofluorímetro (Perkin Elmer modelo LS55, Waltham, MA, EUA) no Laboratório de Biossensores e Sistemas Microeterogêneos do Departamento de Física e Química, FCFRP/ USP, segundo protocolo descrito por Kalapathy, Hettiarachchy e Rhee (1997). Foram analisadas amostras de IPS não tratado e de IPS submetido à diferentes tratamentos térmicos (60 e 80 °C por 30 minutos) e alterações de pH (7, 9 e 11).

Inicialmente as amostras foram diluídas à concentração de 0,5 mg/mL de IPS em 0,01M de tampão fosfato pH 7,4, e em seguida, foram submetidas às análises em comprimento de onda de excitação de 363 nm e de emissão na faixa de 383-650 nm.

5.2.1.7 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular foi utilizada para a avaliação da estrutura secundária e determinação do grau de alteração das estruturas proteicas das amostras de IPS submetido a diferentes tratamentos térmicos (60 e 80 °C por 30 minutos) e alterações de pH (7, 9 e 11), seguindo protocolo adaptado de Hu et al. (2013). Para isso, amostras de IPS foram dispersas em tampão fosfato de sódio 0,01M, nos pHs desejados, à concentração de 0,4% (m/v), e aquecidas em banho-maria. Após o preparo das amostras, estas foram adequadamente diluídas e analisadas em espectropolarímetro Jasco J-1500 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão), em cubetas de quartzo de 0,2 cm, no laboratório Brown, localizado no Departamento de Química da Universidade de Purdue (West Lafayette, IN, EUA). As análises foram feitas no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm, à temperatura ambiente, utilizando-se velocidade de varredura, largura de banda e tempo de integração de, respectivamente, 20 nm/min, 1 nm e 4 s. Os resultados foram expressos em elipticidade residual média ($\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$), calculada por meio da Equação 3, e analisados em software Dicroprot (DELÉAGE; GEOURJON, 1993) pelo método *Self-consistent* (SELCON 3) (SREERAMA; WOODY, 1993).

$$\theta = \frac{M \cdot X}{10 \cdot L \cdot C} \quad (3)$$

onde X corresponde a elipticidade observada (deg), M é o peso residual médio (M=115, segundo Jiang et al. (2009), L é o caminho óptico (cm) e C é a concentração de proteínas (g/ml). Cada espectro final foi obtido a partir da média de 4 varreduras, após a subtração do espectro do tampão fosfato de sódio 0,01M (branco).

5.2.2 Encapsulação da curcumina em micropartículas lipídicas sólidas de estearina de palma estabilizadas com tween 80 e span 80

Para a produção das micropartículas lipídicas sólidas, a fase lipídica, composta pela estearina de palma (EP) e pelo span 80, foi submetida a 90 °C em banho-maria (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) por 30 min para a eliminação de efeitos do histórico térmico (LANGMAID, 2010). Em seguida, a fase aquosa, composta por água deionizada e tween 80, e a fase oleosa foram dispersas, ambas a 80 °C, usando-se alta intensidade de agitação (IKA T25, IKA, Staufen, Alemanha) a 18.000 rpm por 5 minutos, como ilustrado na Figura 9. Em todas as amostras a concentração de estearina de palma utilizada foi 4,5% (m/m) e a concentração total de tensoativo foi 4,5% (m/m). Para evitar contaminação microbológica, 0,02% (m/m) de benzoato de sódio foram adicionados às micropartículas lipídicas sólidas.

Figura 9 Esquema ilustrativo da produção das micropartículas lipídicas sólidas de estearina de palma.

Fonte: Própria autoria.

5.2.2.1 Determinação do valor do EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) para produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) de estearina de palma

Para a determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) da estearina de palma e otimização das condições de produção das micropartículas lipídicas sólidas, o método proposto por Zanin et al. (2002), baseado em Griffin (1949) foi utilizado. O EHL é um valor numérico utilizado para descrever a natureza do tensoativo, ou seja, o grau de hidrofobicidade ou hidrofilicidade do mesmo (ZANIN et al., 2002; GRIFFIN, 1949).

Para a determinação do EHL da estearina de palma, as formulações descritas na Tabela 2 foram testadas. O valor de EHL de cada formulação foi calculado calculada por meio da Equação 4 (GRIFFIN, 1949).

$$EHL_{form} = \frac{m_a.EHL_a + m_b.EHL_b}{m_a + m_b} \quad (4)$$

Onde:

EHL_{form} : valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico da formulação;

EHL_a : valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico do tensoativo “a”;

EHL_b : valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico do tensoativo “b”;

m_a : massa de “a” adicionada à formulação (g);

m_b : massa de “b” adicionada à formulação (g);

Nos dias posteriores à produção, as amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente e foram realizadas avaliações do aspecto visual das amostras e análises de determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e da distribuição de tamanho das partículas através de medidas de difração a laser (SHIMADZU SALD-201V). A partir dos resultados obtidos, assumiu-se que o valor do EHL da estearina de palma correspondeu ao EHL da formulação mais estável, e com menor valor de span, calculado a partir da Equação 5 (KARIMI; MOHAMMADIFAR, 2014).

$$span = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad (5)$$

Onde: $d(0,9)$, $d(0,5)$ e $d(0,1)$ são os valores de diâmetro abaixo dos quais, respectivamente, 90, 50 e 10% das partículas do sistema se encontram.

Tabela 2 Formulações testadas para determinação do EHL da estearina de palma e otimização das condições de produção das micropartículas lipídicas sólidas.

Formulação	Composição				EHL
	Estearina de palma (% m/m)	Tensoativo (% m/m)	Tween 80 (% do total de tensoativo)	Span 80 (% do total de tensoativo)	
EHL-1.1	4,5	4,5	30	70	7,51
EHL-1.2	4,5	4,5	40	60	8,58
EHL-1.3	4,5	4,5	50	50	9,65
EHL-1.4	4,5	4,5	60	40	10,72
EHL-1.5	4,5	4,5	70	30	11,79
EHL-1.6	4,5	4,5	80	20	12,86

Fonte: Própria autoria

5.2.2.2 Encapsulação da curcumina

Para a encapsulação da curcumina, a formulação EHL-1.2, descrita na Tabela 2, foi utilizada. As micropartículas lipídicas sólidas foram produzidas conforme descrito no item 5.2.2 e a curcumina foi adicionada na fase lipídica fundida após o processo de remoção da memória térmica. Diferentes concentrações de curcumina (0,03, 0,045 e 0,063% m/m) foram, inicialmente, encapsuladas para a determinação da concentração ideal para o estudo. Logo após a produção, as amostras com 0,03% (m/m) de curcumina foram submetidas a processo de centrifugação a 95 g por 5 min, a 25 °C (Hermle LaborTechnik GmbH, modelo Z 216 MK, Wehingen, Alemanha), para remoção do excesso de curcumina não encapsulado. Nos dias posteriores, tais amostras foram monitoradas quanto ao diâmetro médio e distribuição do tamanho das partículas (item 5.2.2.3), quantificação da curcumina encapsulada (item 5.2.2.4) e colorimetria instrumental (item 5.2.2.5). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.2.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula

Nos dias após a produção das MLS, as amostras foram monitoradas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio e à distribuição de tamanho das partículas através de medidas de difração a laser (SALD-201V, Shimadzu, Kyoto, Japão), no Laboratório de Processos em Engenharia no Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA – FZEA - USP).

5.2.2.4 Quantificação da curcumina encapsulada nas micropartículas lipídicas sólidas

Para a quantificação da curcumina encapsulada nas micropartículas lipídicas sólidas, as amostras foram diluídas 10 vezes em água deionizada e, em seguida, 1 mL desta diluição foi coletada e agitadas em vórtex com 9 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, as absorbâncias das amostras foram determinadas realizada a 430 nm em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Reino Unido) (POOL et al., 2013). A curva de calibração utilizada foi construída utilizando-se concentrações conhecidas curcumina, variando de 0,5 a 6,0 µg/mL, em solvente DMSO.

5.2.2.5 Colorimetria instrumental

Nos dias posteriores à produção, a cor das amostras foi monitorada por colorimetria instrumental empregando-se o sistema CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*). Os parâmetros L^* , a^* , b^* foram determinados em colorímetro (Miniscan XE Plus, Hunterlab, Reston, VA, EUA), no Laboratório de Processos em Engenharia ZEA-FZEA-USP, e a partir desses valores foram calculados os parâmetros croma (intensidade ou pureza da cor - C^*_{ab}), o ângulo de Hue (cor verdadeira - h°) e a diferença total de cor (DTC) por meio das Equações (6), (7) e (8), respectivamente.

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (6)$$

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (7)$$

$$DTC = \sqrt{(L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2} \quad (8)$$

Onde:

C^*_{ab} : croma (saturação da cor);

h° : ângulo de Hue (tonalidade definida em graus);

DTC: diferença total de cor;

b^* : cromaticidade no eixo variando do amarelo ao azul;

a^* : cromaticidade no eixo variando de vermelho ao verde;

L^* : luminosidade variando do preto ao branco;

L^*_0 , a^*_0 e b^*_0 : parâmetros obtidos no dia zero de estocagem;

L^* , a^* e b^* : parâmetros obtidos no dia de amostragem.

5.2.2.6 Microscopia de fluorescência

Para a determinação da distribuição do material encapsulado no interior do núcleo sólido, o corante vermelho do Nilo foi encapsulado nas partículas lipídicas produzidas com estearina de palma e formulação EHL-1.2, descrita na Tabela 2. Para isso, uma solução mãe de corante vermelho do Nilo (0,1g/100 mL de metanol) foi preparada e adicionada à fase lipídica (proporção de 10µL de solução mãe/g de lipídio) no processo de produção das micropartículas lipídicas sólidas, descrito no item 5.2.2. No dia seguinte à produção, as amostras foram submetidas à análise de microscopia de fluorescência em microscópio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC One Zeiss Drive Thornwood, NY, EUA) em magnitude de 40x com fonte de luz fluorescente HBO 100. A encapsulação do vermelho do Nilo foi realizada segundo protocolo adaptado de Abhyankar, Mulvihill e Auty (2014).

5.2.3 Produção dos géis carregados e não-carregados com micropartículas lipídicas sólidas, obtidos a frio

5.2.3.1 Determinação das melhores condições de produção dos géis de isolado proteico de soja

A produção a frio dos géis de IPS foi realizada em duas etapas, conforme esquematizado na Figura 10, segundo protocolo adaptado de Diniz (2007), utilizando-se as condições definidas na Tabela 3. Na primeira delas, a massa de IPS foi hidratada até concentração 25 % maior que a concentração final de desejada. Posteriormente, a amostra hidratada foi submetida à alteração de pH e aquecida em banho-maria (Marconi, Piracicaba/SP, Brasil) para a desnaturação parcial e, conseqüentemente, exposição dos aminoácidos reativos das moléculas de proteína. Já na segunda etapa, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e diluídas em solução concentrada de CaCl_2 , para a neutralização da repulsão eletrostática entre as moléculas, até as concentrações finais de proteína e sal desejadas. A hidratação do IPS e a adição das soluções de CaCl_2 foi feita sob agitação com espátula em temperatura ambiente, até a obtenção de uma amostra homogênea. Após a diluição em solução de CaCl_2 , as amostras tiveram o pH verificado e ajustado novamente, quando necessário. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em geladeira a 5 °C por aproximadamente 15 horas, antes de serem analisadas para a construção dos diagramas visuais e caracterizações preliminares. Como citado anteriormente, as formulações e condições testadas para a determinação das melhores condições de produção dos géis de IPS obtidos a frio, com aspecto estruturado, estão disponíveis na Tabela 3.

Figura 10 Esquema ilustrativo do processo de obtenção a frio dos géis de isolado proteico de soja.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 3 Variáveis testadas para a otimização das condições de produção dos géis de isolado proteico de soja obtidos a frio.

Variável	Condições testadas
pH	5, 6, 7, 9 e 11
Concentração de CaCl ₂ (mM)	0, 5, 10, 15 e 20
Temperatura (°C)	60 e 80
Tempo de aquecimento (minutos)	15 e 30
Concentração de proteína (% m/v)	5, 8, 10, 13 e 15

Fonte: Própria autoria

5.2.3.2 Determinação das melhores condições de produção dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e diferentes polissacarídeos (goma xantana e goma locusta)

Para a determinação das melhores condições de produção de géis de biopoliméricos mistos obtidos a frio, com aspecto estruturado, dois polissacarídeos foram testados: goma

xantana e goma locusta. Para isso, foram utilizados protocolos adaptados do item 5.2.3.1, esquematizados na Figura 11.

Para a produção dos géis de biopoliméricos mistos de IPS com goma locusta, a massa de polissacarídeo foi adicionada à massa de isolado proteico de soja, hidratada e submetida aos procedimentos descritos no item 5.2.3.1. Já para a produção dos géis de biopoliméricos mistos de IPS com goma xantana, soluções concentradas de polissacarídeo foram preparadas pela adição de água deionizada e agitação magnética por 2 horas, segundo metodologia adaptada de Chang et al. (2014). Paralelamente, as massas de IPS foram hidratadas até concentrações 25% maiores que as concentrações finais de proteína desejadas, submetidas à alteração de pH e aquecidas em banho-maria (MA 107, Marconi, Piracicaba/ SP, Brasil). Posteriormente, as soluções concentradas de goma xantana foram adicionadas às amostras de isolado proteico de soja resfriadas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram diluídas em solução concentrada de CaCl_2 , até as concentrações finais de proteína, polissacarídeo e sal desejadas. A hidratação do IPS, a adição das soluções de goma xantana e a adição das soluções de CaCl_2 foi feita sob agitação com espátula em temperatura ambiente, até a obtenção de uma amostra homogênea. Após a diluição em solução de CaCl_2 , as amostras tiveram o pH ajustado novamente e foram armazenadas em geladeira a 5 °C por aproximadamente 15 horas, antes de serem analisadas para a construção dos diagramas visuais e caracterizações preliminares (item 5.2.3.4). As formulações e condições testadas para a determinação das melhores condições de produção dos géis biopoliméricos mistos de IPS e polissacarídeos, obtidos a frio estão disponíveis nas Tabelas 4 e 5.

Figura 11 Esquema ilustrativo do processo de obtenção a frio dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e diferentes polissacarídeos.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 4 Variáveis testadas para a otimização das condições de produção a frio dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta.

Variável	Condições testadas
pH	7
Concentração de CaCl ₂ (mM)	0, 5 e 15
Temperatura (°C)	60 e 80
Tempo de aquecimento (minutos)	15 e 30
Concentração de proteína (% m/v)	5, 10 e 15
Concentração de goma locusta (% m/v)	0,1; 0,2 e 0,3

Fonte: Própria autoria

Tabela 5 Variáveis testadas para a otimização das condições de produção a frio dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana.

Variável	Condições testadas
pH	7
Concentração de CaCl ₂ (mM)	0, 5 e 15
Temperatura (°C)	60 e 80
Tempo de aquecimento (minutos)	15 e 30
Concentração de proteína (% m/v)	5, 10 e 15
Concentração de goma xantana (% m/v)	0,1; 0,2 e 0,3

Fonte: Própria autoria

5.2.3.3 Determinação das melhores condições de produção dos géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas

As formulações descritas na Tabela 6 foram selecionadas para a produção dos géis carregados com MLS, com aspecto estruturado. Para isso, diferentes proporções (25, 50, 75 e 100%, v/v) da água deionizada utilizada para hidratar o isolado proteico de soja na primeira etapa dos procedimentos, descritos nos itens 5.2.3.1 e 5.2.3.2, foram substituídas por dispersões de MLS com formulação EHL-1.2 (Tabela 2). Após a produção, as amostras foram submetidas a análises visuais e caracterizações preliminares, conforme descrito no item 5.2.3.4.

Tabela 6 Formulações utilizadas para a produção dos géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas.

Formulação	IPS (% m/v)	CaCl ₂ (mM)	GX (% m/v)	GL (% m/v)	pH	Pré-aquecimento
G1	15	10	0	0	7	80 °C/30min
G2	15	5	0,1	0	7	80 °C/30min
G3	15	15	0	0,2	7	80 °C/30min

Fonte: Própria autoria

5.2.3.4 Construção dos diagramas visuais e caracterizações preliminares

Após a produção dos géis não-carregados (itens 5.2.3.1 e 5.2.3.2) e carregados com MLS (item 5.2.3.3), com diferentes formulações, as amostras foram analisadas subjetivamente e classificadas como: amostra com separação de fases, dispersão pouco viscosa, dispersão viscosa, dispersão muito viscosa, gel não sustentável, gel sustentável fraco e gel sustentável forte, para a construção de diagramas visuais (PERRECHIL; SATO; CUNHA, 2011). Todos os sistemas classificados como géis sustentáveis fracos e fortes (aspectos mais estruturados) foram submetidos a caracterizações preliminares por meio de análises de perfil de textura, conforme descrito no item 5.2.4.1 e capacidade de retenção de água, conforme descrito no item 5.2.4.2, para a escolha das melhores condições de produção dos diferentes sistemas.

5.2.4 Caracterização dos géis carregados e não-carregados com micropartículas lipídicas sólidas

Além das análises de perfil de textura (item 5.2.4.1) e CRA (item 5.2.4.2), utilizadas para a escolha das melhores condições de produção dos sistemas (item 5.2.3), os géis com

formulações G1, G2 e G3 (Tabela 6), não-carregados e carregados com MLS (produzidos a partir da substituição de 75% do volume de água por dispersão de MLS), foram submetidos a análises de microscopia confocal de varredura a laser (item 5.2.4.3), microscopia eletrônica de varredura (item 5.2.4.4), testes de varredura de deformação e varredura de frequência (item 5.2.4.5), testes de fluência e recuperação (item 5.2.4.6) e testes de compressão uniaxial (item 5.2.4.7), para a adequada caracterização dos sistemas.

5.2.4.1 Perfil de textura (TPA)

Todas as amostras classificadas com géis sustentáveis, carregadas e não carregadas com MLS, foram submetidas à análise de perfil de textura (TPA), utilizando-se protocolo adaptado de Diniz (2007), em texturômetro (TA-XT.plus Texture Analyser, Godalming, Surrey, Reino Unido), com velocidade de pré-teste de 3 mm/s, velocidade no gel e no pós-teste de 1 mm/s, e compressão de 5 mm. Amostras foram preparadas em formato cilíndrico com 20 mm de altura e 20 mm de diâmetro e foram comprimidas por uma probe de alumínio (20 mm de diâmetro). Cada formulação foi analisada em 6 replicadas e os parâmetros dureza, elasticidade e coesividade foram calculadas a partir do software *Exponent* acoplado ao equipamento.

5.2.4.2 Capacidade de retenção de água

Todas as amostras classificadas com géis sustentáveis, carregadas e não carregadas com MLS, foram submetidas à análise de determinação umidade espremível e capacidade de retenção de água, segundo protocolo de Jauregui, Regenstein e Baker (1981) modificado por Beuschel et al. (1992). Para isso, as amostras de gel (1- 2 g) foram pesadas em papel Whatman nº 1, colocadas em tubo tipo falcon e centrifugadas a 2500 rpm por 10 min, a 6 °C (centrífuga Hermle LaborTechnik GmbH, modelo Z 216 MK, Wehingen, Alemanha). Posteriormente, o gel foi retirado do papel de filtro e a massa do papel úmido foi verificada. O percentual de umidade espremível e a capacidade de retenção de água (CRA) foram calculados segundo as Equações (9) e (10), respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata.

$$UE(\%) = \frac{m_{fu} - m_{fs}}{m_a} \cdot 100 \quad (9)$$

$$CRA(\%) = 100 - UE \quad (10)$$

Onde:

UE: umidade espremível;

m_{fu} : massa do filtro úmido (g);

m_{fs} : massa do filtro seco (g), antes da pesagem da amostra de IPS;

m_a : massa da amostra (1-2 g);

CRA: capacidade de retenção de água.

5.2.4.3 Análise por microscopia confocal de varredura a laser

Os géis com formulações G1, G2 e G3 (Tabela 6), carregados e não-carregados com MLS (formulação EHL-1.2, descrita na Tabela 2), foram avaliados por microscopia confocal a laser, de acordo com protocolo adaptado de Abhyankar, Mulvihill e Auty (2014). O IPS foi corado com Rodamina B, na concentração de 10 μ L de solução mãe (0,2%, m/v, em água deionizada) por ml de gel. O corante fluoresceína-5-isotiocianato (FTIC) foi utilizado para corar os polissacarídeos (goma xantana e goma locusta) na concentração de 0,05 ml de solução mãe (1 mg/ml em água deionizada) por ml de gel. Enquanto a fase oleosa da dispersão de MLS foi corada com vermelho do Nilo na concentração de 10 μ L de solução mãe (0,1g/100 mL de metanol) por grama de lipídio utilizado no processo de produção das micropartículas lipídicas sólidas. Os géis carregados foram produzidos com substituição de 75% do volume de água por dispersão de MLS. As análises foram realizadas em Microscópio Invertido LSM780-NLO Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, LLC One Zeiss Drive Thornwood, NY, EUA) no Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABiC), Instituto de Física “Gleb Wataghin”, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os comprimentos de onda de excitação e emissão do corante FTIC foram, respectivamente, 488 nm e 493-543nm, já os comprimentos de onda de excitação e emissão da Rodamina B e do vermelho do Nilo foram, respectivamente, 543 nm e 551-655 nm.

5.2.4.4 Análise por microscopia eletrônica de varredura

Os géis com formulações G1, G2 e G3 (Tabela 6), carregados e não-carregados com MLS (formulação EHL-1.2, descrita na Tabela 2), também foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV / cryo-SEM), de acordo com protocolo adaptado de Spotti et al. (2016). Os experimentos foram realizados em equipamento FEI Nova Nano630 SEM (Hillsboro, Oregon, EUA), localizado no Whistler Center Whistler Center for Carbohydrate Research, na Universidade de Purdue (West Lafayette, IN, EUA), utilizando uma tensão de aceleração de 5 kV e detector Everhart Thornley (ETD). O preparo das amostras foi realizado utilizando sistema Gatan Alto 2500 (Gatan UK, 25 Nuffield Way, Abingdon, Oxon, Reino

Unido) acoplado ao microscópico (Nova SEM). Inicialmente, pequenas quantidades de amostras foram acomodadas em suportes de alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e depois transferidas, sob vácuo, para a câmara de Gatan. Nesta câmara, as amostras foram adequadamente fraturadas a -185 °C e transferidas para dentro do microscópio a -90 °C para processo de sublimação. Após a sublimação da superfície, as amostras foram revestidas por pulverização com platina durante 120 segundos a 15 m/Amps e, posteriormente, as imagens foram então analisadas utilizando uma distância de trabalho de 5-6 mm.

5.2.4.5 Ensaios de varredura de deformação e varredura da frequência

Os testes oscilatórios de pequena amplitude (*small amplitude oscillatory shear* - SAOS) foram realizados, de acordo com protocolo adaptado de Chang et al. (2014), em reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA) com geometria de placas paralelas, 60 mm de diâmetro e 1 mm de gap. Os géis foram adicionados ao reômetro e óleo de silicone foi aplicado ao redor das amostras para evitar perdas de umidade durante os experimentos. Para a adequada acomodação dos géis no reômetro e relaxação de quaisquer tensões, foi fixado um intervalo de 2 minutos entre a adição das amostras e o início de cada experimento.

Os ensaios de varredura de deformação foram realizados a 10 °C, a uma frequência constante de 1 Hz, com a taxa de deformação variando de 0,01 a 100 %, para a determinação da região de viscoelasticidade linear (RVL). Após esses testes, os ensaios de varredura da frequência foram realizados a 10 °C, a uma deformação constante de 2 %, com frequência variando de 0,1 a 10 rad/s (0,016 a 1,6 Hz). Os resultados de G' e G'' em função da frequência angular foram expressos por meio das equações (11) e (12), do tipo Lei da Potência (CHANG et al., 2014; ÖZKAN; XIN; CHEN, 2002).

$$G' = K' \cdot \omega^{n'} \quad (11)$$

$$G'' = K'' \cdot \omega^{n''} \quad (12)$$

Onde:

- K' e K'' são constantes de Lei da Potência, utilizados para a obtenção de informações a respeito da força dos géis (dimensão de G' e G'');
- n' e n'' são expoentes de frequência, utilizados para o dimensionamento da dependência dos parâmetros G' e G'' com a frequência e, conseqüentemente, para a compreensão das respostas viscosas e elásticas dos sistemas;

- ω é a frequência angular.

Os ensaios descritos foram realizados em triplicata para cada formulação e os dados foram tratados no programa *Rheology Advantage Data Analysis*.

5.2.4.6 Ensaios de fluência e recuperação

Testes de fluência e recuperação foram realizados em reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA) com geometria de placas paralelas de 60 mm de diâmetro, utilizando-se 1 mm de gap, a 10 °C. Para a adequada acomodação das amostras no reômetro e relaxação de quaisquer tensões, foi fixado um intervalo de 10 minutos entre a adição das amostras e o início dos experimentos. Para a realização deste ensaio, uma tensão constante de 5 Pa foi aplicada durante 15 minutos e, após a remoção de tal tensão, a análise da recuperação das amostras foi realizada por mais 15 minutos. A tensão aplicada foi definida a partir da análise da região de viscoelasticidade linear (RVL) das amostras. Os intervalos de tempo de pré-teste, fluência e recuperação foram determinados a partir de análises preliminares, com base na literatura (PEREIRA et al., 2001; TARHAN et al., 2016). Para a análise dos resultados, os dados experimentais foram ajustados utilizando-se dois modelos diferentes: modelo matemático de Burger e a abordagem da derivada fracionária.

5.2.4.6.1 Modelagem matemática: Modelo de Burger

Os resultados experimentais dos ensaios de fluência e recuperação foram ajustados ao modelo de Burger, que consiste de uma associação em série dos modelos generalizados de Maxwell e Kelvin. O modelo completo, de acordo com o princípio de superposição de Boltzmann, é representado pela Equação 13 (MITCHELL, 1976; STEFFE, 1996).

$$J(t) = \begin{cases} J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\eta_0}, & t \leq t_1 \\ J_1 \left(\exp\left(\frac{t_1-t}{\lambda_{ret}}\right) - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t_1}{\eta_0}, & t > t_1 \end{cases} \quad (13)$$

Na Equação 13, J_0 (Pa⁻¹) é a compliança instantânea, η_0 (Pa.s) é a viscosidade do amortecedor do modelo de Maxwell, J_1 (Pa⁻¹) é a compliança associada ao elemento de Kelvin-Voigt, λ_{ret} (s) é o tempo de retardamento associado ao elemento de Kelvin-Voigt, e t_1 é o tempo em que a tensão é removida. Para a obtenção de uma caracterização mais completa, a

contribuição de cada elemento do modelo de Burger no valor máximo de compliança foi calculada por meio da Equação 14 (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008).

$$J_{elemento}(\%) = 100 \left(\frac{J_{elemento}}{J_{max}} \right) \quad (14)$$

Na Equação 14, $J_{elemento}$ é o valor de compliança J_0 , J_1 ou J_∞ e J_{max} é o valor de compliança máximo de cada sistema.

5.2.4.6.2 Modelagem matemática: abordagem da derivada fracionária

Os resultados experimentais dos ensaios de fluência e recuperação foram analisados utilizando-se a abordagem da derivada fracionária, representada pela Equação 15 (TARHAN et al., 2016).

$$J(t) = \frac{\varepsilon(t)}{\sigma_0} = \frac{1}{\Gamma(\alpha+1)} (\lambda_1 t^\alpha H(t) - \lambda_2 (t - t_m)^\alpha H(t - t_m)) \quad (15)$$

Na Equação 15, $J(t)(\%/Pa)$ é a compliança, $\varepsilon(t)(\%)$ é a deformação instantânea, $\sigma_0(Pa)$ é a tensão aplicada, t_m é o tempo experimental em que a tensão é removida e a análise de recuperação é iniciada, Γ é a função gama, definida por Abramowitz e Stegun (1964), e $H(t)$ é a função degrau definida pela Equação 16.

$$H(t) = \begin{cases} 0 & \text{se } t < 0 \\ 1 & \text{se } t > 0 \end{cases} \quad (16)$$

Na Equação (15), α , λ_1 e λ_2 são parâmetros que indicam, respectivamente, o grau de elasticidade, o inverso do módulo de elasticidade na análise de fluência e o inverso do módulo de elasticidade na análise de recuperação das amostras. Esses parâmetros reológicos foram determinados a partir do ajuste dos dados experimentais no modelo descrito (TARHAN et al., 2016).

5.2.4.7 Análise de compressão uniaxial

Análises de compressão uniaxial foram realizadas em texturômetro (TA-XT.plus Texture Analyser, Godalming, Surrey, Reino Unido de acordo com protocolo adaptado de Oliver, Scholten e van Aken (2015). As amostras foram preparadas em formato cilíndrico

com 30 mm de altura e 20 mm de diâmetro e comprimidas em 80% da altura inicial por uma probe de alumínio, lubrificada com óleo de silicone para evitar atritos. Para as análises dos géis não-carregados, a velocidade de compressão utilizada foi de 1 mm/s, enquanto para as análises dos géis carregados duas velocidades foram testadas: 0,5 mm/s e 1 mm/s. Cada formulação foi avaliada em 5 replicatas e os valores de tensão de Hencky (σ_H) e deformação de Hencky (ε_H) foram obtidos a partir dos dados de força-deformação de acordo com as equações (17) e (18), respectivamente:

$$\sigma_H = F(t) \cdot \frac{H(t)}{H_0 \cdot A_0} \quad (17)$$

$$\varepsilon_H = \ln \frac{H(t)}{H_0} \quad (18)$$

onde $F(t)$ é a força no tempo t , A_0 é a área inicial, H_0 é a altura inicial e $H(t)$ é a altura no tempo t . Os valores de módulo de Young (E_g) dos sistemas foram determinados a partir do coeficiente angular da região linear inicial das curvas de tensão de Hencky (σ_H) *versus* deformação de Hencky (ε_H), enquanto as propriedades de ruptura foram obtidas a partir do ponto máximo das mesmas.

5.2.5 Avaliação da estabilidade da curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas sólidas incorporadas em géis carregados

Para a avaliação da estabilidade da curcumina encapsulada em micropartículas lipídicas sólidas incorporadas em géis carregados, sistemas com formulações G1, G2 e G3 (Tabela 6), produzidos por meio da substituição de 75% do volume de água por dispersão de MLS (contendo bioativo na concentração 0.03 %, m/m), foram monitorados utilizando-se técnica de colorimetria instrumental, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 5.2.2.5. Géis não-carregados contendo curcumina não-encapsulada (curcumina livre) incorporada também foram analisados, para a compreensão da importância da encapsulação do bioativo.

Para a interpretação mais clara dos resultados de estabilidade da curcumina, a estabilidade dos géis carregados também foi monitorada a partir de análises de perfil de textura (item 5.2.4.1) e capacidade de retenção de água (item 5.2.4.2), em diferentes dias do período de armazenamento dos géis.

5.2.6 Análises Estatísticas

Todos os resultados experimentais foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de 95% de significância, com software *SAS* 9.3 (Statistical Analysis System, Cary, NC, EUA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE SOJA

6.1.1 Composição centesimal

O isolado proteico de soja é muito interessante para a indústria de alimentos, graças às suas características nutricionais e diversas propriedades funcionais (FERRARI; DEMIATTI, 2001; FUKUSHIMA, 1994; FUKUSHIMA, 2004; KINSELLA, 1979; KITAMURA, 2010; NISHINARI, 1988; NISHINARI et al. 2014; SGARBIERI, 1996). Tais propriedades estão relacionadas, principalmente, ao elevado conteúdo proteico desse ingrediente, que, segundo a legislação brasileira, deve ser superior a 88 %, em base seca (BRASIL, 2005). Sabe-se, porém, que a capacidade de extração das proteínas da soja e a composição do IPS são influenciados por diversos fatores, tais como a variedade da soja, as condições do cultivo, as características da farinha desengordurada utilizada, os eventos térmicos anteriores e as condições de obtenção da matéria-prima (DINIZ, 2007; KINSELLA, 1979; PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994).

Nesse contexto, visando uma aplicação satisfatória e uma maior compreensão das propriedades do ingrediente, a composição centesimal do IPS utilizado no presente trabalho foi determinada, e os resultados estão disponíveis na Tabela 7. Dentre os valores obtidos, destaca-se o teor proteico dessa matéria-prima comercial (84,3 %), que embora seja elevado, é inferior ao conteúdo informado pelo fornecedor (Anexo A), ao estabelecido pela legislação nacional (BRASIL, 2005), e também aos teores encontrados na literatura, geralmente superiores a 90 % (SGARBIERI, 1996).

Os teores de umidade (3,68 %), lipídios (1,64 %) e cinzas (3,18 %) também são diferentes dos valores encontrados na literatura. Schmiele et al. (2015), por exemplo, utilizaram IPS com teores de umidade, lipídios e cinzas de, 6,15 %, 0,5 % e 4,45 %, respectivamente, enquanto Schmiele et al. (2011) utilizaram um ingrediente com 5,46 %, 1,01 % e 3,3 %, respectivamente. Apesar disso, os valores de umidade e lipídios estão de acordo

com a ficha de especificação enviada pelo fornecedor que indica valores inferiores a 8 % e 2 %, respectivamente.

Embora a composição centesimal e o conteúdo proteico sejam aspectos importantes para a determinação das propriedades funcionais do IPS, fatores como a estrutura, grau de dissociação, desnaturação ou agregação das proteínas da soja são fundamentais para a compreensão do comportamento desse ingrediente em sistemas alimentícios (PUPPO; SORAGENTINI; AÑÓN, 2003). Por esse motivo, análises de caracterização mais específicas do IPS foram realizadas.

Tabela 7 Composição centesimal do isolado proteico de soja utilizado neste trabalho de Mestrado, em base seca

Constituinte	Porcentagem mássica (%)
Umidade	3,68
Proteína	84,3
Lipídios	1,64
Cinzas	3,18
Fibras	0,56
Extrato não nitrogenado	6,62

Fonte: Própria autoria

6.1.2 Determinação do ponto isoeletrico

As forças envolvidas na estabilização das estruturas proteicas são geralmente classificadas em duas categorias: as interações intramoleculares, que resultam de forças intrínsecas à molécula, e as interações intermoleculares, afetadas pelo solvente circulante (DAMODARAN, 2010; SGARBIERI, 1996). Dentre as forças intermoleculares estão as interações eletrostáticas, cuja intensidade e efeito dependem da carga líquida da proteína em pH neutro, ou seja, do número de resíduos de aminoácidos carregados negativamente e positivamente na estrutura da mesma (DAMODARAN, 2010; SALGIN; SALGIN; BAHADIR, 2012; SGARBIERI, 1996).

Para a compreensão da estrutura, estabilidade e funcionalidade de proteínas, são necessárias, portanto, informações a respeito da distribuição de cargas das moléculas, as quais podem ser obtidas a partir da determinação do pH isoeletrico das mesmas, ou seja, do valor de pH no qual a carga líquida da macromolécula é zero (DAMODARAN, 2010; SGARBIERI, 1996).

Essa informação é obtida a partir da avaliação dos valores de potencial zeta de dispersões proteicas em diferentes pHs, que, segundo Malhotra e Coupland (2004), podem ser determinados a partir da aplicação de uma tensão elétrica no meio e do monitoramento do movimento induzido das estruturas de interesse. O conceito de potencial zeta pode ser compreendido considerando-se uma partícula carregada negativamente, como ilustrado na Figura 12. O acúmulo de cargas na superfície das estruturas (nesse exemplo, negativas) “perturba” a distribuição iônica do solvente circulante, formando uma dupla camada elétrica constituída de uma camada de cargas opostas firmemente ligadas e acumuladas na superfície (camada de Stern) e uma camada difusa, que se estende por uma distância considerável nos meios aquosos (HUNTER, 1988; MALHOTRA; COUPLAND, 2004). Devido a essa organização, quando a partícula se move, uma ou mais camadas de íons hidratados movem-se com a estrutura de interesse, determinando o plano conhecido como plano ou camada de deslizamento, a uma curta e indefinida distância na camada difusa. Embora o potencial zeta seja muitas vezes referido como o potencial de superfície (SALGIN; SALGIN; BAHADIR, 2012), ele é medido nesta camada de deslizamento (MALHOTRA; COUPLAND, 2004).

Nesse contexto, para a determinação dos valores de pI de amostras de IPS, não tratadas e submetidas a diferentes tratamentos térmicos, os valores de potencial zeta das dispersões em diferentes pHs foram determinados, e os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 13.

A partir de tais resultados, verificou-se que o IPS não tratado apresentou um pI próximo a 4, semelhante aos resultados encontrados na literatura (JIANG; CHEN; XIONG, 2009; LIU, 1997; SGARBIERI, 1996). Por outro lado, as amostras de IPS submetidas a diferentes tratamentos térmicos apresentaram valores de pI entre 3,5 e 4. Tais diferenças podem ser justificadas pelo efeito do tratamento térmico na estrutura do IPS, que provavelmente resultou em uma alteração na distribuição de cargas das moléculas.

Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que a primeira etapa do processo de gelificação a frio consiste no aquecimento da dispersão proteica em condições de baixa força iônica e em pH diferente do ponto isoelétrico da proteína (ALTING, 2003; BRYANT; MCCLEMENTS, 2000). Tal exigência é explicada pela possibilidade de agregação das proteínas no ponto isoeletrico, devido à estrutura mais hidrofóbica, mais compacta e menos estável das mesmas, que resulta da ausência de forças repulsivas entre as moléculas (SALGIN; SALGIN; BAHADIR, 2012). Além disso, esses dados são necessários para a compreensão dos tipos de interações predominantes nos sistemas

(proteína-proteína ou proteína-solvente) e, conseqüentemente, da estrutura final dos géis (BERTRAND; TURGEON, 2007; MCGUFFEY; FOEGEDING, 2001).

Figura 12 Modelo esquemático para a compreensão do conceito de potencial zeta.

Fonte: Adaptado de MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer Nano Series User Manual**.

United Kingdom, 2013. Disponível em: <

http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf>. Acesso em: 31 março 2017.

Figura 13 Comportamento do potencial zeta das dispersões de isolado proteico de soja não tratado e após diferentes tratamentos térmicos em diferentes condições de pH.

Fonte: Própria autoria.

6.1.3 Análise de solubilidade proteica

As proteínas presentes no isolado proteico de soja apresentam diversas propriedades funcionais interessantes, geralmente afetadas pela solubilidade proteica. Tal solubilidade é influenciada por interações hidrofóbicas, que promovem interações proteína-proteína, e interações iônicas, que alteram a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína e entre as camadas de hidratação que envolvem os grupos iônicos (DAMODARAN, 2010; SGARBIERI, 1996).

Nesse contexto, um dos fatores que afeta a solubilidade proteica é o pH do meio. Em valores abaixo e acima do pH isoelétrico, as moléculas de proteína apresentam cargas líquidas, positivas ou negativas, que promovem a repulsão eletrostática e permitem a hidratação dos grupos carregados. Por esse motivo, quando a solubilidade das proteínas é analisada e plotada em função do pH, a curva obtida geralmente apresenta forma de U (DAMODARAN, 2010; PILOSOF, 2000).

Este comportamento foi verificado a partir da análise da solubilidade proteica do IPS comercial utilizado no presente trabalho, em diferentes valores de pH, como apresentado na Figura 14. Os valores de solubilidade proteica obtidos entre os pHs 3 (aproximadamente 14,8% m/v) e 5 (aproximadamente 7,7% m/v) foram muito baixos e aumentaram com o aumento do pH, chegando a 100% (m/v) em pH 11.

Tais resultados confirmaram a baixa solubilidade proteica em valores próximos ao pI (i.e., entre os pHs 3,5 e 4), conforme discutido na literatura (NISHINARI et al., 2014; SGARBIERI, 1996), porém mostraram que o IPS comercial utilizados no presente trabalho apresenta menor solubilidade em pHs 3 e 7 que os ingredientes analisados por outros autores (JIANG; CHEN; XIONG, 2009; RENKEMA; GRUPPEN; VAN VLIET, 2002).

Tal comparação dos resultados obtidos com valores encontrados na literatura é desafiadora, uma vez que a maioria das pesquisas envolve a utilização de ingredientes obtidos em laboratório, sob condições controladas (LEEA; RYUB; RHEEA, 2003). Como citado anteriormente, no processo de obtenção comercial, o IPS pode sofrer modificações físico-químicas, desnaturação e agregação proteica, que afetam, por exemplo, a solubilidade do ingrediente final (GARCIA et al., 1998; HERMANSSON, 1986). Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho são relevantes para a compreensão das reais limitações, e dos desafios enfrentados pela indústria de alimentos, para a aplicação e o adequado aproveitamento das propriedades funcionais do IPS.

Figura 14 Resultados da análise de solubilidade proteica do isolado proteico de soja gelificante em diferentes condições de pH. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

6.1.4 Determinação do comportamento térmico do IPS por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (*Differential scanning calorimetry* – DSC) é amplamente utilizada para a caracterização de propriedades térmicas das proteínas, dentre elas a temperatura de desnaturação. Sabe-se que a desnaturação envolve alterações nas estruturas proteicas e pode ser verificada em resultados de DSC na forma de picos endotérmicos (GUERRERO et al., 2012).

Os resultados obtidos a partir da análise de calorimetria diferencial de varredura das amostras de IPS, submetidas a diferentes condições de pH, estão disponíveis na Figura 15. Tais resultados mostraram que o IPS utilizado no presente trabalho foi comercializado na forma desnaturada, uma vez que não foram verificados picos endotérmicos a partir do ingrediente não tratado (pH 6,3), indicando que o processo de obtenção ocasionou a desnaturação das proteínas da soja (GARCIA et al., 1998; HERMANSSON, 1986).

A partir dos resultados do IPS submetido a pH 11 foi possível verificar um pico exotérmico na temperatura de 77,18 °C, o que pode ser explicado pela possível formação de agregados, que pode ocorrer quando as proteínas da soja são submetidas a valores muito elevados de pH (JIANG; CHEN; XIONG, 2009).

Figura 15 Resultados obtidos a partir da análise de calorimetria diferencial de varredura do IPS submetido a diferentes condições de pH.

Fonte: Própria autoria.

6.1.5 Hidrofobicidade superficial

A hidrofobicidade superficial de uma proteína é uma característica que depende de diversos fatores relacionados à molécula, como o tamanho, o formato, a composição e sequência de aminoácidos e as interações intramoleculares e intermoleculares (AIDER; DJENANE; OUNIS, 2012; WANG et al., 2014). Por tanto, informações a respeito da hidrofobicidade superficial possibilitam a compreensão de algumas características estruturais, da distribuição de cargas na superfície das moléculas e, consequentemente, das suas propriedades funcionais (HAYAKAWA; NAKAI, 1985; LALIGANT et al., 1991; WANG et al., 2014).

Para a determinação da hidrofobicidade superficial, geralmente são aplicados métodos que utilizam sondas que fluorescem quando se unem aos resíduos hidrofóbicos. Uma das sondas utilizadas é a sonda ANS (ácido 8-anilino naftaleno-sulfônico), que possui um anel aromático em sua estrutura química e pode unir-se às zonas hidrofóbicas com resíduos aromáticos (DINIZ, 2007; HAYAKAWA; NAKAI, 1985; KATO; NAKAI, 1980). Tal sonda foi utilizada no presente estudo, e os resultados obtidos estão disponíveis nas Figuras 16 e 17.

A partir da análise dos resultados do IPS não tratado (Figura 16) e das amostras de IPS tratado (Figura 17), foi possível observar que as alterações de pH e os tratamentos térmicos

levaram a um aumento da hidrofobicidade superficial das moléculas. Tal aumento pode ser justificado pela exposição de grupos hidrofóbicos, acarretada pela desnaturação proteica (PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994; WANG et al. 2014).

Comparando-se os resultados das amostras tratadas em pH 7 (Figura 17 - A e B) e pH 9 (Figura 17 - C e D), verificou-se que o aumento da alcalinidade e da temperatura acarretaram em aumento da hidrofobicidade superficial. Porém, em pH 11 as amostras tratadas a 60 °C (Figura 17 – E) apresentaram uma redução desse parâmetro, se comparadas às amostras em pH 9. Tal redução pode ter sido acarretada pela agregação das proteínas (indicado anteriormente pelos resultados de DSC) após o processo de desnaturação parcial ou total das mesmas (LALIGANT et al., 1991; PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994).

As conclusões obtidas a partir dessa análise evidenciaram a necessidade de testes adicionais para a caracterização do IPS, tais como as análises de fluorescência intrínseca do triptofano e dicroísmo circular.

Figura 16 Resultados da análise de hidrofobicidade superficial das amostras de IPS não tratado.

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 Resultados da análise de hidrofobicidade superficial das amostras de IPS submetidas a diferentes condições de pH e tratamento térmico.

Fonte: Própria autoria.

6.1.6 Fluorescência intrínseca do triptofano

Uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas para o estudo de mudanças estruturais das proteínas é a fluorescência. Nessa técnica, fluoróforos são excitados por alguns nanosegundos e então emitem fótons de baixa energia. Dessa forma, a intensidade de

fluorescência da amostra é determinada pelas eficiências de absorção e de emissão dos fótons a partir dos fluoróforos excitados (JOHNSON, 2005).

A fluorescência intrínseca das proteínas é resultado da presença de três resíduos de aminoácidos aromáticos: a fenilalanina (Phe), a tirosina (Tyr) e o triptofano (Trp). Dentre eles, o triptofano apresenta maior absorbância no comprimento de onda de excitação e maior rendimento quântico de emissão, devido ao seu núcleo indol, representando aproximadamente 90% da fluorescência total em proteínas que apresentam os três resíduos de aminoácidos citados (LAKOWICZ, 1983).

Além disso, ao contrário da fenilalanina e da tirosina, o triptofano apresenta elevada sensibilidade às características do microambiente e, dessa forma, desvios no comprimento de onda e alterações na intensidade de fluorescência podem ser utilizadas para a compreensão de alterações conformacionais das proteínas, como, por exemplo, a desnaturação (NAKAI; LI-CHAN; ARTEAGA, 1996). Nesse contexto, pode-se afirmar que a emissão de fluorescência em proteínas é resultado da exposição média dos seus resíduos de triptofano à fase aquosa em que se encontram dispersas (LAKOWICZ, 1983; RIGOS, 2007).

A Figura 18 apresenta os espectros de fluorescência do IPS não tratado e das amostras de IPS submetidas a diferentes condições de pH e tratamentos térmicos. Para a compreensão do grau de alteração das estruturas proteicas, os espectros das amostras tratadas foram comparados ao espectro do IPS não tratado.

Os resultados obtidos a partir da análise das amostras de pH 7 mostraram que, nessas condições, o tratamento térmico de 60 °C por 30 minutos não foi suficiente para alterar o grau de exposição do Trp, visto que o espectro apresentado é muito semelhante ao espectro do IPS não tratado, não havendo alterações de intensidade de fluorescência, nem deslocamento do pico. Por outro lado, com o tratamento térmico de 80 °C por 30 minutos, em pH 7, foi observado um aumento na intensidade de fluorescência, sem deslocamento do pico, o que sugere a ocorrência de alterações estruturais das proteínas. Em alguns casos, as proteínas desnaturadas podem não apresentar deslocamentos para o vermelho no comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência, devido à formação de agregados que reduzem ou impedem a exposição do Trp ao ambiente mais polar (DINIZ, 2007; MARANGONI et al., 2000).

Resultado muito semelhante ao da amostra de pH 7, submetida a 80 °C, foi observado a partir da análise da amostra em pH 9, submetida a 60 °C por 30 minutos. Já a amostra tratada a 80 °C por 30 minutos, em pH 9, apresentou, não só um aumento na intensidade de fluorescência, como também um pequeno deslocamento do comprimento de onda de máxima

emissão de fluorescência para o vermelho (*red-shift*), indicando que, nessas condições, a proteína sofreu um processo de desnaturação (YANG et al, 2001).

Um comportamento distinto foi observado nos espectros obtidos a partir da análise das amostras em pH 11. Nessas condições foram verificados deslocamentos para o vermelho e redução na intensidade de fluorescência, o que pode ser explicado por fenômenos como a agregação da proteína, formação de complexos, transferência de energia de fluorescência, dentre outros processos que fazem com que o Trp ocupe uma posição de menor exposição, se comparado à estrutura nativa (DINIZ, 2007; MARANGONI et al., 2000).

Tais resultados são condizentes com os resultados das análises de hidrofobicidade superficial, e confirmam a conclusão obtida a partir da verificação do pico exotérmico das amostras em pH 11 (Figura 15), discutida no item 6.1.4. Por outro lado, eles não permitem maiores conclusões a respeito da estrutura secundária das proteínas, evidenciando a importância do desenvolvimento de análises de dicroísmo circular nas amostras de IPS.

Figura 18 Espectro de fluorescência do isolado proteico de soja.

6.1.7 Dicroísmo circular

Dicroísmo circular (DC), definido como a absorção desigual da luz circularmente polarizada direita e esquerda (ou no sentido horário e no sentido anti-horário), é considerado um método interessante para a avaliação da estrutura secundária das proteínas (GREENFIELD, 2006). Uma vez que as atividades rotatórias ópticas de diferentes estruturas são conhecidas, análises de dicroísmo circular são comumente aplicadas para a investigação

de mudanças conformacionais em dispersões proteicas, devido às alterações de temperatura, ação de outros agentes desnaturantes, interações de ligação, dentre outros (GREENFIELD, 2006; KIM et al., 2004).

As principais estruturas e organizações identificadas através da análise de DC de proteínas globulares são α -hélices, folhas- β (β -sheets), voltas- β (β -turns) e conformações não ordenadas (ou seja, resíduos que não são atribuídos a uma estrutura secundária bem definida) (SREERAMA; WOODY, 1994). Alguns autores também discutem a presença de resíduos que apresentam pequenos segmentos de hélice poli (Pro) II (hélice poli-L-prolina II ou PP2), que é uma hélice estendida com três resíduos por volta, com uma coluna C=O e grupos N-H projetados para fora da estrutura (WOODY, 1992; SREERAMA; WOODY, 1994). O espectro de DC de α -hélices apresenta bandas negativas a 222 nm e 208 nm e uma banda positiva a 193 nm, enquanto o espectro de folhas- β apresenta bandas negativas a 218 nm e as bandas positivas a 195 nm. Proteínas desordenadas têm elipticidade muito baixa acima de 210 nm e bandas negativas perto de 195 nm (GREENFIELD, 2006). Já os espectros de CD correspondentes à fração de hélice poli (Pro) II tem uma forte banda negativa a 195 nm e uma banda positiva fraca a 215 nm (SREERAMA; WOODY, 1994).

Os espectros de DC do IPS não tratado e do IPS submetido a diferentes condições de pH e tratamentos térmicos estão mostrados na Figura 19. Esses resultados mostraram que o IPS foi susceptível a modificações estruturais, devido às alterações de pH e aumento de temperatura.

Figura 19 Efeito da alteração de pH e diferentes tratamentos térmicos no espectro de dicroísmo circular do IPS

Fonte: Própria autoria

Verificou-se que os espectros de DC de amostras com valores de pH de 7 e 9 apresentaram bandas com menor intensidade negativa em comparação com as amostras não tratadas, enquanto que, as amostras de pH 11 apresentaram maior intensidade negativa. Os resultados também mostraram que as amostras tratadas a 60 °C durante 30 minutos em pH 11 apresentaram um espectro de DC atípico na região de 236-260 nm, provavelmente devido à formação de agregados, que podem ter causado o espalhamento da luz polarizada (KIM et al., 2004), como também verificado e discutido nos itens 6.1.5 e 6.1.6. Todas as amostras exibiram um ombro negativo em 217-218 nm, o que, de acordo com Kim et al. (2004) indica a presença de estrutura folhas- β .

As proporções das diferentes estruturas encontradas em cada sistema, obtidas a partir da análise dos espectros de DC estão disponíveis na Tabela 8. Esses resultados indicaram que as amostras submetidas a pH 7 e 9 apresentaram menores proporções de α -hélice e maiores proporções de folhas- β que o IPS não tratado. Em comparação aos sistemas submetidos a 60 °C, as amostras tratadas a 80 °C durante 30 minutos apresentaram maiores proporções de estruturas não ordenadas em pH 7, e maiores proporções de folhas- β em pH 9. Por outro lado, as amostras tratadas a pH 11 apresentaram maiores proporções de α -hélice e folhas- β , e menores proporções de β -turn, PP2 e conformações não ordenadas, que a amostra de IPS não tratado. Resultados semelhantes de dicroísmo circular e DSC foram obtidos por Kim et al (2004), através de análises de amostras do IPS submetidas a pH 11. Segundo esses autores, em algumas situações, as proteínas da soja podem ser desnaturadas e manterem sua estrutura secundária num estado de glóbulo fundido (*molten globule state*), o qual é formado pelo colapso de estrutura terciária da proteína sem perdas na conformação secundária.

Geralmente considera-se que o processo de enovelamento das estruturas proteicas é constituído por três fases diferentes, como ilustrado na Figura 20. De acordo com Ptitsyn (1995), na primeira fase (ou primeira estrutura intermediária), a estrutura secundária das proteínas pode oscilar em torno das posições nativas de α -hélices e β -strands (modelo estrutural ou framework model), enquanto na segunda fase (ou segunda estrutura intermediária), a arquitetura total da proteína oscila em torno das posições nativas mútuas de α -hélices e β -strands (modelo glóbulo fundido). Segundo tais autores, as proteínas em um estado glóbulo fundido podem apresentar uma combinação incomum de propriedades das proteínas nativas e desnaturadas, geralmente sem estrutura terciária rígida (não apresentado picos nos resultados obtidos por DSC) e com mobilidade intramolecular muito maior do que no estado nativo (PTITSYN, 1995).

Sabe-se também que o espectro de DC das proteínas em estado de glóbulo fundido pode ser ainda mais pronunciado que da proteína no estado nativo, sugerindo uma maior quantidade de estruturas secundárias, como verificado a partir dos resultados das amostras submetidas a pH 11 (KUWAJIMA, 1989; PTITSYN, 1995). Além disso, a natureza semi-flexível das proteínas neste estado permite a exposição de alguns grupos internos da estrutura proteica, tornando a superfície mais hidrofóbica que no estado nativo, como foi verificado a partir dos resultados de hidrofobicidade superficial do presente trabalho (SEMISOTNOV et al., 1987, 1991).

Tabela 8 Proporções das diferentes conformações estruturais obtidas por meio da análise do espectro de dicroísmo circular de amostras de IPS não tratadas e submetidas a diferentes condições de pH e tratamentos térmicos

Amostra	α -hélice (%)	β -sheet/ β -folha	β -turn/ volta β	PP2 (%)	Desordenada (%)
		(%)	(%)		
IPS não tratado	31,5	4	14,5	10,4	40,7
pH 7 - 60 °C	23,3	10,2	15,1	9,6	40,7
pH 7 - 80 °C	23,8	12,7	14,4	9	43,6
pH 9 - 60 °C	25,4	13,3	13,9	8,3	41,6
pH 9 - 80 °C	25,4	18,4	13,5	6,2	39
pH 11 - 60 °C	35,2	15,2	11,1	4,6	32,2
pH 11 - 80 °C	44	14,6	10,3	4,1	30,2

Fonte: Própria autoria

Figura 20 Esquema ilustrativo do processo de dobramento/enovelamento de proteínas

Fonte: PTITSYN, O.B. Molten globule and protein folding. In: ANFINSEN, C.B. et al. **Advances In Protein Chemistry**, Massachusetts: Academic Press, 1995, v. 47, p. 83-229.

Além de permitirem conclusões sobre o estado de glóbulo fundido das proteínas do IPS, os resultados de DC permitiram a compreensão do grau de alteração das proteínas a partir das diferentes condições de pré-tratamento aplicadas no processo de gelificação a frio.

Estudos encontrados na literatura apontam que, em condições gelificantes, as proteínas apresentam uma redução do conteúdo de α -hélices e um aumento das estruturas em folhas- β (CLARK et al., 1981; LIN; KOEING, 1976; WANG; DAMODARAN, 1991). Em seu trabalho, Wang e Damoraran (1991) investigaram o processo de gelificação por indução térmica de proteínas da soja e de soro albumina bovina, e afirmaram que a ruptura da estrutura terciária, desnaturação parcial e presença de estrutura em folhas- β são fatores essenciais para a formação de géis proteicos. A hipótese discutida pelos autores é a de que, em géis de proteínas globulares, os seguimentos de folhas- β orientados em configurações paralela ou antiparalela atuam como zonas de junção em redes gelificadas. Os resultados obtidos em tal estudo mostraram também que, para ambas as proteínas analisadas, a concentração crítica de estruturas folhas- β para a formação de géis foi de aproximadamente 25%. Embora o método de gelificação a frio aplicado no presente trabalho seja diferente do método aplicado por Wang e Damoraran (1991), algumas hipóteses podem ser levantadas.

Como discutido anteriormente, a diferença básica entre os métodos de gelificação a frio e métodos por indução térmica é que no processo de gelificação em baixas temperaturas, a desnaturação parcial (pré-tratamento térmico) e o processo de agregação não ocorrem juntamente com a etapa de gelificação, enquanto que na gelificação induzida termicamente os processos ocorrem simultaneamente (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000; TOTOSAUS et al., 2002). Nesse contexto, com base nos resultados discutidos por Wang e Damodaran (1991), pode-se supor que, para o processo de gelificação a frio, o pré-tratamento térmico deve acarretar em um aumento de folhas- β , sem atingir a proporção crítica dessas estruturas que resultam na formação da rede gelificada.

Assim, os resultados disponíveis na Tabela 8 indicaram que os diferentes tratamentos térmicos e condições de pH aplicados foram importantes para o aumento de estruturas folhas- β e, por tanto, maior exposição das estruturas reativas das proteínas, necessárias para a posterior indução da gelificação pela adição de CaCl_2 (ALTING, 2003; BRYANT; MCCLEMENTS, 2000). Além disso, pode-se afirmar que para a produção de géis a frio, as proporções críticas de estruturas em folhas- β que resultam na formação da rede gelificada devem ser superiores aos teores verificados na Tabela 8, para cada uma das condições testadas. Apesar de esses resultados não serem suficientes para a obtenção de conclusões a

respeito das propriedades gelificantes do IPS, eles possibilitam uma discussão inicial a respeito do comportamento deste ingrediente nas diferentes condições testadas.

6.2 ENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA EM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Dentre os diversos fatores que influenciam a estabilidade de partículas lipídicas sólidas está o tipo de tensoativo utilizado (HELGASON et al. 2009; MEHNERT; MÄDER, 2001). Os compostos com propriedades tensoativas apresentam moléculas anfifílicas, ou seja, moléculas que contém grupos hidrofóbicos e hidrofílicos em suas estruturas. O balanço entre os tamanhos e os momentos dipolares dessas estruturas determina a capacidade emulsificante e a estabilidade dos sistemas estabilizados, e é descrito pelo valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) do tensoativo (GRIFFIN, 1949).

Para a determinação da melhor condição de EHL para a produção das micropartículas lipídicas sólidas de estearina de palma, foram testadas diferentes proporções de Tween 80 e Span 80. Os resultados de distribuição de tamanho de partícula obtidos durante o período de monitoramento das diferentes formulações estão disponíveis na Figura 21. Tais resultados mostraram que a aplicação combinada desses dois tensoativos é muito interessante para a obtenção de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com estearina de palma, uma vez que todas as proporções testadas apresentaram uma estabilidade satisfatória no período de 7 dias em que as amostras foram mantidas à temperatura ambiente.

Dentre as proporções testadas, a formulação EHL-1.2, com 40% de Tween 80 e 60% de Span 80, foi escolhida para a encapsulação da curcumina, uma vez que apresentou distribuições de tamanho de partícula estáveis (Figura 21B) durante o período estudado e valores de span inferiores às demais formulações, como verificado na Tabela 9. Segundo Karimi e Mohammadifar (2014), menores valores de span estão associados à maior uniformidade no tamanho das partículas da amostra, o que pode ser utilizado como um indicativo de estabilidade. Assim, a partir desses resultados, admitiu-se que o valor de EHL da estearina de palma é próximo a 8,58, ou seja, ao valor calculado para esta combinação de 40% de Tween 80 e 60% de Span 80, segundo informações da literatura (DAVIES; GRAHAM; VINCENT, 1987).

Figura 21 Distribuição de tamanho de partícula das amostras de MLS produzidas com formulações: (A) EHL-1.1; (B) EHL-1.2; (C) EHL-1.3; (D) EHL-1.4; (E) EHL-1.5; (F) EHL-1.6.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 9 Valores de span das amostras de MLS produzidas com formulações contendo diferentes proporções Tween 80/Span 80.

Formulação	Período de armazenamento (dias)	span
EHL-1.1	1	0,696 ± 0,018
	3	0,722 ± 0,087
	7	0,693 ± 0,032
EHL-1.2	1	0,648 ± 0,013
	3	0,623 ± 0,225
	7	0,667 ± 0,030
EHL-1.3	1	0,791 ± 0,010
	3	0,751 ± 0,057
	7	0,733 ± 0,118
EHL-1.4	1	0,649 ± 0,013
	3	0,654 ± 0,022
	7	0,904 ± 0,241
EHL-1.5	1	1,107 ± 0,440
	3	0,952 ± 0,304
	7	0,690 ± 0,065
EHL-1.6	1	1,153 ± 0,038
	3	1,131 ± 0,040
	7	1,063 ± 0,034

Fonte: Própria autoria

A partir da encapsulação das diferentes concentrações de curcumina nas MLS, verificou-se a formação de precipitados, como mostrado na Figura 22. Com o aumento da quantidade de bioativo nas amostras, a quantidade de curcumina acumulada no fundo dos tubos de ensaio foi maior, indicando que as concentrações utilizadas foram maiores que a capacidade de encapsulação dos sistemas formados.

Por tanto, dentre as concentrações testadas, as amostras contendo 0,03% (m/m) de curcumina foram submetidas à centrifugação para a remoção do excesso de curcumina não encapsulada e foram monitoradas em diferentes dias de armazenamento. O aspecto visual das amostras após centrifugação está disponível na Figura 23.

Os resultados obtidos a partir do monitoramento do diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula dessas amostras mostraram que os sistemas mantiveram-se estáveis ao longo dos 60 dias analisados, como mostrado nas Figuras 24 e 25, confirmando o bom desempenho dos tensoativos utilizados.

A partir das quantificações de curcumina (Figura 26), realizadas em diferentes dias de armazenamento, foi possível verificar que a concentração de bioativo manteve-se constante ao longo dos 60 dias analisados, evidenciando a elevada capacidade das MLS em protegerem

o material encapsulado. Esse resultado é condizente com os valores de ângulo de Hue (Figura 27B), que se mantiveram constantes e próximos a 103° em todo o período de armazenamento. De acordo com a Figura 28, tais valores indicaram que as amostras apresentaram uma cor amarela esverdeada, característica da curcumina, ao longo dos 60 dias de monitoramento. Por outro lado, os valores de croma e diferença total de cor, mostrados nas Figuras 27 (A) e 27(C), respectivamente, apresentaram maiores variações nos dias 07 e 22 de armazenamento, provavelmente devido à homogeneização insuficiente das amostras antes da leitura.

Figura 22 Aspecto visual das amostras de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) produzidas com concentração de curcumina igual a: (A) 0,03% (m/m); (B) 0,045% (m/m); (C) 0,063% (m/m).

(A)

(B)

(C)

Fonte: Própria autoria.

Figura 23 Aspecto visual das amostras de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) produzidas com 0,03% (m/m) de curcumina adicionada, após processo de centrifugação.

Fonte: Própria autoria.

Figura 24 Diâmetros médios das partículas com 0,03% (m/m) de curcumina encapsulada, após centrifugação, ao longo do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$) para a mesma amostra em diferentes dias de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

Figura 25 Distribuição de tamanho das partículas nas amostras com 0,03% (m/m) de curcumina encapsulada, após centrifugação, ao longo do período de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

Figura 26 Resultados das quantificações de curcumina encapsulada nas MLS, ao longo do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$) para a mesma amostra em diferentes dias de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

Figura 27 Valores dos parâmetros Croma (A), Ângulo de Hue (B) e diferença total de cor (C) das amostras de MLS com 0,03%(m/m) de curcumina encapsulada, após centrifugação, ao longo de 60 dias de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Figura 28 Diagrama CieLab indicando a sequência de nuances de cores e a orientação do ângulo de Hue.

Fonte: ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R.M. **Qualidade de fruto de aceroleira Cv.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, p. 541-545, outubro 2011.

Como discutido anteriormente, as características das MLS dependem de diversos fatores, como, por exemplo, o tipo de lipídio utilizado, o tipo e concentração de emulsificantes e a taxa de resfriamento dos sistemas. Essas características influenciam na capacidade das partículas de encapsular e proteger compostos lipofílicos, como a curcumina (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Os resultados discutidos anteriormente mostraram que o sistema utilizado no presente trabalho apresentou uma capacidade satisfatória de proteção do material encapsulado, o que foi reforçado pelas imagens disponíveis na Figura 29, obtidas a partir da análise de microscopia de fluorescência. Nelas, foi possível observar que o material encapsulado encontrava-se distribuído em todo núcleo lipídico, não sendo verificado o processo de expulsão. Tal resultado é desejável, uma vez que se o bioativo é expulso, o processo de oxidação pode ser acelerado, devido à maior exposição do mesmo a agentes oxidantes (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; TIKEKAR; NITIN, 2011).

Figura 29 Imagem obtida por microscopia de fluorescência das dispersões de MLS (A) e representação do perfil de intensidade de fluorescência ao longo do diâmetro das MLS (B).

Fonte: Própria autoria.

6.3 DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO A FRIO DOS GÉIS DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA

6.3.1 Construção dos diagramas visuais

Para a determinação das melhores condições para a produção dos géis de IPS obtidos a frio, diferentes formulações foram testadas. As estruturas resultantes foram analisadas subjetivamente e classificadas em sete padrões diferentes: amostra com separação de fases, dispersão pouco viscosa, dispersão viscosa, dispersão muito viscosa, gel não sustentável, gel

sustentável fraco e gel sustentável forte, conforme ilustrado na Figura 30. Esses padrões foram definidos a partir de adaptações de Diniz (2007) e foram utilizados para a construção de diagramas visuais (PERRECHIL; SATO; CUNHA, 2011). Fotos de todas as amostras classificadas como géis sustentáveis fortes encontram-se disponíveis nos Apêndices A, B, C e D.

Figura 30 Estruturas obtidas no processo de obtenção a frio do gel de isolado proteico de soja classificadas como (A) amostra com separação de fases; (B) dispersão pouco viscosa; (C) dispersão viscosa; (D) dispersão muito viscosa; (E) gel não sustentável; (F) gel sustentável fraco; (E) gel sustentável forte.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados obtidos mostraram que as amostras produzidas em pHs 5 e 6, independentemente das concentrações de isolado proteico de soja, CaCl_2 e condição de pré-aquecimento, apresentaram separação de fases. Tal comportamento pode ser justificado pela baixa solubilidade do isolado proteico de soja nessas condições, como discutido no item 6.1.3, que dificulta o aproveitamento adequado das propriedades funcionais da matéria prima (DAMODARAN, 2010).

Os resultados obtidos a partir de sistemas produzidos nos pHs 7, 9 e 11, com diferentes concentrações de IPS e CaCl_2 , utilizando-se condições de pré-aquecimento de 60 °C por 15 e 30 minutos, estão mostrados nos diagramas visuais da Figura 31.

Figura 31 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis de isolado proteico de soja, submetidas à pré-tratamento térmico a: 60 °C por 15 min (A); 60 °C por 30 min (B).

Fonte: Própria autoria.

Como verificado nos diagramas visuais disponíveis nas Figuras 31(A) e 31(B), nenhuma amostra, pré-aquecida a 60 °C em pH 7, apresentou aspecto de gel sustentável. Esses resultados podem ser compreendidos a partir da análise das características do IPS apresentadas no item 6.1. Como verificado a partir dos resultados de hidrofobicidade superficial (item 6.1.5) e fluorescência intrínseca do triptofano (item 6.1.6), as alterações estruturais e exposição dos resíduos hidrofóbicos com o aquecimento das amostras de IPS a 60 °C em pH 7, foi pequena, em comparação às amostras não tratadas. Além disso, embora os resultados de dicroísmo circular tenham indicado uma redução de estruturas α -hélice e um aumento de β -folha, as alterações na estrutura secundária, decorrentes do pré-tratamento térmico em questão, possivelmente não foram suficientes para a adequada exposição dos grupos reativos das proteínas, que permitem a formação de gel a partir da adição de CaCl_2 . Outro fator importante a ser destacado é a solubilidade relativamente baixa do IPS em pH 7 (32,02%), que pode ter reduzido o efeito do tratamento térmico na estrutura das proteínas, e afetado o equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-água, necessário para a formação de géis.

Por outro lado, em pH 9, géis sustentáveis fortes foram obtidos a partir de amostras pré-aquecidas a 60 °C por 15 e 30 minutos, com 15 % de IPS e na presença de CaCl_2 . Como discutido anteriormente (item 6.1), estas condições pH e pré-aquecimento resultaram em um aumento na exposição de resíduos hidrofóbicos das proteínas, e alteraram a estrutura secundária das mesmas, reduzindo a proporção de estruturas α -hélice e aumentando as estruturas β -folha. Tais alterações estruturais tornaram as proteínas mais “reativas” ao processo de gelificação, possibilitando a formação de géis sustentáveis a partir da adição de CaCl_2 . Além disso, a maior solubilidade do IPS em pH 9 (51,58 %) refletiu nas propriedades gelificantes das proteínas nessas condições, possibilitando um aumento de interações proteína-proteína e proteína-água.

Como verificado nos diagramas visuais das amostras produzidas em pH 11, pré-aquecidas a 60 °C por 15 (Figura 31A) e 30 minutos (Figura 31B), géis sustentáveis fortes foram obtidos a partir de amostras produzidas com 13% de IPS, na presença de CaCl_2 , e com 15% de IPS, na presença e na ausência de CaCl_2 . Para a compreensão de tais resultados, é necessário considerar as propriedades do IPS nessas condições e também as características do processo de gelificação a frio.

Segundo a literatura, durante a etapa de pré-aquecimento no processo de gelificação a frio, o pH das dispersões deve ser diferente do ponto isoelétrico da proteína, a força iônica do meio deve ser baixa, e a concentração de proteínas deve ser inferior a um determinado limite crítico, para evitar a formação da estrutura tridimensional gelificada (VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011). Nesse contexto, pode-se concluir que tal concentração crítica depende das propriedades da proteína utilizada, principalmente as características de solubilidade e o grau de exposição dos grupos reativos, importantes para a formação da rede.

A partir dos resultados mostrados nas Figuras 31(A) e 31(B), verificou-se, por tanto, que, em pH 11, a concentração limite de IPS para a produção de géis a frio é inferior a 15 %, uma vez que, nessas condições, géis sustentáveis foram formados mesmo na ausência de CaCl_2 e, por tanto, a estrutura tridimensional foi formada por indução térmica, e não pela ação do sal. Por outro lado, a concentração de 13 % IPS mostrou-se inferior a concentração limite, uma vez que, nessas condições, géis sustentáveis só foram formados a partir da adição de CaCl_2 .

A concentração limite de IPS para a obtenção de géis a frio em pH 11 foi inferior aos demais pHs testados devido a elevada solubilidade das proteínas (100%) nessa condição, e também às características estruturais, verificadas a partir dos resultados de hidrofobicidade superficial, fluorescência intrínseca do triptofano e dicroísmo circular, discutidos no item 6.1, que indicaram uma elevada exposição dos grupos reativos das proteínas e a presença de aglomerados.

Resultados iguais aos obtidos a partir da avaliação visual das amostras pré-aquecidas a 60 °C, por 15 e 30 minutos, foram verificados a partir das amostras produzidas nos pHs 7, 9 e 11, pré-aquecidas a 80 °C por 15 minutos, como ilustrado na Figura 32(A). Por outro lado, dentre as amostras pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos (Figura 32B), apenas as formulações com pH 9 mantiveram o comportamento verificado nas demais condições de pré-aquecimento testadas.

Figura 32 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis de isolado proteico de soja, submetidas à pré-tratamento térmico a: 80 °C por 15 min (A); 80 °C por 30 min (B).

Fonte: Própria autoria.

Em pH 7, as amostras produzidas com 15 % de IPS e pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos, foram classificadas como géis sustentáveis fortes, na presença de concentração igual ou superior a 10 mM de CaCl₂, e gel sustentável fraco na presença de 5 mM de CaCl₂. Tais resultados evidenciaram a importância da adequada determinação das condições de pré-aquecimento para a produção de géis de IPS obtidos a frio, uma vez que, nessas condições de pH, géis sustentáveis fortes só foram obtidos, a partir da adição de sal, devido à maior exposição de grupos reativos nas amostras tratadas a 80 °C por 30 minutos, verificada a partir dos resultados das análises de hidrofobicidade superficial, fluorescência intrínseca do triptofano, e, principalmente, a partir do aumento de estruturas β -folha nos resultados de dicroísmo circular.

Além disso, tais resultados indicaram que, embora a concentração de 15 % de IPS seja elevada, ela não é suficiente para a formação da rede tridimensional durante o processo de pré-aquecimento em pH 7 (pré-requisito para a produção de géis a frio, como discutido anteriormente). Trabalhos encontrados na literatura geralmente aplicam concentrações inferiores de IPS para a produção de géis obtidos a frio, porém a maioria deles utiliza ingredientes obtidos em laboratório, com características diferentes do IPS aplicado no presente trabalho e, principalmente, com maior solubilidade (MALTAIS et al., 2005; MALTAIS; REMONDETTO; SUBIRADE, 2008). Considerando-se a solubilidade relativamente baixa do IPS em pH 7, faz sentido que uma maior concentração proteica seja necessária para a obtenção de géis sustentáveis na etapa de adição de sal.

Os resultados mostrados na Figura 32(B), por outro lado, mostraram que géis sustentáveis não foram obtidos a partir das amostras produzidas em pH 11 e pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos, em nenhuma das concentrações de IPS e CaCl₂ testadas. Possivelmente, nessas condições, o colapso das estruturas terciárias levou as proteínas ao estado de glóbulo fundido com estruturas secundárias inadequadas, e grau de exposição dos grupos reativos insuficiente para a formação da estrutura gelificada. Como citado anteriormente, estudos encontrados na literatura apontam que, em condições gelificantes, as proteínas tendem a apresentar reduções no conteúdo de α -hélice e aumentos de folhas- β (WANG; DAMODARAN, 1991), porém, como verificado a partir dos resultados de DC (6.1.7), amostras de IPS tratadas a 80 °C, em pH 11, apresentaram um aumento de estruturas α -hélice, e um aumento menos acentuado de folhas- β , em comparação às amostras em pH 11 e submetidas a 60 °C.

De maneira geral, os resultados expostos evidenciaram a importância das características das proteínas, tais como solubilidade, estrutura secundária e grau de exposição de grupos reativos, e das concentrações de IPS e CaCl_2 , para a formação de géis sustentáveis.

Sabe-se que a formação de géis proteicos é resultado do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-água e as forças de atração e repulsão entre as cadeias polipeptídicas adjacentes (BERTRAND; TURGEON, 2007; BRAGA et al, 2006). Nesse contexto, a presença de alta concentração de IPS foi fundamental para a formação dos géis, por aumentar as interações hidrodinâmicas entre as moléculas de proteína que resultam em um comportamento essencialmente viscoelástico do sistema (DINIZ, 2007; PUPPO, 1997). Além disso, a presença de CaCl_2 foi importante na maioria das amostras por reduzir a repulsão eletrostática e formar pontes salinas entre os grupos carboxílicos carregados negativamente e as moléculas de proteína vizinhas, permitindo a formação da estrutura tridimensional característica dos géis (FOEGEDING et al., 2002; TOTOSAUS et al., 2002).

Além de influenciarem na capacidade de formação de géis, fatores como o pH, concentração de proteína, força iônica e condições de pré-tratamento, se mostraram fundamentais na determinação das características dos géis (BERTRAND; TURGEON, 2007; BRAGA et al, 2006; DINIZ, 2007; TANG; MCCARTHY; MUNRO, 1995). Os resultados mostraram que, dentre as condições testadas no presente trabalho, o pH foi a característica que mais influenciou na aparência dos géis obtidos, disponíveis nos Apêndices A, B, C e D. Em pH 7 foram formados géis de aparência muito opaca, em pH 9 os géis apresentaram aparência um pouco mais translúcida e em pH 11 os géis apresentaram uma aparência translúcida.

Em pH 7, a opacidade dos géis pode ser justificada pela possível associação aleatória dos complexos formados durante o pré-aquecimento devido à magnitude e distribuição de cargas das proteínas nessa condição (DAMODARAN, 2010). Em pHs mais distantes do pH isoeletrico da proteína, como os pHs 9 e 11, a repulsão eletrostática possivelmente impediu a formação desordenada de agregados protéicos e favoreceu a formação de agregados ordenados que permitiram uma maior passagem de luz pelo sistema, o que resultou na formação de géis mais transparentes (CAVALLIERI, 2007).

6.3.2 Perfil de textura

Para uma adequada escolha das melhores condições de produção dos géis de IPS obtidos a frio para o desenvolvimento do presente estudo, caracterizações preliminares dos géis sustentáveis foram realizadas por meio de análises de perfil de textura de tais sistemas.

A textura de um produto é resultado de suas propriedades físicas e da forma como os componentes estruturais se organizam nas micro e macroestruturas. Essa propriedade está relacionada ao comportamento de deformação, desintegração e fluidez do material a partir da ação de uma força (BOURNE, 1978; DINIZ, 2007). Os resultados de perfil de textura dos géis produzidos em pH 7 estão disponíveis da Figura 33. Os gráficos mostram que o aumento da concentração de sal superior a 15 mM de CaCl_2 resultou em um aumento significativo ($p < 0,05$) da dureza, elasticidade e coesividade dos géis. Além disso, nenhum dos parâmetros foi significativamente diferente ($p > 0,05$) entre as amostras com 5 e 10 mM de CaCl_2 , e entre amostras com 15 e 20 mM de CaCl_2 .

De acordo com Maltais, Remondetto e Subirade (2008), as características das interações envolvidas no processo de gelificação a frio, bem como as propriedades das estruturas formadas, dependem muito da concentração de sal aplicada. Em concentrações elevadas de CaCl_2 , a rápida redução das forças repulsivas entre as moléculas resulta em crescimentos aleatórios de agregados proteicos, controlados por interações de van der Waals. Segundo os autores, a pequena carga repulsiva entre os aglomerados proteicos permite o movimento das moléculas ao redor dos pontos de contato, promovendo interações proteína-proteína e permitindo a formação de novas ligações. Estes rearranjos podem causar uma compactação das estruturas, forçando a água presente nos sistemas para fora, e tornando os agregados mais densos, como verificado a partir do aumento na dureza e coesividade dos sistemas com o aumento da concentração de sal, na Figura 33. O aumento da elasticidade dos sistemas com o aumento da concentração de CaCl_2 , por outro lado, pode ser explicado pela formação de pontes salinas entre grupos carboxílicos carregados negativamente e moléculas vizinhas, resultantes da ação de Ca^{2+} .

Figura 33 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 7 analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Os resultados de perfil de textura dos géis produzidos em pH 9 estão disponíveis na Figura 34. Uma vez que, nessas condições de pH, mais formulações foram classificadas como géis sustentáveis, os resultados de TPA permitiram a avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos térmicos e diferentes concentrações de sal, nas propriedades de dureza, elasticidade e coesividade dos sistemas.

Inicialmente, por meio da comparação dos resultados obtidos a partir de amostras submetidas às mesmas condições de pré-aquecimento e diferentes concentrações de sal, verificou-se que o aumento da concentração de CaCl_2 não alterou significativamente ($p>0,05$) a elasticidade e coesividade dos sistemas. Por outro lado, em alguns casos, alterações de força iônica afetaram a dureza dos géis formados. Em sistemas submetidos a 60 °C por 15 e 30 minutos e 80 °C por 15 minutos, foram observados aumentos na dureza com o aumento da concentração de CaCl_2 , enquanto em sistemas submetidos a 80 °C por 30 minutos, a adição de diferentes concentrações de sal não alterou significativamente ($p>0,05$) esse parâmetro. A partir desses resultados pode-se afirmar, por tanto, que com o aumento da intensidade (temperatura e tempo) do tratamento térmico, os efeitos da concentração de CaCl_2 nas propriedades de textura dos géis, produzidos em pH 9, foram reduzidos.

Por outro lado, por meio da comparação dos resultados obtidos a partir de amostras com mesma concentração de sal e submetidas a diferentes condições de pré-tratamento térmico, verificou-se que, em géis com concentrações de 5 e 15 mM de CaCl_2 , os diferentes pré-tratamentos não afetaram significativamente ($p>0,05$) a dureza dos sistemas, enquanto nas concentrações de 10 e 20 mM, diferentes comportamentos foram observados. Amostras produzidas com 10 mM de CaCl_2 , previamente submetidas a 60 °C por 15 minutos, apresentaram dureza significativamente ($p<0,05$) superior às amostras submetidas aos demais tratamentos. Por outro lado, nas amostras produzidas com 20 mM, foi verificado que o aumento da intensidade de pré-tratamento, ou seja, o aumento da temperatura e de tempo de pré-aquecimento, levou ao aumento da dureza dos géis obtidos.

Já com relação à elasticidade e à coesividade dos géis em pH 9, foi verificado que, nos casos em que as diferenças foram estatisticamente significativas ($p<0,05$), aumentos de temperatura e tempo de pré-tratamento térmico em amostras, com mesma concentração de CaCl_2 , levaram a uma redução na elasticidade e coesividade das estruturas obtidas.

Figura 34 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 9 analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados de perfil de textura dos géis produzidos em pH 11 estão disponíveis na Figura 35. Assim como no caso das amostras produzidas em pH 9, nestas condições, os resultados de TPA permitiram a avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos térmicos e diferentes concentrações de sal, nas propriedades de dureza, elasticidade e coesividade dos

sistemas. Como verificado na Figura 35, análises não foram realizadas em sistemas submetidos a 80 °C por 30 minutos, uma vez que géis sustentáveis não foram formados nestas condições. Além disso, géis produzidos com 15 % de IPS não foram analisados, uma vez que tais sistemas foram formados por indução térmica, e não por gelificação a frio, como discutido anteriormente.

Por meio da comparação dos resultados obtidos a partir de amostras submetidas às mesmas condições de pré-aquecimento e diferentes concentrações de sal, verificou-se que o aumento da concentração de CaCl_2 aumentou significativamente ($p > 0,05$) a dureza dos sistemas submetidos a 60 °C por 15 minutos. Por outro lado, em sistemas tratados a 60 °C por 30 minutos, géis produzidos com 10 mM de CaCl_2 apresentaram maior dureza. Já para as amostras submetidas a 80 °C por 15 minutos, variações na concentração de sal não alteraram significativamente o parâmetro em questão.

Os parâmetros elasticidade e coesividade foram pouco afetados por variações na concentração de sal, para sistemas submetidos às mesmas condições de pré-tratamento térmico. Como verificado nas Figuras 35(B) e 35(C), aumentos na concentração de CaCl_2 resultaram em um pequeno aumento na elasticidade dos sistemas submetidos a 60 °C por 15 minutos, porém não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nas amostras submetidas a 60 °C por 30 minutos e 80 °C por 15 minutos. Já com relação a coesividade, pequenas variações foram verificadas apenas em sistemas submetidos a 80 °C por 15 minutos.

Assim como nas amostras tratadas em pH 9, os efeitos das diferentes concentrações de CaCl_2 nas propriedades de textura dos sistemas também foram reduzidos com o aumento da intensidade do tratamento térmico, em géis de pH 11. Tais resultados podem estar relacionados ao grau de exposição dos grupos reativos das moléculas proteicas. Possivelmente, em condições de pré-tratamento térmico mais intensas, os grupos reativos das moléculas de proteína ficaram tão expostos, que mesmo a adição de pequenas concentrações de CaCl_2 levaram à uma rápida redução da repulsão eletrostática entre as moléculas, bem como à uma rápida formação de pontes salinas entre os grupos. Nesse contexto, a adição de 5, 10, 15 ou 20 mM de sal, não afetaram de formas diferentes a velocidade de agregação e formação dos géis, que apresentam valores de dureza, elasticidade e coesividade muito semelhantes.

A partir da comparação dos resultados das amostras submetidas às mesmas concentrações de sal e diferentes condições de pré-aquecimento, em pH 11, verificou-se que, nos casos em que ocorreram alterações significativas ($p < 0,05$), o aumento da intensidade

(temperatura e tempo) de pré-tratamento térmico resultou em aumentos na dureza e coesividade dos sistemas.

Figura 35 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 11 analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.

(C)

Fonte: Própria autoria.

6.3.3 Capacidade de retenção de água

Sabe-se que além das propriedades de textura, fatores como o pH, concentração de proteína, força iônica e condições de pré-tratamento térmico, estão fortemente relacionados a outras características dos géis de IPS obtidos a frio, dentre elas, a capacidade de retenção de água dos sistemas (BERTRAND; TURGEON, 2007; BRAGA et al, 2006; DINIZ, 2007; RENKEMA, 2004).

Os resultados obtidos a partir das análises para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA) dos géis produzidos em diferentes pHs e com diferentes formulações, estão disponíveis na Figura 36.

Figura 36 CRA das amostras de géis produzidas em pH: (A) 7; (B) 9; (C) 11. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.

Fonte: Própria autoria.

A partir de tais resultados verificou-se que, para as amostras em pH 7 (Figura 36A), o aumento da concentração de sal, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a CRA dos géis obtidos, o que pode ser explicado por dois fenômenos diferentes. A adição de baixa quantidade de sal pode provocar um aumento da solubilidade de proteínas de soja (fenômeno conhecido como “salting-in”), o que resulta em um aumento na capacidade de retenção de água dos géis, porém, a adição de concentrações elevadas de sal pode levar à redução da solubilidade da proteína (fenômeno conhecido como “salting-out”) e provocar uma agregação desordenada das moléculas, resultando em um gel poroso com baixo CRA, visto que géis com poros dilatados tendem a inibir a capacidade de imobilização do solvente através de forças capilares (BRAGA et al., 2006; DINIZ, 2007; MALTAIS et al., 2005).

A redução da CRA em géis de IPS obtidos a frio com o aumento da concentração de CaCl_2 foi verificada também por Maltais et al. (2005) e Diniz (2007), que associaram esse efeito às alterações estruturais e aumentos de poros nos géis formados.

Os resultados obtidos a partir dos géis produzidos em pH 9 (Figura 36B) mostraram que as amostras de mesma formulação (concentração de IPS e condição de pré-tratamento térmico) e diferentes concentrações de CaCl_2 não apresentaram valores de CRA significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$). Por outro lado, a partir da análise das amostras com diferentes formulações e mesma concentração de CaCl_2 , verificou-se que, nas amostras com 10 e 15 mM de sal, os géis submetidos a 60 °C por 30 minutos apresentaram menor CRA, enquanto aqueles produzidos com pré-aquecimento a 80 °C por 30 minutos apresentaram maior CRA. Nas demais concentrações de sal, as diferentes condições de pré-aquecimento não influenciaram de formas significativamente diferentes ($p > 0,05$) na CRA dos géis obtidos em pH 9.

A partir da análise dos resultados de CRA dos géis produzidos em pH 11 (Figura 36C), verificou-se que, dentre as amostras de mesma formulação e diferentes concentrações de sal, a única que apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) foi aquela produzida com 13% de IPS e pré-aquecida a 60 °C por 30 minutos, na qual o aumento da concentração de CaCl_2 resultou em uma redução da CRA. Por outro lado, a comparação entre os resultados dos géis de mesma concentração de sal e diferentes tratamentos térmicos mostrou que, em sistemas produzidos com 10, 15 e 20 mM de CaCl_2 , amostras submetidas a 80 °C por 15 minutos apresentaram menor CRA que as demais.

Como verificado na Figura 36, em pHs mais básicos, as variações de CRA a partir da adição de diferentes concentrações de CaCl_2 foram menores que em pH 7. Tais resultados

podem estar relacionados à maior solubilidade do IPS em pHs 9 e 11, como discutido no item 6.1.3, o que diminuiu o efeito dos fenômenos conhecidos como *salting-in* e *salting-out*, explicados anteriormente (BRAGA et al., 2006; DINIZ, 2007; MALTAIS et al., 2005).

Embora os diagramas visuais e os resultados dos ensaios de TPA e CRA dos géis de IPS tenham mostrado que o ingrediente comercial em questão apresenta melhores propriedades gelificantes em pHs básicos, sabe-se que os pHs da vasta maioria dos produtos alimentícios variam entre 3 e 7 (BRAGA et al., 2006). Nesse contexto, para o desenvolvimento do presente trabalho, o pH 7 foi escolhido para a produção de géis de IPS, não-carregados e carregados com micropartículas lipídicas sólidas.

Conforme discutido anteriormente, nessas condições de pH, géis sustentáveis fortes só foram obtidos a partir de sistemas com 15 % (m/v) de IPS, pré-aquecidos a 80 °C por 30 minutos e com concentrações de CaCl_2 iguais ou superiores a 5 mM. Dentre tais formulações, aquela produzida com 10 mM de CaCl_2 (formulação G1) foi selecionada para o desenvolvimento do presente estudo. Essa escolha é justificada pela maior CRA dos géis produzidos nessa condição, em comparação àqueles com maiores concentrações de sal, e também pelo aspecto mais estável desses sistemas, em comparação àqueles produzidos com 5 mM de CaCl_2 .

6.4 DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO A FRIO DOS GÉIS BIOPOLIMÉRICOS MISTOS

Os resultados obtidos a partir dos testes para a determinação das melhores condições para a produção dos géis de IPS obtidos a frio, discutidos no item 6.3.1, indicaram que as características do ingrediente utilizado afetaram significativamente suas propriedades gelificantes. Embora géis sustentáveis fortes tenham sido facilmente obtidos em pHs 9 e 11, tais sistemas só foram formados, em pH 7, a partir de amostras com 15 % de IPS, pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos, e na presença de concentração igual ou superior a 10 mM de CaCl_2 . Ainda assim, nessas condições, as estruturas em pH neutro apresentaram certa instabilidade, adquirindo aspectos de géis sustentáveis fracos em menos de 15 min à temperatura ambiente e refletindo as características desafiadoras do isolado em questão, principalmente considerando-se que os pHs de produtos alimentícios variam entre 3 e 7.

Embora tais resultados sejam desafiadores, eles representam fielmente alguns dos problemas enfrentados pela indústria para a aplicação de IPS, raramente citados na literatura, e evidenciam a importância do desenvolvimento de pesquisas que investiguem, não apenas as propriedades do ingrediente comercial, mas também alternativas que solucionem ou reduzam

as características desafiadoras desse composto, permitindo um maior aproveitamento de suas propriedades funcionais em larga escala.

Segundo a literatura, propriedades funcionais de ingredientes proteicos podem ser melhoradas a partir da adição de polissacarídeos, que, em alguns casos, são capazes de estabilizar as estruturas das proteínas e alterar suas características (CÈSARO et al., 1999; DICKINSON, 1993; KASRAN; CUI; GOFF, 2013; TOLSTOGUZOV, 1997; WANG et al., 2011). Além disso, os sistemas complexos, formados a partir da interação entre esses dois tipos de biopolímeros, podem apresentar características diferentes dos sistemas produzidos com os compostos individuais, permitindo o desenvolvimento de novos produtos alimentícios (CHANG et al., 2014; HUA; CUI; WANG, 2003; TOLSTOGUZOV, 1997). Nesse contexto, visando à melhoria das propriedades gelificantes do IPS comercial, em pH 7, goma xantana e goma locusta foram adicionadas aos sistemas para a produção de géis biopoliméricos mistos. Tais polissacarídeos foram escolhidos para o desenvolvimento do presente estudo, por serem amplamente aplicados na indústria de alimentos e por apresentarem características distintas, permitindo, possivelmente, a obtenção de sistemas com diferentes propriedades.

Para a determinação das melhores condições para a produção dos géis biopoliméricos mistos de IPS e diferentes polissacarídeos, obtidos a frio, diferentes formulações foram testadas. Assim como no caso dos géis de IPS, as estruturas resultantes foram analisadas subjetivamente e classificadas de acordo com o aspecto visual, utilizando-se os padrões ilustrados na Figura 30, para a construção de diagramas visuais. Fotos de todas as amostras classificadas como géis sustentáveis fortes encontram-se disponíveis nos Apêndices A, B, C e D.

6.4.1 Géis biopoliméricos mistos produzidos com isolado proteico de soja e goma xantana

6.4.1.1 Construção dos diagramas visuais

Os diagramas visuais obtidos a partir da avaliação das amostras produzidas com diferentes concentrações de IPS, goma xantana (GX), CaCl_2 e condições de pré-aquecimento, estão disponíveis nas Figuras 37 e 38.

Figura 37 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana, submetidas à pré-tratamento térmico a: 60 °C por 15 min (A); 60 °C por 30 min (B).

Fonte: Própria autoria.

Figura 38 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana, submetidas à pré-tratamento térmico a: 80 °C por 15 min (A); 80 °C por 30 min (B).

Fonte: Própria autoria.

Tais resultados mostraram que géis sustentáveis não foram obtidos a partir de sistemas com concentrações de 5 e 10 % de IPS, em nenhuma das condições testadas. Além disso, verificou-se que na concentração de 15 % de IPS, a formação de géis sustentáveis só foi possível a partir das formulações pré-aquecidas a 80 °C por 15 minutos, na presença de 0,1 % de GX, com concentrações de 5 e 15 mM de CaCl_2 (géis sustentáveis fracos) e a partir das formulações pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos, na presença de 0,1 % de GX e 5 mM de CaCl_2 (géis sustentáveis fortes).

Embora esses resultados sejam preliminares, eles permitiram a obtenção de informações importantes a respeito da influência das condições de pré-aquecimento e das concentrações de proteína, sal e GX nas características dos sistemas mistos em questão.

Inicialmente, a formação de géis sustentáveis fracos em sistemas pré-aquecidos a 80 °C por 15 minutos indicou que a GX apresentou uma importante contribuição na estabilização e no processo de formação das estruturas gelificadas, uma vez que, sistemas produzidos com as mesmas formulações, porém na ausência desse polissacarídeo, foram anteriormente classificados como géis não sustentáveis, como verificado na Figura 32(A).

Além disso, assim como nos casos de géis de IPS, as diferentes estruturas obtidas a partir de sistemas pré-aquecidos a 80 °C durante 15 e 30 minutos, refletiram a importância do maior grau de exposição dos grupos reativos da proteína, para a formação de géis sustentáveis fortes (PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994; PETRUCCELLI; AÑÓN, 1995; WANG et al. 2014).

Os resultados obtidos indicaram também que o aumento da concentração de IPS para 15 % foi fundamental para o aumento das interações hidrodinâmicas entre as moléculas de proteína, que possibilitaram a formação de géis sustentáveis fortes, na presença de 0,1 % de GX e 5 mM de CaCl_2 (BERTRAND; TURGEON, 2007; JONG; VAN DE VELDE, 2007; JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009).

Embora a presença de GX tenha sido interessante para a formação de géis, como citado anteriormente, aumentos na concentração deste polissacarídeo mostraram-se prejudiciais ao processo de gelificação, refletindo a complexidade dos sistemas mistos formados.

Segundo a literatura, em tais sistemas, o equilíbrio entre os processos de formação de géis e separação de fases pode resultar em efeitos sinérgicos, que ocorrem quando a adição de polissacarídeos reforça as estruturas proteicas, ou efeitos antagônicos, que ocorrem quando os sistemas são termodinamicamente incompatíveis (JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009). A incompatibilidade termodinâmica, por sua vez, é considerada uma força motriz para o processo de separação de fases, que pode levar à redução das interações entre os

aglomerados proteicos e, conseqüentemente, dificultar ou impedir a formação de géis (TURGEON et al., 2003).

Nesse contexto, compreende-se que a presença de excessos de GX em sistemas mistos (no presente trabalho, concentrações superiores a 0,1 % GX) pode levar a uma redução das interações proteína-proteína e um enfraquecimento da rede tridimensional, uma vez que a proporção ocupada pela goma na estrutura torna-se muito grande, e não permite o equilíbrio sinérgico entre os processos de gelificação dos agregados de proteína e de separação de fases entre agregados proteicos e moléculas de polissacarídeos (CHANG et al., 2014; JONG; KLOK; VAN DE VELDE, 2009).

De acordo com Jong e van de Velde (2007), para géis formados a partir de cadeias de proteínas agregadas, as propriedades dos sistemas dependem do número de ligações efetivas entre os agregados, que é amplamente afetado pelo processo de separação de fases. Em seu trabalho, estes autores verificaram que, dependendo das características dos biopolímeros, aumentos das concentrações de polissacarídeos em géis mistos podem levar à diminuição do número de ligações efetivas e, até mesmo, a inversões de fases, com formações de sistemas com polissacarídeos como fase contínua, ou de redes descontínuas de proteínas, sem ligações eficazes e com aspectos líquidos.

Além da importância da adequada seleção da concentração de IPS, GX e condição de pré-tratamento térmico, os resultados disponíveis na Figura 38(B) evidenciaram a importância da concentração de CaCl_2 para a formação de géis sustentáveis. Como esperado, mesmo em sistemas com elevadas concentrações de IPS, géis sustentáveis não foram obtidos na ausência de sal. De acordo com Vilela, Cavallieri e Cunha (2011), a concentração proteica durante a etapa de pré-aquecimento, no processo de gelificação a frio, deve ser inferior ao valor crítico que leva à formação de uma rede tridimensional, permitindo que os processos de desnaturação e agregação ocorram separadamente do processo de gelificação, que, no presente caso, foi induzido pela adição de CaCl_2 (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998).

Os resultados mostraram que a presença de 5 mM de sal, em sistemas com 15 % de IPS, pré-aquecidos a 80 °C por 30 minutos e na presença de 0,1 % de GX, foi importante para a produção de géis sustentáveis, uma vez que o íon Ca^{2+} neutralizou as repulsões eletrostáticas entre as moléculas e formou pontes salinas entre os agregados protéicos (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998; MALTAIS; REMONDETTO; SUBIRADE, 2008). Por outro lado, o aumento da concentração de CaCl_2 , nas mesmas condições, foi prejudicial ao processo de gelificação. Como citado anteriormente, as estruturas formadas durante o processo de gelificação de sistemas mistos resultam da competição entre os processos de gelificação e

separação de fases, ambos muito afetados pela taxa de gelificação e neutralização das repulsões eletrostáticas entre as moléculas (JONG; VAN DE VELDE, 2007; JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009; VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011). Neste contexto, enquanto adições de baixas concentrações de sal podem resultar em alterações menores e mais lentas das repulsões entre os agregados, permitindo o desenvolvimento de estruturas organizadas e reduzindo processos de separações de fases, o excesso de sal nos sistemas pode aumentar tais processos, levando ao enfraquecimento dos géis mistos, conforme verificado no presente trabalho, em sistemas com 15 mM de CaCl_2 (JONG; VAN DE VELDE, 2007; JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009; VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011; BERTRAND; TURGEON, 2007).

6.4.1.2 Perfil de textura e capacidade de retenção de água

Assim como no caso dos géis de IPS obtidos a frio (item 6.3.1), os sistemas produzidos com IPS e goma xantana, classificados como géis sustentáveis (fortes ou fracos), foram submetidos a caracterizações, por meio de análises de perfil de textura e determinações da capacidade de retenção de água, para a adequada escolha das melhores condições de produção dos géis biopoliméricos mistos.

Os resultados de TPA e CRA dos géis biopoliméricos mistos, produzidos em pH 7 com 15 % IPS (m/v) e 0,1 % GX (m/v), com diferentes concentrações de CaCl_2 e condições de pré-aquecimento, estão disponíveis nas Figuras 39 e 40, respectivamente.

A partir da análise dos resultados de TPA das amostras pré-aquecidas a 80 °C por 15 minutos, verificou-se que o aumento da concentração de CaCl_2 resultou em um aumento significativo ($p < 0,05$) da dureza, elasticidade e coesividade dos sistemas formados. Tais efeitos podem estar possivelmente relacionados à redução mais rápida da repulsão eletrostática e ao aumento das pontes salinas entre as moléculas de proteína, em sistemas com maiores concentrações de sal, que reduzem o tempo disponível para os rearranjos estruturais que levam à separação de fases e, conseqüentemente, à redução dos parâmetros de textura analisados.

Além disso, outro efeito observado com o aumento da concentração de CaCl_2 , nas amostras pré-aquecidas a 80 °C por 15 minutos, foi o aumento significativo ($p < 0,05$) da CRA dos sistemas. Resultado semelhante foi observado por Braga et al. (2006), que estudaram o efeito da adição de sal (KCl) em géis de isolado proteico de soja obtidos por indução térmica. Segundo esses autores, em sistemas com baixa concentração de GX (0,05%) a adição de 0,01M de KCl aumentou a CRA dos géis, enquanto a adição de 0,27 M de sal reduziu tal

parâmetro. Por outro lado, os autores verificaram que em maior concentração de GX, não houve um aumento inicial de CRA com a adição de sal, o que foi explicado pela intensificação do efeito do soluto.

Embora tais sistemas tenham apresentado aspecto de géis sustentáveis, as amostras submetidas ao pré-aquecimento a 80 °C por 15 minutos foram classificadas como géis fracos e apresentaram maior instabilidade se comparados aos sistemas produzidos com pré-aquecimento a 80 °C por 30 minutos, apresentando aspectos de géis não sustentáveis após poucos minutos a temperatura ambiente.

Amostras submetidas a 80 °C por 30 minutos apresentaram valores de dureza, elasticidade, coesividade e CRA significativamente maiores ($p < 0,05$) que aquelas produzidas com mesma concentração de sal (5 mM) e pré-aquecidas durante 15 minutos. Tais resultados podem ser explicados pela maior exposição dos grupos reativos das moléculas de proteína em amostras submetidas a aquecimento por um período mais longo. Nessas condições, o equilíbrio entre os processos de formação de gel e separação de fases foi, possivelmente, mais adequado, e permitiu a formação de sistemas mais fortes.

Além disso, a partir da comparação dos resultados de TPA e CRA dos géis produzidos em pH 7, com 15 % (m/v) de IPS, 5 mM de CaCl_2 , 0,1 % (m/v) de GX e pré-aquecidos a 80 °C por 30 minutos, e dos géis produzidos nessas mesmas condições, porém na ausência de GX (Figura 33), verificou-se que a adição deste polissacarídeo resultou em um aumento da dureza, da elasticidade, da coesividade e da CRA dos sistemas formados, indicando uma melhoria das propriedades funcionais do IPS.

O aumento da CRA dos sistemas com a adição de GX está possivelmente relacionado à elevada capacidade desse polissacarídeo de aprisionar moléculas de água, o que, segundo Sánchez et al. (1995), está relacionado à organização das suas cadeias laterais de carácter aniônico.

Frente a esses resultados, a formulação escolhida para a produção de géis biopoliméricos mistos de IPS e goma xantana, e para o desenvolvimento do presente estudo, foi aquela com 15 % (m/v) de IPS, 0,1 % (m/v) de GX e 5 mM de CaCl_2 , pré-aquecida a 80 °C por 30 minutos (formulação G2), uma vez que os sistemas obtidos nestas condições apresentaram estruturas aparentemente mais fortes, com resultados satisfatórios de perfil de textura e CRA.

Figura 39 Resultados da análise de perfil de textura das amostras com pH 7, 15% IPS (m/v) e 0,1% GX (m/v) analisadas quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em um mesmo atributo diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Figura 40 CRA das amostras de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma xantana, com diferentes concentrações de CaCl_2 e condições de pré-aquecimento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.

Fonte: Própria autoria.

6.4.2 Géis biopoliméricos mistos produzidos com isolado proteico de soja e goma locusta

6.4.2.1 Construção dos diagramas visuais

Além da goma xantana, goma locusta também foi utilizada para a produção de géis biopoliméricos mistos com IPS. Os diagramas visuais obtidos a partir da avaliação das amostras produzidas com diferentes concentrações de IPS, goma locusta (GL), CaCl_2 e condições de pré-aquecimento, estão disponíveis nas Figuras 41 e 42. Tais resultados

mostraram que géis sustentáveis só puderam ser obtidos a partir de amostras com 15 % de IPS, na presença de CaCl_2 e pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos.

Figura 41 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta, submetidas à pré-tratamento térmico a: 60 °C por 15 min (A); 60 °C por 30 min (B).

Fonte: Própria autoria.

Figura 42 Diagramas visuais das diferentes formulações utilizadas para a produção a frio de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta, submetidas à pré-tratamento térmico a: 80 °C por 15 min (A); 80 °C por 30 min (B).

Assim como nos casos das amostras contendo apenas IPS (item 6.3.1) e nos sistemas mistos de IPS e GX (item 6.4.1.1), a temperatura de pré-aquecimento de 60 °C não foi suficiente para a formação de géis sustentáveis de IPS e GL, a partir da adição de CaCl₂. Neste caso, porém, a importância do pré-aquecimento a 80 °C não é justificada apenas pela necessidade do aumento no grau de exposição de grupos reativos das proteínas, mas também pelas características de solubilidade do polissacarídeo em questão.

A GL apresenta baixa solubilidade à temperatura ambiente, devido ao seu elevado peso molecular e, principalmente, à sua razão manose:galactose (BARAK; MUDGIL, 2014; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). Segundo Sánchez et al. (1995), devido ao baixo grau de substituição de galactose na cadeia manose, o grau de interações entre as cadeias adjacentes das moléculas de GL é elevado, levando à formação de regiões cristalinas que dificultam a dispersão deste polissacarídeo em água. Por outro lado, tais regiões cristalinas são rompidas quando a GL é aquecida a 80 °C por 30 minutos, permitindo um aumento da solubilidade deste composto (BARAK; MUDGIL, 2014; SÁNCHEZ et al., 1995; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

Além disso, os resultados apresentados da Figura 42 mostraram que géis sustentáveis fortes só foram obtidos em concentrações iguais ou superiores a 0,2 % de GL, indicando que, possivelmente, em concentrações inferiores de polissacarídeo, os diferentes biopolímeros apresentaram interações antagônicas. Segundo Sánchez et al. (1995), antagonismos observados entre IPS e GL, em sistemas com pH neutro e baixas concentrações de polissacarídeo, são justificados pela formação de complexos, resultantes de interações eletrostáticas fracas entre os biopolímeros, que levam a uma redução da solubilidade e da capacidade de retenção de água das proteínas, bem como da viscosidade dos sistemas. Por outro lado, em elevadas concentrações de GL, o aumento das ligações de hidrogênio entre as moléculas supera o efeito antagônico discutido, fazendo com que os sistemas aprisionem elevado conteúdo de água e apresentem elevada viscosidade.

Semelhantemente, em seu estudo, Hua, Cui e Wang (2003) verificaram que a adição de baixas concentrações de GL em sistemas mistos com IPS resultou na formação de géis com rigidez reduzida, o que, segundo os autores, pode ser explicado pela baixa concentração efetiva de polissacarídeos, resultante de *demixing* incompleto entre as fases.

Como discutido anteriormente, é amplamente aceito que a taxa de gelificação e neutralização das repulsões eletrostáticas entre as moléculas tem grande influência no resultado da competição entre os processos de gelificação e separação de fases em géis biopoliméricos mistos (JONG; VAN DE VELDE, 2007; JONG; JAN KLOK; VAN DE

VELDE, 2009; VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011), porém sabe-se que a ocorrência e a extensão de tais processos dependem de muitos outros fatores, intrínsecos e extrínsecos (TAVARES et al., 2005). Os resultados disponíveis nas Figuras 38(B) e 42(B), por exemplo, mostraram que os efeitos das adições de diferentes concentrações de CaCl_2 nos sistemas produzidos com IPS e GL foram diferentes daqueles verificados em sistemas produzidos com IPS e GX, evidenciando a influência das diferentes propriedades dos polissacarídeos no comportamento dos sistemas mistos.

No caso dos géis de IPS e GL, a adição de 5 e 15 mM de CaCl_2 em sistemas pré-aquecidos a 80 °C por 30 minutos, em pH 7, com 15 % de IPS e concentrações de GL superiores a 0,2 % (m/v), resultaram na formação de géis sustentáveis fortes, mostrando que em nenhum dos casos, o sal estava em excesso. Nesse contexto, as análises de TPA e CRA fizeram-se ainda mais necessárias para a escolha da formulação mais adequada para a produção dos géis mistos de IPS e GL e para o desenvolvimento do estudo comparativo aprofundado entre os diferentes sistemas propostos neste trabalho.

6.4.2.2 Perfil de textura e capacidade de retenção de água

Os resultados de perfil de textura dos sistemas classificados como géis sustentáveis estão disponíveis da Figura 43. Tais resultados permitiram a avaliação dos efeitos do aumento da concentração de sal em sistemas com mesma concentração de GL, e também dos efeitos do aumento da concentração de GL em sistemas com mesma concentração de sal. Inicialmente, a partir da análise dos resultados de sistemas produzidos com 5 mM de CaCl_2 , verificou-se que o aumento da concentração de GL para 0,3 % (m/v) resultou em uma redução significativa ($p < 0,05$) na dureza e na elasticidade dos géis. Por outro lado, variações na concentração de GL para sistemas produzidos com 15 mM de CaCl_2 , não levaram a alterações significativas ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros analisados.

Em sistemas com 5 mM de sal, a diminuição da dureza e da elasticidade dos géis com a adição de 0,3 % (m/v) de GL pode ser explicada pela redução das interações proteína-proteína, resultante do excesso de polissacarídeo, que não permite o equilíbrio sinérgico entre os processos de gelificação dos agregados proteicos e de separação de fases (JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009). Por outro lado, em sistemas com 15 mM de CaCl_2 , a maior concentração de sal permitiu, possivelmente, uma rápida redução da repulsão eletrostática entre as moléculas e também um aumento das interações proteína-proteína, que reduziram o efeito da concentração de GL no processo de separação de fases e, consequentemente, nas propriedades de textura dos géis formados.

Por meio da avaliação de amostras com mesma concentração de GL e diferentes concentrações de sal, verificou-se que, em sistemas com 0,1 e 0,3 % (m/v) de polissacarídeo, o aumento na concentração de CaCl_2 alterou significativamente ($p < 0,05$) a dureza dos sistemas, porém, em sistemas com 0,2 % (m/v) de GL, alterações na concentração de sal não afetaram significativamente nenhum dos parâmetros analisados. Esses resultados indicaram que na concentração de 0,2 % (m/v), o processo de separação de fases e o volume ocupado pelo polissacarídeo na estrutura formada não prejudicaram as interações proteína-proteína necessárias para a formação adequada dos géis, independentemente da concentração de CaCl_2 aplicada.

A partir dos resultados de CRA dos géis biopoliméricos mistos produzidos com GL, disponíveis da Figura 44, verificou-se que as alterações de concentração de GL e de CaCl_2 não alteraram significativamente ($p > 0,05$) a CRA das amostras.

Por meio da comparação dos resultados de TPA (Figura 33) e CRA (Figura 36A) dos géis produzidos na ausência e na presença de GL, verificou-se que a adição deste polissacarídeo resultou em um aumento da dureza e da CRA dos sistemas formados, também indicando uma possível melhoria das propriedades funcionais do IPS. Segundo a literatura, a presença de GL pode levar ao aumento da CRA dos géis devido à grande capacidade deste polissacarídeo de formar ligações de hidrogênio com água (MA et al., 2012). Além disso, os resultados mostraram também que a presença de GL minimizou o efeito das diferentes concentrações de sal nos parâmetros de textura e CRA analisados. Estes resultados estão possivelmente relacionados ao fato de que a estrutura do polissacarídeo em questão não é muito sensível a alterações de força iônica do meio (BARAK; MUDGIL, 2014; MA et al., 2012).

Dentre as formulações de géis biopoliméricos mistos de IPS e goma locusta, a formulação escolhida para a continuação do presente estudo foi aquela com 15 % (m/v) de IPS, 0,2 % (m/v) de GL e 15 mM de sal (formulação G3), pré-aquecida a 80 °C por 30 minutos, uma vez que os sistemas produzidos nessas condições apresentaram aparência mais forte, características de perfil de textura e CRA satisfatórias, e, principalmente, maior estabilidade em temperatura ambiente, que as demais.

Figura 43 Resultados da análise de perfil de textura dos géis produzidos com pH 7, 15% IPS (m/v), submetidos a 80 °C/30 min. e diferentes concentrações de GL e CaCl₂, analisados quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.

Fonte: Própria autoria.

Figura 44 CRA das amostras de géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e goma locusta, com diferentes concentrações de CaCl₂ e condições de pré-aquecimento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes concentrações de sal. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma concentração de sal.

Fonte: Própria autoria.

6.5 DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO A FRIO DOS GÉIS BIOPOLIMÉRICOS MISTOS CARREGADOS COM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Como discutido anteriormente, a partir dos diagramas visuais e dos resultados das caracterizações preliminares (avaliações de perfil de textura e da CRA) dos géis de isolado proteico de soja, obtidos a frio, na presença e na ausência de polissacarídeos, três formulações (Tabela 6) foram escolhidas para a produção de géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas.

Sabe-se que géis carregados são sistemas complexos, cujas propriedades dependem de diversos fatores, tais como as características da fase lipídica dispersa, dos tensoativos utilizados e da matriz gelificada (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013; SALA et al, 2008; SALA et al., 2009a; SALA et al., 2009b, VAN AKEN; OLIVER; SCHOLTEN, 2015). Segundo a literatura, dependendo da característica dos diferentes componentes e da concentração lipídica, a adição de gotículas lipídicas (ou, no presente caso, partículas lipídicas sólidas) pode prejudicar ou facilitar a formação das redes gelificadas, além de aumentar ou diminuir o módulo elástico dos sistemas formados (SALA et al., 2007; VAN VLIET, 1988; SALA et al., 2009b). Nesse contexto, para a determinação das melhores condições para a produção de géis carregados, com formulações G1 (pH 7, pré-aquecida a 80 °C/30 min., 15% IPS, 10 mM CaCl₂, na ausência de polissacarídeos), formulação G2 (pH 7, pré-aquecida a 80 °C/30 min., 15% IPS, 0,1% GX e 5 mM de CaCl₂) e formulação G3 (pH 7, pré-aquecida a 80 °C/30 min., 15% IPS, 0,2% GL e 15 mM CaCl₂), diferentes quantidades da água utilizada para hidratar o isolado proteico de soja, na primeira etapa do processo de produção dos géis, foram substituídas por dispersões de MLS. Os resultados obtidos a partir da avaliação visual dos géis carregados produzidos com diferentes concentrações de MLS estão disponíveis na Figura 45.

Figura 45 Avaliação do efeito das diferentes proporções de substituição da água por dispersões de MLS nas formulações de géis de IPS (G1) e géis biopoliméricos mistos de IPS com GX (G2) e com GL (G3).

Fonte: Própria autoria.

Tais resultados mostraram que em sistemas com formulação G1, a substituição de 25 % da água por dispersão de MLS resultou na formação de géis sustentáveis fracos, enquanto as

substituições de 50, 75 e 100 % da água, resultaram na formação de géis sustentáveis fortes. Os sistemas produzidos com 100 % de substituição, por outro lado, apresentaram maior instabilidade, adquirindo aspectos de géis sustentáveis fracos em menos de 10 minutos a temperatura ambiente.

Já para a formulação G2, géis sustentáveis fortes foram obtidos apenas com 75 % de substituição, enquanto para a G3, estes foram obtidos apenas com 50 e 75 % de substituição. Para ambas as formulações, substituições de 25 % e 100 % da água por dispersão de MLS enfraqueceram as estruturas dos sistemas, que foram classificados, como géis não sustentáveis e géis sustentáveis fracos, respectivamente. Os aspectos visuais dos sistemas carregados com MLS estão ilustrados na Figura 46.

Figura 46 Aspectos visuais dos géis carregados produzidos a partir da substituição diferentes proporções (25%, 50%, 75% e 100%) de água por dispersão de MLS em sistemas com formulações G1 (A), G2 (B) e G3 (C).

Fonte: Própria autoria.

Assim como no caso dos géis não-carregados, os diferentes géis carregados foram submetidos a caracterizações preliminares, por meio de testes para a determinação do perfil de textura e também da capacidade de retenção de água dos sistemas.

No presente estudo, as análises de perfil de textura mostraram-se interessantes por permitirem uma comparação inicial entre os diversos sistemas, como por exemplo, entre os géis de IPS e os géis biopoliméricos mistos, como discutido no item 6.3, e entre os géis carregados e não-carregados com MLS. Os resultados de TPA dos géis com formulações G1, G2 e G3, carregados com diferentes proporções de MLS, estão disponíveis na Figura 47.

Figura 47 Resultados da análise de perfil de textura dos géis carregados com MLS, a partir da substituição de diferentes proporções de água por dispersão de partículas, nas formulações G1, G2 e G3, quanto a: (A) dureza; (B) elasticidade; (C) coesividade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes substituições de água por MLS. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma substituição de água por MLS.

Fonte: Própria autoria.

Tais resultados mostraram que a adição de MLS nas amostras de formulação G1, aumentou significativamente ($p < 0,05$) a dureza, a elasticidade e a coesividade dos géis, indicando um fortalecimento das estruturas. A partir da comparação entre os diferentes géis carregados com formulação G1, verificou-se que, dentre as amostras analisadas, aquelas produzidas a partir de 50 e 75 % de substituição de água por MLS apresentaram maiores valores de dureza e elasticidade. Embora a coesividade dos géis de IPS com formulação G1, tenha aumentado com a adição de partículas, esse parâmetro não variou significativamente ($p > 0,05$) com as diferentes substituições.

Para as amostras com formulação G2, os parâmetros dureza e a elasticidade dos géis reduziram significativamente ($p < 0,05$) com a substituição de 50 % da água por dispersão de MLS, porém os sistemas produzidos com 75 e 100 % de substituição apresentaram valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$) de dureza, elasticidade e coesividade, se comparados aos géis não-carregados. Já os valores de coesividade dos géis de tal formulação não foram alterados significativamente ($p > 0,05$) com a adição de MLS.

A partir da análise dos géis de formulação G3, por outro lado, foi verificado que a adição de partículas alterou de maneira significativa ($p < 0,05$) a dureza e a coesividade das amostras. Os resultados mostraram um aumento significativo ($p < 0,05$) na dureza dos géis, com as substituições de 50 % e 75 %, e na coesividade dos mesmos, com substituições de 50 % e 100 % da água por MLS.

Por meio da comparação das diferentes formulações de géis carregados com MLS, verificou-se que, para todas as porcentagens de substituições testadas, as amostras com formulação G1 apresentaram valores de dureza significativamente maiores ($p < 0,05$) que as demais. Já os parâmetros elasticidade e coesividade das amostras produzidas com diferentes formulações, e mesma concentração de partículas, não diferiram tanto quanto a dureza. Apenas nas amostras com substituição de 50% da água por dispersão de MLS, foi verificado que os géis de formulação G2 apresentaram valores de elasticidade e coesividade significativamente inferiores ($p < 0,05$) que G1 e G3.

A comparação entre os géis não-carregados de diferentes formulações mostrou que a formulação G2 apresentou valores significativamente ($p < 0,05$) menores de coesividade que as formulações G1 e G3, porém, a formulação G1 apresentou valores de dureza e elasticidade inferiores ($p < 0,05$) às formulações G2 e G3, diferentemente dos géis carregados.

Além da avaliação das propriedades de textura dos géis carregados, a capacidade de retenção de água (CRA) dos géis com formulações G1, G2 e G3, carregados com diferentes

proporções de MLS também foi analisada e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 48. A partir desses resultados, verificou-se que os géis com formulações G1 e G3 apresentaram um aumento significativo na CRA ($p < 0,05$), com o aumento da porcentagem de substituição de água por dispersão de MLS. Já as amostras com formulação G2, carregadas com MLS, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) de CRA com o aumento da porcentagem de substituição. Porém, é importante ressaltar que o valor médio de CRA dos géis carregados produzidos com substituição de 100 % da água por dispersões de MLS foi pequeno e apresentou elevado desvio padrão. Esse resultado pode ser justificado pelas estruturas aparentemente mais fracas dos géis formados nessa condição. Além disso, a partir dos resultados de CRA das diferentes formulações com a mesma porcentagem de substituição, verificou-se que as médias obtidas não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

Figura 48 CRA dos géis carregados com MLS, a partir da substituição diferentes proporções de água por dispersão de partículas nas formulações G1, G2 e G3. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de mesma formulação com diferentes substituições de água por MLS. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes em, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para géis de formulações diferentes com mesma substituição de água por MLS.

Fonte: Própria autoria.

Embora os resultados disponíveis nas Figuras 45 a 48, não tenham sido suficientes para a compreensão de detalhes a respeito das propriedades e organizações estruturais dos géis carregados, tais dados indicaram que sistemas com características satisfatórias para o desenvolvimento do presente trabalho, foram obtidos por meio de substituições de 50 e 75 %

de água por dispersão de MLS, para sistemas como formulações G1 e G3, e a por meio da substituição de 75 % de água por dispersão de MLS, para sistemas com formulação G2.

Nesse contexto, e considerando-se o interesse na incorporação de elevadas quantidades de MLS aos sistemas, para a encapsulação da curcumina, a porcentagem de substituição de 75 % foi selecionada como a mais adequada para a produção de géis carregados e para o desenvolvimento do estudo comparativo das propriedades dos diferentes sistemas de interesse (géis carregados e não-carregados, com formulações G1, G2 e G3).

6.6 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS NÃO-CARREGADOS E CARREGADOS COM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PRODUZIDOS COM DIFERENTES FORMULAÇÕES: ESTUDO COMPARATIVO

Produtos alimentícios são geralmente considerados sistemas complexos, cujas propriedades dependem da distribuição e das interações entre componentes estruturais durante o processamento e estocagem (BERTRAND; TURGEON, 2007; DICKINSON, 2012). Nesse contexto, para o adequado desenvolvimento de novos produtos, com características estruturais e sensoriais interessantes, é necessário o desenvolvimento de estudos e caracterizações completas dos sistemas.

Considerando-se o interesse no desenvolvimento de géis carregados com MLS com características interessantes para a encapsulação de curcumina, os géis produzidos com formulações G1, G2 e G3, carregados e não-carregados com MLS, foram submetidos a diferentes análises para o estudo comparativo das propriedades dos sistemas.

6.6.1 Microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura

Aplicações combinadas de ensaios reológicos e técnicas de microscopia têm sido consideradas alternativas interessantes para a avaliação das propriedades de sistemas alimentícios complexos, visto que tais experimentos permitem a compreensão das características estruturais das amostras, bem como do comportamento das mesmas durante o processo de mastigação (ABHYANKAR; MULVIHILL; AUTY, 2014).

Sabe-se, por exemplo, que informações sobre as propriedades reológicas de géis, carregados e não-carregados, podem ser utilizadas como ferramentas analíticas para a obtenção de conhecimentos fundamentais a respeito da organização estrutural e das interações entre os componentes dos sistemas (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013), por outro lado, a interpretação de tais resultados é mais precisa e completa a partir da avaliação de

imagens de microscopia, que podem ser obtidas através da aplicação de diferentes técnicas, como a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Tais técnicas foram aplicadas no presente estudo para a caracterização e estudo comparativo dos diferentes géis, carregados e não-carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3, e os resultados estão disponíveis nas Figuras 49 a 54.

Figura 49 Resultados das análises de microscopia confocal de varredura a laser dos géis com formulação G1 não-carregado (A) e carregado (B).

Fonte: Própria autoria

Figura 50 Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos, de géis não-carregados (A, B, C) e carregados (D, E, F) produzidos com formulação G1

Fonte: Própria autoria.

Figura 51 Resultados das análises de microscopia confocal de varredura a laser dos géis com formulação G2 não-carregado (A) e carregado (B).

Fonte: Própria autoria

Figura 52 Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos, de géis não-carregados (A, B, C) e carregados (D, E, F) produzidos com formulação G2.

Fonte: Própria autoria.

Figura 53 Resultados das análises de microscopia confocal de varredura a laser dos géis com formulação G3 não-carregado (A) e carregado (B).

Fonte: Própria autoria

Figura 54 Resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos, de géis não-carregados (A, B, C) e carregados (D, E, F) produzidos com formulação G3

Fonte: Própria autoria.

Inicialmente, a comparação entre as imagens dos géis não-carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3, permitiu a avaliação dos efeitos das adições dos diferentes polissacarídeos nas organizações estruturais dos géis de IPS obtidos a frio. Como discutido anteriormente, as estruturas formadas durante o processo de gelificação de sistemas biopoliméricos mistos, resultam da competição entre os processos de gelificação e de

separação de fases, ambos muito afetados pelas taxas de gelificação e neutralização de cargas (JONG; VAN DE VELDE, 2007; VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011). Neste contexto, sabe-se que, dependendo das características do processo de gelificação aplicado, da densidade de carga do polissacarídeo e das condições do meio, géis biopoliméricos mistos podem se organizar em redes interpenetrantes, redes conjugadas ou sistemas com separação de fases (MORRIS, 1997; JONG; VAN DE VELDE, 2007). Tais organizações estruturais são geralmente identificadas através de resultados de MCVL (CHANG et al., 2014; MONTEIRO et al., 2013; ROCHA et al., 2009; TAVARES et al., 2005). No presente estudo, os resultados de MCVL estão mostrados nas Figuras 49, 51 e 53, e nelas, as estruturas formadas pelo IPS, pelos polissacarídeos e MLS, foram identificadas, respectivamente, pelas cores vermelho escuro, verde-amarelado e vermelho claro.

Como verificado nas Figuras 49 (A), 50(A), 50(B) e 50(C), os géis não-carregados, produzidos com IPS, na ausência de polissacarídeos (formulação G1), apresentaram estruturas homogêneas, com poros relativamente grandes e com aspecto fibroso.

Por outro lado, a partir dos resultados disponíveis nas Figuras 51(A), 52(A), 52(B) e 52(C), verificou-se que a adição de GX alterou a estrutura dos sistemas, deixando-a menos homogênea. Além disso, como verificado nas imagens de MCVL (Figura 51A), tais sistemas não apresentaram separação de fases. Esse resultado foi evidenciado pelas imagens de MEV, disponíveis nas Figuras 52(A), 52(B) e 52(C), as quais mostraram que os géis mistos em questão apresentavam uma matriz densa e com pequenos poros. Embora muitos autores identifiquem a organização verificada nesses sistemas como redes interpenetrantes, este termo pode não ser completamente apropriado, considerando-se as propriedades não-gelificantes da GX (MORRIS, 1997; SAHA; BHATTACHARYA, 2010). Neste caso, a matriz gelificada foi formada pelo IPS e, durante o processo de gelificação, as moléculas de GX foram capazes de penetrar e se acomodar dentro da estrutura, estabilizando-a e tornando a rede mais densa, mas não formando outra matriz gelificada.

Chang et al. (2014) também estudaram a influência da adição de GX nas propriedades e características de géis não-carregados de IPS, e verificaram que as estruturas formadas a partir dos sistemas contendo apenas o isolado eram mais homogêneas que aquelas formadas na presença de GX. Por outro lado, esses autores observaram separação de fases nos géis mistos. Tal diferença entre os resultados obtidos no presente estudo e aqueles obtidos por Chang et al. (2014) pode ter sido ocasionada pelas características e concentrações dos isolados proteicos utilizados, e também pelas diferentes metodologias adotadas para a obtenção dos géis, uma vez que os autores utilizaram método de gelificação por acidificação.

De forma semelhante à adição de GX (formulação G2), a adição de GL para a produção de géis não-carregados com formulação G3, também acarretou na formação de sistemas com estruturas menos homogêneas que aquelas verificadas em géis com formulação G1. Porém, em tais sistemas, foram verificadas separações de fases entre o IPS e a GL, identificadas, respectivamente, pelas regiões avermelhadas e esverdeadas nas imagens de MCVL (Figura 53A). O acúmulo de GL em algumas regiões da rede de IPS também foi verificado nas imagens de MEV, disponíveis nas Figuras 54(A), 54(B) e 54(C).

Segundo Rocha et al. (2009), que estudaram a influência da adição de GL em géis de hidrolisados e concentrados proteicos de soro de leite, a incorporação deste polissacarídeo em géis de proteínas resulta em sistemas com separação de fases devido à incompatibilidade termodinâmica entre os compostos. Semelhantemente, Monteiro et al. (2013) estudaram a influência da adição de diferentes galactomananas (goma locusta, goma guar - GG e goma tara - GT) nas propriedades reológicas e estruturais de géis de IPS obtido por indução térmica, e observaram que a presença desses polissacarídeos resultou na formação de sistemas com separação de fases, e que a morfologia dos mesmos foi afetada pelo tipo de polissacarídeo utilizado (i.e., razão M/G da galactomanana).

Embora se saiba que a incompatibilidade termodinâmica entre compostos depende das características dos biopolímeros (por exemplo, peso molecular, conformação estrutural, etc), das condições do meio (por exemplo, pH, força iônica, qualidade do solvente, etc), e das condições e procedimentos de mistura (concentrações, temperatura, etc), diversos autores afirmam, de maneira generalizada, que sistemas produzidos com polissacarídeos neutros e proteínas apresentam separações de fases, devido à baixa entropia de mistura e fenômenos de segregação (MONTEIRO et al., 2013; TURGEON et al., 2003). Ainda, segundo Turgeon et al. (2003), nesses casos, separações de fases ocorrem por decomposição espinodal e não por nucleação e crescimento. Enquanto a separação de fases por nucleação e crescimento resulta na formação de gotas esféricas dispersas na fase contínua, a decomposição espinodal forma estruturas tridimensionais interconectadas, originando sistemas classificados como bicontínuos.

De fato, os resultados obtidos no presente trabalho e disponíveis nas Figuras 53(A), 54(A), 54(B) e 54(C), mostraram que os géis não-carregados produzidos com IPS e GL apresentaram separação de fases com características de sistemas bicontínuos, semelhantes aos obtidos por Monteiro et al. (2013). Por outro lado, esses autores verificaram que enquanto géis produzidos com IPS e GL apresentaram características de sistemas bicontínuos, géis com GG e GT apresentaram gotículas esféricas em sua estrutura, possivelmente formadas por

nucleação e crescimento. Esses diferentes resultados evidenciam a importância do estudo individual de sistemas específicos e as implicações das generalizações sobre o comportamento de sistemas tão complexos quanto os géis biopoliméricos mistos.

No presente trabalho, as diferenças entre as características dos géis mistos não-carregados, com formulações G2 e G3, podem ser justificadas pelas propriedades dos polissacarídeos, e também pelos diferentes métodos de adição dos mesmos no processo de obtenção dos géis. Embora em ambos os casos os polissacarídeos tenham sido adicionados antes da adição de CaCl_2 , o que, segundo a literatura, é um pré-requisito para a produção de géis biopoliméricos mistos obtidos a frio (JONG; JAN KLOK; VAN DE VELDE, 2009), a GL foi adicionada aos sistemas antes do processo de pré-aquecimento, enquanto a GX foi adicionada após o resfriamento das amostras. Tal diferença entre as metodologias utilizadas para a produção dos géis é justificada, principalmente, pelas características de solubilidade dos polissacarídeos. Enquanto a GX forma soluções de elevada viscosidade em baixas concentrações, independente das condições de temperatura e pH utilizadas, a GL apresenta baixa solubilidade em temperatura ambiente, e alcança aproximadamente 85 % de solubilidade quando aquecida a 80 °C por 30 minutos – condição de pré-tratamento térmico utilizado para a produção dos sistemas com formulações G1, G2 e G3 (BARAK; MUDGIL, 2014; DAKIA et al., 2008; RODRÍGUEZ-HERNANDEZ; TECANTE, 1999).

Como discutido anteriormente, o fenômeno de separação de fases entre diferentes biopolímeros pode ser considerado um processo de natureza cinética, que depende das relativas taxas de separação e formação de gel (TAVARES et al., 2005). Segundo Turgeon et al. (2003), conhecimentos a respeito desses dois processos são essenciais, uma vez que a gelificação de pelo menos um dos biopolímeros tende a “congelar” (ou reduzir a velocidade) o processo de separação de fases. Nesse contexto, a partir da análise dos resultados do presente trabalho, pode-se afirmar que os diferentes tempos disponíveis para interações entre os biopolímeros antes da adição de CaCl_2 estão diretamente relacionados à formação de estruturas distintas nos géis não-carregados, com formulações G2 e G3. Enquanto o processo de gelificação dos sistemas com formulação G2 foi iniciado poucos minutos após a adição de GX, disponibilizando um curto período para o desenvolvimento de interações repulsivas entre as fases, ele foi iniciado aproximadamente 45 min após a adição de GL (30 minutos de pré-aquecimento e aproximadamente 15 min para resfriamento total das amostras), disponibilizando, assim, mais tempo para interações repulsivas e separações de fases entre as fases ricas em GL e ricas em IPS.

Além do estudo dos efeitos da adição de diferentes polissacarídeos na estrutura dos géis de IPS obtidos a frio, os resultados de MCVL e MEV também permitiram a avaliação dos efeitos da incorporação de MLS nas características estruturais dos géis produzidos com as diferentes formulações.

A partir da comparação dos sistemas produzidos com formulação G1, carregados (Figuras 49B, 50D, 50E e 50F) e não-carregados (Figuras 49A, 50A, 50B e 50C), verificou-se que a incorporação de MLS resultou na formação de matrizes menos homogêneas e com poros de diferentes tamanhos. Além disso, como verificado nas imagens de MEV (Figura 50D, 50E e 50F), as MLS estavam bem distribuídas na estrutura dos géis carregados. Essas observações são fundamentais para a compreensão das propriedades mecânicas e reológicas desses sistemas, uma vez que, segundo a literatura, tais propriedades podem ser muito afetadas por fatores como distribuições heterogêneas de partículas, que podem ocorrer devido à agregação ou ao acúmulo das mesmas em regiões mais densas dos géis carregados (VAN AKEN; OLIVER; SCHOLTEN, 2015).

Em amostras com formulação G2, por outro lado, foi verificado que a adição de MLS alterou a organização estrutural dos sistemas, tornando evidente a separação de fases entre a rede formada pelo IPS e as estruturas formadas pela GX, identificadas na Figura 51(B) pelas cores vermelho escuro e verde-amarelado, respectivamente. Tais resultados indicaram, por tanto, que a adição de MLS resultou em um aumento da incompatibilidade termodinâmica e, conseqüentemente, da repulsão entre as moléculas dos diferentes biopolímeros.

Organizações estruturais heterogêneas, características de géis com separação de fases, também foram verificadas a partir dos resultados de MEV (Figuras 52D, 52E e 52F) dos géis carregados, com formulação G2. Essas imagens também mostraram que, assim como nos géis carregados de formulação G1, em sistemas mistos de IPS e GX, as MLS encontravam-se bem distribuídas ao longo da matriz biopolimérica.

Como discutido anteriormente, géis não-carregados produzidos com formulação G3 já apresentavam microestrutura com separação de fases, porém, os resultados de MCVL (Figura 53B) dos géis carregados, com tal formulação, mostraram que a adição de MLS aumentou a incompatibilidade termodinâmica entre os diferentes componentes dos sistemas, tornando mais evidente a separação de fases entre a fase proteica (região avermelhada) e a fase polissacarídica (região esverdeada).

Áreas com características estruturais distintas também foram verificadas nas imagens de MEV (Figuras 54D, 54E e 54F) dos géis carregados, produzidos com IPS e GL. A partir dessas imagens verificou-se que as regiões sem partículas eram aparentemente mais densas

que as regiões ao redor das MLS, indicando que a presença das partículas possivelmente afetou o processo de formação dos géis. Assim, além do aumento da incompatibilidade termodinâmica entre os diferentes biopolímeros, que resultou em um processo de separação de fases mais acelerado, a incorporação de MLS possivelmente alterou a taxa de gelificação do IPS, afetando o balanço entre os dois processos, que como discutido anteriormente, influenciam diretamente na organização estrutural dos sistemas obtidos. Essa teoria poderia ser avaliada, por exemplo, por meio de ensaios reológicos de varredura de tempo, que são comumente aplicados para o estudo da cinética de gelificação de diferentes sistemas. Porém, para a aplicação deste teste, as amostras deveriam ser colocadas no reômetro imediatamente após a adição do CaCl_2 para o monitoramento dos parâmetros G' e G'' (CAVALLIERI; CUNHA, 2008; ALTING et al., 2003), o que não é possível no presente estudo. Considerando-se o perfil de solubilidade e a necessidade de produção dos sistemas em pH 7, conforme discutido anteriormente, a etapa de reajuste de pH após a adição de CaCl_2 é fundamental. Nesse contexto, como a neutralização da repulsão eletrostática entre as macromoléculas começa imediatamente após a adição de sal, informações importantes sobre a cinética de gelificação dos sistemas seriam perdidas. Além disso, o tempo necessário para o reajuste do pH varia, tornando impossível a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis a partir de testes de varredura de tempo.

Além dos resultados discutidos anteriormente, as Figuras 54(D), 54(E) e 54(F) mostraram que, de forma semelhante aos géis carregados com formulações G1 e G2, em sistemas com formulação G3, as partículas também se encontravam bem distribuídas ao longo da matriz.

Embora a microscopia confocal de varredura a laser tenha se mostrado uma técnica interessante para a avaliação da organização estrutural dos géis carregados e não-carregados (especialmente no caso dos sistemas mistos), informações detalhadas sobre as propriedades estruturais das matrizes e também sobre as características e distribuições das MLS nos géis carregados só foram obtidas a partir dos resultados de microscopia eletrônica de varredura. Tais resultados mostraram, portanto, que, devido à complexidade dos sistemas, a aplicação combinada das duas técnicas em questão foi fundamental para a adequada caracterização dos géis no presente estudo.

6.6.2 Ensaios de varredura de deformação e varredura da frequência

Características reológicas dos sistemas alimentícios são fundamentais para a compreensão de aspectos relacionados à aceitabilidade, ao processamento e às condições de

manipulação dos produtos. As análises reológicas são utilizadas como ferramentas para a caracterização física das matérias-primas, dos produtos intermediários e também dos alimentos acabados. Nesse contexto, as técnicas e abordagens utilizadas dependem muito do produto específico e as características funcionais a serem exploradas (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

Os géis alimentícios são descritos como sólidos viscoelásticos que podem fluir como um líquido viscoso ou comportar-se como um sólido elástico, dependendo das condições às quais são submetidos (HORNER, 1999). Para esses sistemas existem, basicamente três regimes distintos, que relacionam a tensão e a deformação: o regime linear, o regime em que a relação entre a tensão e deformação não é linear, e a fratura (VAN VLIET, 1999).

Dentre as análises reológicas utilizadas para a caracterização de géis, estão os testes de pequena amplitude (*small amplitude oscillatory shear – SAOS*), que são realizados na região de viscoelasticidade linear (RVL) dos sistemas (VAN VLIET, 1999). Segundo Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas (2005), esses testes permitem o monitoramento dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G''), que são, respectivamente, medidas da energia armazenada nas amostras durante o processo de deformação (refletindo seu comportamento elástico), e da energia aplicada e perdida pelas amostras durante tal processo (refletindo seu comportamento viscoso) (MEZGER, 2002).

Considerando a importância de tais análises para a compreensão das propriedades de sistemas gelificados, testes de varredura de frequência foram aplicados para a caracterização e estudo comparativo dos diferentes géis, carregados e não-carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3. Tais testes consistem do monitoramento dos valores de G' e G'' , em função da frequência angular aplicada nas amostras, sob temperatura e deformação constantes (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

Inicialmente, para a determinação da região de viscoelasticidade linear (RLV) das diferentes amostras, testes de varredura de deformação foram conduzidos, e os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 55. A partir de tais dados, a deformação de 2 % foi selecionada para a realização dos testes de varredura de frequência, cujos resultados estão disponíveis na Figura 56.

Para todos os sistemas, foi verificado que os valores de G' foram superiores aos valores de G'' , confirmando o comportamento de sólido viscoelástico esperado (DICKINSON, 2012). Por outro lado, os resultados mostraram que as diferentes organizações estruturais, apresentadas e discutidas no item 6.6.1, refletiram-se nas propriedades reológicas dos sistemas.

A partir da comparação dos resultados dos géis não-carregados, verificou-se que sistemas produzidos com formulações G2 e G3 apresentaram maiores valores de G' e G'' , indicando que a adição de polissacarídeos fortaleceu a estrutura dos géis formados.

Como explicado anteriormente, a menor força e a maior instabilidade dos géis não-carregados produzidos com formulação G1, foram inicialmente verificadas através dos aspectos visuais dos sistemas, que refletiram as propriedades desafiadoras do IPS comercial utilizado (por exemplo, baixa solubilidade em pHs ácidos e neutros). Por esse motivo, a adição de polissacarídeos foi apontada como uma possível alternativa para a melhoria das propriedades gelificantes do ingrediente em questão. Nesse contexto, os resultados de varredura de frequência, obtidos a partir dos géis não-carregados, foram considerados satisfatórios, uma vez que confirmaram a habilidade da GX e GL de estabilizarem as estruturas proteicas formadas, resultando em um aumento da força dos sistemas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Chang et al. (2014), que estudaram a influência da adição de GX nas propriedades de géis de IPS obtidos por acidificação. Segundo os autores, os maiores valores dos módulos de armazenamento e de perda dos géis mistos, em comparação aos géis de IPS puro, indicaram que a adição deste polissacarídeo alterou a estrutura dos sistemas formados, aumentando a força dos mesmos.

Por sua vez, Monteiro et al. (2013) estudaram a influência da adição de diferentes galactomananas em géis de IPS, produzidos por indução térmica, e verificaram que a adição de GL aos sistemas também resultou em aumentos nos valores de G' e G'' dos sistemas.

Por outro lado, dentre as formulações G2 e G3, analisadas no presente estudo, géis produzidos com GX apresentaram estruturas mais fortes do que os sistemas produzidos com GL, refletindo o efeito das diferentes organizações estruturais, discutidas no item 6.6.1.

Em seu estudo, Hua, Cui e Wang (2003) também compararam propriedades de géis mistos de IPS e diferentes polissacarídeos, e verificaram que os sistemas formados por IPS e GL apresentaram estruturas mais fracas que as dos géis de IPS e GX. Segundo os autores, esses resultados estão relacionados às propriedades não gelificantes da GL, que não permitem a formação de redes contínuas em géis mistos e fazem com que as características reológicas dos sistemas sejam determinadas, predominantemente, pelas propriedades das redes de IPS. Embora os resultados obtidos no presente trabalho tenham sido semelhantes aos obtidos por Hua, Cui e Wang (2003), a discussão dos autores é questionável, uma vez que a GX também não apresenta propriedades gelificantes.

Na verdade, segundo Bryant e McClements (2000), nas condições de pH utilizadas no presente estudo (pH 7), tanto as proteínas quanto a GX são carregadas negativamente, e por

tanto tendem a apresentar repulsão eletrostática entre as moléculas, que geralmente resultam em separação de fases. Porém, sabe-se também que, mesmo em casos de sistemas biopoliméricos mistos termodinamicamente instáveis, o processo de separação de fases pode não ocorrer, devido a barreiras energéticas cinéticas associadas com a restrição de movimento das moléculas na rede (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000). Como discutido anteriormente, nos géis não-carregados com formulação G2, essa restrição de movimento das moléculas foi ocasionada pelo início do processo de formação do gel de IPS, minutos após a adição de GX, que impediu o desenvolvimento do processo de separação de fases. Nesse caso, a distribuição relativamente homogênea do polissacarídeo na rede de IPS resultou em um aumento pronunciado na força dos sistemas obtidos, como verificado através dos espectros mecânicos na Figura 56(A).

Embora o processo de separação de fases, observado em sistemas não-carregados com formulação G3, esteja possivelmente associado ao aumento limitado da força dos géis de IPS com a adição GL (Figura 56A), tal mecanismo pode ter sido um fator fundamental para a melhoria das propriedades gelificantes do IPS, na presença deste polissacarídeo. Segundo Monteiro et al. (2013), o aumento da concentração dos diferentes biopolímeros em cada fase durante o processo de separação conduz a uma auto-associação polimérica mais extensa, o que pode favorecer, por exemplo, a gelificação de sistemas mistos com baixas concentrações de proteínas (agente gelificante). De acordo com esses autores, a elevada razão M/G e reduzida ramificação da GL fazem com que este polissacarídeo seja muito propenso a associações intermoleculares, principalmente por meio de ligação de hidrogênio entre os grupos manose, contribuindo assim para o aumento da concentração efetiva de cada biopolímero dentro das diferentes fases e para o aumento dos módulos viscoelásticos dos géis, como observado nos resultados do presente estudo.

Para a melhor interpretação dos espectros mecânicos dos diferentes sistemas, os dados experimentais obtidos através dos testes de varredura de frequência foram satisfatoriamente ajustados ao modelo Lei da Potência e os parâmetros obtidos estão organizados na Tabela 10. Os parâmetros K' e K'' mostraram-se importantes, uma vez que permitiram a quantificação das diferenças entre as forças dos géis não-carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3. Como verificado, os valores desses parâmetros foram significativamente ($p < 0,05$) maiores para géis biopoliméricos mistos, e dentre os géis com formulações G2 e G3, aqueles produzidos com IPS e GX (G2) apresentaram magnitudes de K' e K'' , ainda maiores.

Além disso, segundo a literatura, as características de dependência dos módulos de armazenamento e perda com a frequência, representadas na Tabela 10 pelos valores de n' e n'' , podem ser utilizadas para a obtenção de informações importantes a respeito das propriedades estruturais dos sistemas (SPOTTI et al., 2016; STADING; HERMANSSON, 1990). Em geral, géis fortes, que se assemelham a géis covalentes ou químicos, apresentam pequena dependência de G' e G'' com a frequência, enquanto géis fracos ou físicos, apresentam elevada dependência de G' e G'' com a frequência (SPOTTI et al., 2016; STADING; HERMANSSON, 1990). Segundo Rocha et al. (2009), em géis proteicos a dependência dos parâmetros G' e G'' com a frequência existe, mas é mínima, indicando que ligações covalentes e não covalentes estão envolvidas no processo de formação das estruturas.

Como verificado a partir dos resultados da Tabela 10, para todos os géis não-carregados avaliados no presente estudo, os valores G' foram muito maiores que G'' ($K' \gg K''$) e a dependência desses parâmetros com a frequência foi pequena (n' e n'' entre 0,0752 e 0,1216), revelando um comportamento viscoelástico típico de géis fortes (MONTEIRO et al., 2013). Além disso, os valores de n' mostraram que a adição de polissacarídeos teve pouca influência nas características de dependência de G' com a frequência. Por outro lado, os valores de n'' revelaram que sistemas produzidos com IPS e GL apresentaram G'' com dependência significativamente ($p < 0,05$) inferior, se comparados aos sistemas não-carregados com formulações G1 e G2, indicando um menor número de ligações físicas (não-covalentes) nos sistemas.

A partir dos espectros mecânicos (Figura 56), os valores de $\tan \delta$ (G''/G') foram calculados e os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 57. Tais dados mostraram que géis não-carregados com formulações G2 e G3 apresentaram valores de $\tan \delta$ inferiores aos sistemas produzidos com formulação G1, em todo o intervalo de frequência analisado, indicando que a adição de polissacarídeos aumentou as propriedades elásticas dos sistemas.

Além disso, como verificado na Figura 57(A), os valores de $\tan \delta$ apresentaram elevada dependência com a frequência, para todas as formulações de géis não-carregados, em valores reduzidos de frequência angular. Por outro lado, com o aumento da frequência, os sistemas mistos apresentaram valores de $\tan \delta$ menos dependentes que aqueles produzidos apenas com IPS. Segundo a literatura, esses resultados indicam que géis não-carregados, produzidos com formulação G1, apresentaram propriedades viscosas mais pronunciadas que aqueles produzidos com formulações G2 e G3, confirmando os resultados discutidos anteriormente (ROCHA et al., 2009).

Além do estudo dos efeitos da adição de diferentes polissacarídeos na estrutura dos géis de IPS obtidos a frio, os resultados de varredura de frequência também permitiram a avaliação dos efeitos da incorporação de MLS nas características estruturais dos géis produzidos com formulações G1, G2 e G3. Os espectros mecânicos e os resultados de $\tan \delta$ dos géis carregados com MLS estão disponíveis nas Figuras 56(B) e 57(B), respectivamente. Assim como no caso dos géis não-carregados, os dados experimentais, G' e G'' , foram satisfatoriamente ajustados ao modelo Lei da Potência e os parâmetros obtidos estão organizados na Tabela 10.

A partir da avaliação desses resultados verificou-se que, para todas as formulações, a incorporação de MLS fortaleceu os sistemas, aumentando os módulos de armazenamento e perda dos géis obtidos. Como verificado na Tabela 10, os géis carregados apresentaram valores de K' e K'' significativamente ($p < 0,05$) superiores aos géis não-carregados produzidos com mesma formulação. Além disso, os resultados mostraram que a adição de MLS reduziu a dependência de G'' com a frequência angular, para géis com formulações G1 e G2, e aumentou a dependência de G' com a frequência para sistemas com formulação G3. Apesar disso, todos os géis carregados apresentaram dependências de G' e G'' com a frequência estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Semelhantemente aos géis não-carregados, os géis carregados produzidos com as três formulações apresentaram um comportamento viscoelástico típico de géis fortes, com valores de G' muito maiores que G'' ($K' \gg K''$) e baixa dependência desses parâmetros com a frequência (n' e n'' entre 0,0509 e 0,1133) (MONTEIRO et al., 2013). Por outro lado, dentre esses sistemas, géis produzidos com formulação G2 mostraram-se significativamente ($p < 0,05$) mais fortes que aqueles produzidos com formulações G1 e G3, que, por sua vez, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre si.

O efeito da adição de MLS também foi observado nos resultados de $\tan \delta$, disponíveis na Figura 57. A partir da comparação dos dados presentes nas Figuras 57(A) e 57(B), verificou-se que a incorporação de partículas praticamente não alterou os valores de $\tan \delta$ e o grau de dependência deste parâmetro com a frequência em géis biopoliméricos mistos. Por outro lado, géis carregados com formulação G1 apresentaram menores valores de $\tan \delta$, se comparados aos géis não-carregados de mesma formulação. Como discutido anteriormente, menores valores de $\tan \delta$ são obtidos a partir de sistemas com propriedades mais elásticas, porém, a adequada interpretação desses dados só é possível a partir da análise da variação deste parâmetro com a frequência angular. Nesse sentido, a partir dos resultados disponíveis na Figura 57 (B), verificou-se também que a incorporação de partículas aumentou

a dependência de $\tan \delta$ com a frequência para sistemas com formulação G1. Segundo Rocha et al. (2009), valores de $\tan \delta$ muito dependentes da frequência são característicos de sistemas com fortes características viscosas. Nesse contexto, pode-se afirmar que a adição de MLS aumentou as características elásticas dos géis de IPS, mas, ainda assim, estes sistemas apresentaram propriedades viscosas maiores que a dos géis biopoliméricos mistos, que apresentaram menor dependência de $\tan \delta$ com a frequência.

Segundo a literatura, as propriedades dos géis carregados dependem da natureza das interações entre as partículas lipídicas e a matriz de gel (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; VAN VLIET, 1988). Como discutido por Oliver et al. (2015), em condições extremas, as partículas podem se encontrar mecanicamente ligadas à rede de gel, sendo consideradas ativas, ou não ligadas à matriz, sendo consideradas inativas. De maneira geral, as gotículas ativas podem aumentar ou diminuir a força dos géis, dependendo das propriedades dos diferentes componentes, enquanto as gotículas inativas apenas enfraquecem os sistemas formados (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; RING; STAINSBY, 1982).

Nesse contexto, o fortalecimento dos sistemas com a incorporação das partículas, observado a partir dos aumentos dos valores de K' e K'' , indicou que as MLS encontravam-se ativas nos géis carregados produzidos com formulações G1, G2 e G3, possivelmente devido ao ancoramento de grupos proteicos e/ou cadeias de polissacarídeos nos espaços existentes na interface formada por tween 80 e span 80, resultantes dos diferentes tamanhos das cabeças polares desses tensoativos.

Na maior parte dos estudos encontrados na literatura, os autores exploram apenas resultados de compressão uniaxial para discutir o efeito da incorporação de emulsões nas propriedades de géis carregados (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; SALA et al., 2007, SALA et al., 2009a, b), porém, de acordo com Sala et al. (2007), em alguns casos, informações sobre as interações entre gotículas e matriz não podem ser adequadamente obtidas a partir de testes de grande deformação, mas sim por testes de pequena deformação, como ensaios de varredura de frequência. Tais ensaios tendem a ser mais adequados para detectar pequenas diferenças entre os módulos dos sistemas, decorrentes das diferentes interações entre os componentes, como verificado no presente estudo.

Figura 55 Resultados dos testes de varredura de deformação para os géis com formulações G1, G2 e G3, não-carregados (A) e carregados com MLS (B).

Fonte: Própria autoria.

Figura 56 Resultados dos testes de varredura de frequência para os géis, não-carregados com MLS, de formulações G1, G2 e G3.

(A)

(B)

Fonte: Própria autoria.

Figura 57 Valores de $\tan \delta$ (G''/G') em função da frequência para os géis, não-carregados (A) e carregados (B) com MLS, de formulações G1, G2 e G3.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 10. Parâmetros das equações tipo lei de potência dos géis e géis carregados com emulsão (EFG) produzido com diferentes formulações.

Formulação		$G' = K' \cdot \omega^{n'}$			$G'' = K'' \cdot \omega^{n''}$		
		K'	n'	R^2	K''	n''	R^2
Gel	G1	$170,38 \pm 9,57^{cB}$	$0,1216 \pm 0,0078^{aA}$	0,997	$33,60 \pm 0,50^{cB}$	$0,1077 \pm 0,0129^{aA}$	0,929
	G2	$591,80 \pm 15,95^{aB}$	$0,1076 \pm 0,0022^{aA}$	0,997	$99,23 \pm 4,20^{aB}$	$0,0872 \pm 0,0052^{aA}$	0,924
	G3	$472,10 \pm 29,49^{bB}$	$0,1076 \pm 0,0008^{aB}$	0,996	$77,63 \pm 8,69^{bB}$	$0,0752 \pm 0,0080^{bA}$	0,887
EFG	G1	$806,07 \pm 38,16^{bA}$	$0,1068 \pm 0,0040^{aA}$	0,994	$139,99 \pm 3,68^{bA}$	$0,0509 \pm 0,011^{aB}$	0,833
	G2	$1306,05 \pm 107,98^{aA}$	$0,1044 \pm 0,0033^{aA}$	0,995	$237,80 \pm 2,79^{aA}$	$0,0731 \pm 0,0065^{aB}$	0,871
	G3	$840,99 \pm 25,02^{bA}$	$0,1133 \pm 0,0020^{aA}$	0,993	$151,72 \pm 10,99^{bA}$	$0,0551 \pm 0,022^{aA}$	0,780

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para géis e EFG com diferentes formulações. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para amostras de mesma formulação, mas sistemas diferentes (géis e EFG).

Fonte: Própria autoria

6.6.3 Ensaios de fluência e recuperação

Embora os ensaios de varredura de frequência tenham fornecido informações importantes a respeito dos efeitos das adições dos diferentes polissacarídeos e da incorporação de MLS nas propriedades de géis de IPS, sabe-se que a descrição reológica completa de sistemas complexos, como os avaliados no presente estudo, só é obtida a partir da aplicação combinada de diferentes testes reológicos (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005). Segundo Dolz, Hernández e Delegido (2008), embora testes oscilatórios sejam muito

importantes para a caracterização de sólidos viscoelásticos, ensaios de fluência e recuperação são considerados fundamentais para a compreensão de possíveis organizações estruturais e também de alterações associadas a mudanças de formulação (por exemplo, remoção ou adição de ingredientes).

Por esse motivo, tais testes, que consistem no monitoramento do grau de deformação de amostras submetidas a tensões contantes, durante um período de tempo pré-estabelecido (fluência), e na posterior remoção da tensão aplicada, para a avaliação da capacidade de recuperação dos sistemas (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008) são amplamente explorados para a caracterização de sistemas como géis proteicos (TARHAN et al., 2016; SPOTTI et al., 2016), géis biopoliméricos mistos (CHANG et al., 2014), géis carregados com emulsões (LORENZO et al., 2011; LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013) e outros sistemas alimentícios (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008; PEREIRA et al., 2001).

Nesse contexto, considerando o interesse na aplicação de ensaios de fluência e recuperação para avaliação das propriedades dos géis carregados e não-carregados, com formulações G1, G2 e G3, todos os sistemas foram, inicialmente, submetidos a testes de varredura de tensão, para a determinação da região de viscoelasticidade linear das amostras. A partir dos resultados, disponíveis na Figura 58, tensões de 5 Pa foram selecionadas para o desenvolvimento de ensaios de fluência com resultados confiáveis, por mostrarem-se dentro da RVL dos géis carregados e não-carregados, para todas as formulações testadas.

Figura 58 Resultados dos testes de varredura de tensão dos géis não-carregados (A) e carregados (B) com MLS, produzidos com formulações G1, G2 e G3.

Fonte: Própria autoria.

Posteriormente, géis carregados e não-carregados, produzidos com as formulações G1, G2 e G3, foram submetidos a testes de fluência e recuperação e os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 59.

Como verificado na Figura 59(A), géis não-carregados produzidos com formulação G1 apresentaram valores de compliança maiores que os sistemas mistos, confirmando o fortalecimento das estruturas com a adição de polissacarídeos, verificado a partir dos testes oscilatórios (item 6.6.2). Além disso, os resultados mostraram que, dentre os géis biopoliméricos mistos não-carregados, os sistemas produzidos com GX apresentaram os menores valores de compliança, indicando que os géis não-carregados com formulação G2 apresentaram maior resistência à deformação, em comparação àqueles produzidos com formulação G3.

Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos através dos testes de varredura de frequência, discutidos no item 6.6.2, e também refletem as características microestruturais dos sistemas, estudadas a partir das microscopias confocal de varredura a laser (MCVL) e eletrônica de varredura (MEV). Como discutido no item 6.6.1, enquanto os sistemas com GX (formulação G2) apresentaram organização estrutural semelhante à de redes interpenetrantes, os géis com GL (formulação G3) apresentaram microestrutura com evidente separação de fases, como consequência da incompatibilidade termodinâmica entre o IPS e o polissacarídeo (MORRIS, 1997).

Essas diferentes organizações microestruturais também afetaram as taxas de recuperação dos sistemas, como verificado na Figura 60. Dentre os géis não-carregados, os sistemas mistos apresentaram as maiores capacidades de recuperação após a remoção da tensão. Embora os resultados das formulações G2 e G3 não tenham sido estatisticamente diferentes, foi verificado que sistemas produzidos com GL apresentaram capacidade de recuperação ligeiramente menor que aqueles produzidos com GX. Estes resultados indicaram que, embora a adição de GL tenha fortalecido os géis de IPS e aumentado sua resistência à deformação (compliança de G3 menor que de G1), as separações de fases verificadas na microestrutura desses sistemas resultaram em uma maior deformação permanente (reduzida capacidade de recuperação) em comparação com os géis não-carregados produzidos com GX.

O efeito da adição de GX na capacidade de recuperação de géis de IPS também foi investigado por Chang et al. (2014), que verificaram que os sistemas mistos apresentaram menores deformações e maiores taxas de recuperação. Por outro lado, investigações sobre o comportamento de géis mistos produzidos com IPS e GL submetidos a testes de fluência e recuperação não são encontradas na literatura.

Além da adição de polissacarídeos, os efeitos da incorporação de MLS nos géis com formulações G1, G2 e G3 também foram investigados por meio de testes de fluência e recuperação. Como verificado através da comparação entre as Figuras 59(A) e 59(B), a adição de MLS resultou na redução dos valores de compliança dos sistemas, indicando um fortalecimento dos géis a partir da incorporação dessas estruturas. Embora todas as formulações de géis carregados tenham apresentado o mesmo comportamento qualitativo, os sistemas produzidos com GX apresentaram uma rede mais forte, com menores valores de compliança.

Verificou-se também que o aumento da força dos géis carregados, em comparação aos géis não-carregados, foi proporcionalmente maior para os sistemas com formulação G1. Tais resultados estão possivelmente relacionados às organizações estruturais com evidentes separações de fases, verificadas em géis carregados produzidos com formulações G2 e G3. Possivelmente, o aumento da incompatibilidade termodinâmica entre os polissacarídeos e o IPS com a adição de MLS, limitou o aumento da força dos sistemas, afetando a resistência dos mesmos à deformação. Além disso, as separações de fases em géis carregados mistos, verificadas nas imagens de MCVL e MEV (item 6.6.1) também prejudicaram a capacidade de recuperação dos sistemas após a remoção da tensão constante, como verificado na Figura 60. Embora as diferenças entre as taxas de recuperação de géis carregados e não-carregados com formulação G2 não tenham sido estatisticamente significativas ($p > 0,05$), as consequências da incorporação das MLS sobre a capacidade de recuperação dos géis foram maiores para sistemas mistos.

Figura 59 Resultados dos testes de fluência e recuperação dos géis não-carregados (A) e carregados com MLS (B) com formulações G1, G2 e G3.

Fonte: Própria autoria.

Figura 60 Taxas de recuperação dos géis carregados e não-carregados com MLS com formulações G1, G2 e G3. Médias identificadas com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para os mesmos sistemas (géis carregados ou não-carregados) produzidos com diferentes formulações (G1, G2 e G3). Médias identificadas com letras maiúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para sistemas diferentes produzidos com as mesmas formulações (G1, G2 e G3).

Fonte: Própria autoria.

6.6.3.1 Modelagem matemática: Modelo de Burger

Os dados experimentais obtidos a partir dos testes de fluência e recuperação foram ajustados ao modelo de Burger e os parâmetros obtidos estão disponíveis na Tabela 11. Como verificado na Figura 61, as curvas de recuperação, para todas as formulações, apresentaram três regiões bem definidas: a primeira recuperação instantânea, que corresponde à mola do elemento de Maxwell, a segunda recuperação mais lenta, que corresponde ao elemento de Kelvin-Voigt e a terceira região de deformação permanente, que corresponde ao deslizamento do amortecedor do elemento de Maxwell (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008, LORENZO et al., 2011, MARTÍNEZ et al., 2007).

Para todas as formulações, J_0 e J_1 apresentaram tendências semelhantes, mas os valores de J_1 foram superiores a J_0 . De acordo com Lorenzo, Zaritzky e Califano (2013), esses resultados podem indicar que os sistemas analisados não apresentaram elevada flexibilidade, uma vez que amostras flexíveis tendem a apresentar valores de J_1 menores que J_0 (JIMÉNEZ-AVALOS et al., 2005, LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013).

Os resultados mostraram que a adição de polissacarídeos diminuiu os valores de J_0 e J_1 e, dentre os sistemas mistos, os géis produzidos com GX (G2) apresentaram os menores valores de compliança instantânea e retardada, refletindo as diferentes forças dos sistemas, discutidas anteriormente. De acordo com Chang et al. (2014) os valores mais elevados de J_1 dos sistemas com formulação G1 refletiram a organização estrutural mais simples dos géis de IPS (mostrada nas imagens de MCVL e MEV no item 6.6.1). Além disso, os efeitos da adição

de polissacarídeos nos géis IPS também foram verificados através dos parâmetros λ_{ret} e η_0 . Os sistemas mistos apresentaram maiores valores de viscosidade do amortecedor de Maxwell (η_0) e menores valores de tempo de retardamento associado ao elemento de Kelvin-Voigt (λ_{ret}), em comparação aos géis IPS.

As porcentagens de contribuição de cada elemento do modelo de Burger na compliança máxima dos géis (Tabela 12) mostraram que a adição de polissacarídeos aos sistemas aumentou a contribuição do elemento Maxwell (J_0) e do elemento Kelvin-Voigt (J_1) à compliança máxima dos sistemas, enquanto nos géis de IPS, a contribuição do deslizamento irreversível do amortecedor de Maxwell (J_∞) foi maior (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008).

Através da comparação entre os parâmetros obtidos para géis carregados e não-carregados, verificou-se que a adição de MLS diminuiu os valores de J_0 e J_1 , confirmando o fortalecimento dos sistemas discutido anteriormente, e aumentou η_0 . Além disso, a adição de MLS aos sistemas também aumentou o tempo de retardamento associado ao elemento de Kelvin-Voigt (λ_{ret}) de géis mistos, mas não afetou λ_{ret} de géis de IPS.

As contribuições de cada elemento do modelo de Burger na compliança máxima (Tabela 12) dos géis com formulação G1 não foram alteradas com a adição de MLS aos sistemas. Por outro lado, géis carregados com formulações G2 e G3 apresentaram menores contribuições do elemento Kelvin-Voigt (J_1) e maiores contribuições do deslizamento irreversível do amortecedor de Maxwell (J_∞), em comparação aos géis não-carregados com as mesmas formulações.

Entre os géis carregados, os sistemas com GX (G2) apresentaram menores valores de J_0 e J_1 e maiores valores de η_0 , enquanto entre sistemas com formulações G1 e G3, esses parâmetros não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Por outro lado, verificou-se que as diferenças entre os valores de λ_{ret} e entre as contribuições de cada elemento do modelo de Burger (Tabela 12) nos valores de compliança máximo, não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para as três formulações de géis carregados avaliadas.

Os resultados discutidos acima mostraram que as análises dos parâmetros do modelo de Burger permitiram algumas comparações entre os diferentes sistemas, no entanto, não permitiram o desenvolvimento de discussões aprofundadas sobre as estruturas e propriedades dos géis carregados e não-carregados, devido aos seus significados físicos vagos. Além disso, os resultados da Figura 61 mostraram que o modelo em questão não foi capaz de descrever os dados de recuperação tão bem quanto os dados de fluência. Embora os coeficientes de correlação, obtidos a partir da análise combinada dos dados de fluência e recuperação, tenham

vido razoavelmente bons ($R^2 > 0,853$), a análise individual de cada etapa mostrou que os coeficientes de correlação para os dados de fluência ($R^2 > 0,891$) foram maiores que para os dados de recuperação ($R^2 > 0,819$). Neste contexto, considerando os desvios entre dados experimentais e modelo matemático, mesmo as comparações entre os parâmetros relacionados à etapa de recuperação são complexas e podem não levar a conclusões totalmente confiáveis.

Figura 61 Resultados dos testes de fluência e recuperação dos géis não-carregados (A) e carregados com MLS (B) com formulações G1, G2 e G3, representados pelo modelo de Burger.

(A)

(B)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 Parâmetros do modelo de Burger utilizados para descrever os resultados de fluência e recuperação de géis carregados (EFG) e não-carregados com MLS produzidos com formulações G1, G2 e G3.

Formulação	$J_0 (x 10^3) [Pa^{-1}]$	$J_1 (x 10^3) [Pa^{-1}]$	$\lambda_{ret} [s]$	$\eta_0 [kPa.s]$
G1	3.538 ± 0.109^{aA}	6.014 ± 0.321^{aA}	42.18 ± 0.82^{aA}	185.52 ± 5.33^{cB}
G2	0.755 ± 0.024^{cA}	1.243 ± 0.013^{cA}	27.51 ± 3.27^{bB}	1206.78 ± 32.25^{aB}
G3	1.177 ± 0.026^{bA}	1.927 ± 0.077^{bA}	31.79 ± 1.92^{bB}	733.58 ± 27.12^{bB}
G1 - EFG	0.511 ± 0.021^{aB}	0.873 ± 0.040^{aB}	42.44 ± 2.92^{aA}	1214.82 ± 76.85^{bA}
G2 - EFG	0.405 ± 0.038^{bB}	0.611 ± 0.022^{bB}	44.49 ± 1.56^{aA}	1784.40 ± 103.06^{aA}
G3 - EFG	0.466 ± 0.039^{abB}	0.807 ± 0.017^{aB}	44.62 ± 2.68^{aA}	1344.95 ± 49.05^{bA}

Médias identificadas com letras minúsculas distintas na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para os mesmos sistemas (géis carregados ou não-carregados) produzidos com diferentes formulações (G1, G2 e G3). Médias identificadas com letras maiúsculas distintas na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) para sistemas diferentes produzidos com as mesmas formulações (G1, G2 e G3).

Fonte: Própria autoria

Tabela 12 Contribuição de cada elemento do modelo de Burger na compliança máxima de géis carregados (EFG) e não-carregados com MLS, produzidos com formulações G1, G2 e G3.

Formulação	% J_0	% J_1	% J_∞
G1	24.60 ± 0.19^{bA}	41.25 ± 1.21^{bA}	34.42 ± 1.34^{aA}
G2	28.38 ± 0.75^{aA}	46.83 ± 0.44^{aA}	25.56 ± 0.69^{bB}
G3	28.11 ± 0.32^{aA}	45.02 ± 0.71^{aA}	26.61 ± 0.49^{bB}
G1 - EFG	24.81 ± 1.19^{aA}	42.38 ± 1.76^{aA}	32.82 ± 0.71^{aA}
G2 - EFG	27.36 ± 2.28^{aA}	41.28 ± 2.05^{aB}	30.42 ± 1.21^{aA}
G3 - EFG	24.35 ± 2.13^{aA}	42.50 ± 0.84^{aB}	32.26 ± 1.42^{aA}

Médias identificadas com letras minúsculas distintas na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para os mesmos sistemas (géis carregados ou não-carregados) produzidos com diferentes formulações (G1, G2 e G3). Médias identificadas com letras maiúsculas distintas na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) para sistemas diferentes produzidos com as mesmas formulações (G1, G2 e G3).

Fonte: Própria autoria

6.6.3.2 Modelagem matemática: Abordagem da derivada fracionária

Caracterizações reológicas de sistemas alimentícios por meio de testes de fluência e recuperação são geralmente realizadas ajustando os dados experimentais ao modelo de Burger, que consiste na associação em série de um elemento Maxwell e um elemento Kelvin-Voigt (CHANG et al., 2014, DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEGIDO, 2008, LORENZO et al., 2011, LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013). Embora seja muito aplicado, o modelo de Burger apresenta elevado número de parâmetros, com significados físicos vagos, e reduzida capacidade de descrever simultaneamente dados de fluência e recuperação, o que torna a interpretação dos resultados muito complexa (SCHAFFTER; CORVALAN; CAMPANELLA, 2015).

Considerando estas limitações, uma alternativa interessante para analisar os dados de fluência e recuperação consiste na aplicação da abordagem da derivada fracionária, cujo modelo apresenta um menor número de parâmetros, todos com significados físicos claros, e é capaz de representar satisfatoriamente ambas as etapas do experimento (SCHAFFTER; CORVALAN; CAMPANELLA, 2015; TARHAN et al., 2016). Embora essa abordagem seja amplamente utilizada em estudos envolvendo polímeros, apenas recentemente ela foi introduzida para a caracterização de sistemas alimentícios (DAVID; KATAYAMA, 2013; JAISHANKAR; MCKINLEY, 2014; SCHAFFTER; CORVALAN; CAMPANELLA, 2015; TARHAN et al., 2016).

Nesse contexto, visando o desenvolvimento de um estudo comparativo entre os modelos, os dados de fluência e de recuperação de géis carregados e não-carregados, produzidos com diferentes formulações, também foram analisados utilizando a abordagem da derivada fracionária, como mostrado na Figura 62, e os parâmetros obtidos estão disponíveis na Tabela 13.

Os resultados mostraram que os valores de α para os géis com as formulações G1, G2 e G3 foram respectivamente 0,1952, 0,1596 e 0,1647, confirmando as propriedades viscoelásticas dos sistemas. De acordo com a literatura, esse parâmetro varia entre 0 (materiais puramente elásticos) e 1 (materiais puramente viscosos) (SCHAFFTER; CORVALAN; CAMPANELLA, 2015; TARHAN et al., 2016). Neste contexto, os valores obtidos também indicaram que a adição de polissacarídeos aumentou o grau de elasticidade dos géis e, entre os sistemas mistos, os produzidos GX apresentaram valores menores de α . Estes resultados podem ser explicados pelas organizações microestruturais dos géis, previamente discutidas. Enquanto a organização similar a redes interpenetrantes, verificada em sistemas com GX (G2), resultou em um aumento do grau de elasticidade, a separação de fases verificada em géis com GL (G3) diminuiu a elasticidade das amostras.

Além disso, verificou-se que os géis mistos apresentaram menores valores de λ_1 e λ_2 em comparação aos géis de IPS e, entre eles, os sistemas com GL (G3) apresentaram os maiores valores. Os valores mais baixos desses parâmetros refletem a maior resistência dos sistemas mistos, uma vez que λ_1 e λ_2 representam o inverso dos módulos de elasticidade dos géis, durante a fluência e a recuperação, respectivamente. Além disso, através da avaliação de λ_1 e λ_2 foi possível compreender a capacidade de recuperação dos sistemas, uma vez que λ_2 varia de 0 (estrutura sem capacidade de recuperação) até o valor de λ_1 (sistema com comportamento viscoelástico linear) (SCHAFFTER; CORVALAN; CAMPANELLA, 2015).

Os resultados mostraram que, para todas as formulações, os valores de λ_2 foram inferiores a λ_1 , indicando que as estruturas internas dos sistemas foram perturbadas durante o teste de fluência, aumentando a resistência dos sistemas à recuperação. Verificou-se também que os géis de IPS (G1) apresentaram a maior diferença entre os dois parâmetros, provavelmente devido à menor resistência e maior fragilidade das estruturas, o que levou a uma menor capacidade de recuperação após a fluência.

Entre os géis mistos não-carregados, aqueles produzidos com formulação G3 apresentaram maiores diferenças entre λ_1 e λ_2 , o que também pode estar relacionado à organização microestrutural dos sistemas, discutida anteriormente. Enquanto a incompatibilidade termodinâmica das diferentes fases em géis com GL conduziu a uma maior resistência à recuperação após o teste de fluência, as redes de interpenetração em géis com GX levaram a um reforço da estrutura e menor resistência à recuperação após fluência.

Através da comparação dos resultados de géis carregados e não-carregados, verificou-se que a adição de MLS não causou alterações significativas ($p > 0,05$) no grau de elasticidade dos géis com formulação G1 (géis de IPS), mas diminuiu o grau de elasticidade nos sistemas com polissacarídeos, provavelmente devido às separações de fases microestruturais, causadas pela incorporação de MLS em géis mistos com GX (G2), e evidenciadas pela incorporação de MLS em sistemas com GL (G3).

O fortalecimento dos sistemas com a adição de MLS, discutido anteriormente, também foi verificado a partir da diminuição de λ_1 e λ_2 . Dentre as formulações analisadas, G2 apresentou maior resistência, com λ_1 e λ_2 inferiores, enquanto G1 e G3 apresentaram forças semelhantes, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de cada parâmetro.

A comparação entre λ_1 e λ_2 mostrou que, para todas as formulações, a tensão aplicada resultou em mudanças nas estruturas que afetaram a capacidade de recuperação do sistema ($\lambda_2 < \lambda_1$). Por outro lado, as menores diferenças entre esses dois parâmetros em géis carregados indicaram que a presença de MLS reduziu as perturbações nas estruturas causadas pela tensão aplicada durante o teste de fluência e, conseqüentemente, aumentou a capacidade de recuperação dos sistemas.

Através da análise dos parâmetros e do ajuste dos dados experimentais à Equação 15 (Figura 62), verificou-se que o modelo em questão representou satisfatoriamente os resultados dos testes de fluência e recuperação ($R^2 > 0,89$). Além disso, a avaliação dos parâmetros com significados físicos claros permitiu uma discussão mais profunda e intuitiva sobre as propriedades dos sistemas, em comparação com os parâmetros do modelo de Burger.

Figura 62 Resultados dos testes de fluência e recuperação dos géis não-carregados (A) e carregados com MLS (B) com formulações G1, G2 e G3, representados pelo modelo baseado na abordagem da derivada fracionária.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 13 Parâmetros do modelo baseado na abordagem da derivada fracionária utilizados para descrever os resultados de fluência e recuperação de géis carregados (EFG) e não-carregados com MLS produzidos com formulações G1, G2 e G3.

Formulação	α	λ_1	λ_2
G1	0.1952 ± 0.0060^{aA}	0.7748 ± 0.0446^{aA}	0.6648 ± 0.0445^{aA}
G2	0.1596 ± 0.0112^{bB}	0.1667 ± 0.0085^{cA}	0.1529 ± 0.0081^{cA}
G3	0.1647 ± 0.0081^{bB}	0.2472 ± 0.0091^{bA}	0.2270 ± 0.0068^{bA}
G1 EFG	0.1893 ± 0.0086^{aA}	0.1105 ± 0.0058^{aB}	0.0961 ± 0.0058^{aB}
G2 EFG	0.1922 ± 0.0048^{aA}	0.0799 ± 0.0021^{bB}	0.0685 ± 0.0009^{bB}
G3 EFG	0.1918 ± 0.0075^{aA}	0.1047 ± 0.0044^{aB}	0.0881 ± 0.0024^{aB}

Médias identificadas com letras minúsculas distintas na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para os mesmos sistemas (géis carregados ou não-carregados) produzidos com diferentes formulações (G1, G2 e G3). Médias identificadas com letras maiúsculas distintas na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para sistemas diferentes produzidos com as mesmas formulações (G1, G2 e G3).

Fonte: Própria autoria

6.6.4 Ensaios de compressão uniaxial

6.6.4.1 Efeito da adição de polissacarídeos e da incorporação de micropartículas lipídicas sólidas nos géis de isolado proteico de soja

A importância da aplicação de diferentes ensaios reológicos para a caracterização de géis alimentícios é amplamente aceita, devido à elevada complexidade de tais sistemas (TABILO–MUNIZAGA; BARBOSA–CÁNOVAS, 2005). Sabe-se, por exemplo, que enquanto testes de pequena deformação são muito interessantes por detectarem pequenas diferenças entre os módulos das amostras (SALA et al., 2007), testes de grande deformação, como ensaios de compressão uniaxial, são fundamentais por refletirem, de maneira mais satisfatória, o comportamento dos alimentos durante os processo de produção e mastigação (SALA et al., 2009; TABILO–MUNIZAGA; BARBOSA–CÁNOVAS, 2005; VAN VLIET, 2002).

Nesse contexto, visando uma completa caracterização dos géis carregados e não-carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3, testes de compressão uniaxial foram aplicados aos sistemas e os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 63.

Inicialmente, a partir da comparação das propriedades dos géis não-carregados, produzidos com diferentes formulações, verificou-se que a adição de polissacarídeos reduziu significativamente ($p < 0,05$) os valores de módulo de Young (E_g) dos géis. Esses resultados indicaram que, embora a presença de GX e GL tenha fortalecido os sistemas (como discutido nos itens 6.5.2 e 6.5.3), a elasticidade dos géis submetidos a grandes deformações foi comprometida pela adição de polissacarídeos.

No caso de sistemas com GX, além da redução de E_g , foi verificada uma redução significativa ($p < 0,05$) na tensão de ruptura dos géis (σ_H), em comparação aos sistemas produzidos apenas com IPS. Esses resultados mostraram que, embora as amostras com formulação G2 tenham apresentado uma organização estrutural homogênea, sem separação de fases, e com aparência mais compacta que aquelas produzidas com formulação G1, as interações existentes entre os componentes (IPS e GX) deixaram os sistemas mais sensíveis à ruptura.

Sabe-se que, nas condições de pH utilizadas (pH 7), a GX e o IPS tendem a apresentar elevada incompatibilidade termodinâmica e interações antagônicas, porém, como discutido anteriormente, o início do processo de gelificação nos sistemas com formulação G2, minutos após a adição do polissacarídeo, pode ter impedido o desenvolvimento da separação de fases na microestrutura e permitiu uma distribuição homogênea da GX na rede de IPS. Nesse contexto, pode-se afirmar que a presença desse polissacarídeo nos géis mistos possivelmente resultou em uma redução nas interações proteína-proteína e um aumento nas interações proteína-GX ao longo de toda a rede. Essas interações, por sua vez, mostraram-se interessantes para a estabilização das estruturas proteicas, aumentando sua força e sua resistência a pequenas deformações, porém tornaram os sistemas menos elásticos e mais sensíveis a ruptura, quando submetidos a grandes deformações, devido a sua natureza termodinamicamente pouco favorável.

Já a partir da comparação dos resultados das amostras produzidas com formulações G1 e G3, verificou-se que, embora a adição de GL tenha resultado na redução do E_g , a presença deste polissacarídeo não alterou significativamente ($p > 0,05$) as propriedades de ruptura dos sistemas. Nesse caso, a menor elasticidade dos géis mistos de IPS e GL, submetidos a grandes deformações, pode ser justificada pela organização estrutural com evidente separação de fases dos sistemas, conforme discutido no item 6.6.1. Por outro lado, a intensificação das interações intermoleculares entre os biopolímeros de mesma natureza, dentro de cada uma das fases, possivelmente reduziu os efeitos dessa descontinuidade estrutural sobre as propriedades de ruptura dos géis mistos, que apresentaram, por tanto, valores de tensão e deformação de ruptura estatisticamente iguais aos sistemas com formulação G1.

Além de permitirem o estudo comparativo das características dos géis não-carregados, os resultados disponíveis na Figura 63 permitiram a avaliação dos efeitos da incorporação de MLS nas propriedades de grande deformação dos sistemas produzidos com formulações G1, G2 e G3. Como discutido anteriormente, na maior parte das pesquisas envolvendo géis carregados, os autores classificam as partículas como ativas ou inativas a partir da análise dos

resultados de compressão uniaxial dos diferentes sistemas (DICKINSON; CHEN, 1999; OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; SALA et al., 2007; SALA et al., 2009a,b ; VAN VLIET, 1988). Segundo a literatura, enquanto a adição de partículas inativas leva a uma redução no valor de E_g , um aumento ou diminuição na deformação de ruptura (ϵ_H) e uma diminuição na tensão de ruptura (σ_H) dos géis, a adição de partículas ativas pode levar a um aumento ou diminuição no valor de E_g , a uma diminuição da ϵ_H e um aumento da σ_H (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015). Embora essa generalização exista e seja amplamente aceita, a interpretação dos resultados de testes de compressão uniaxial de géis carregados é muito complexa, uma vez que a intensidade de cada um desses efeitos depende de características específicas dos diferentes géis carregados.

No presente trabalho, os resultados disponíveis na Figura 63 mostraram que a incorporação de MLS resultou em aumentos nos valores de E_g , σ_H e ϵ_H para os três sistemas analisados (embora o aumento de E_g para géis com formulação G1 não tenha sido estatisticamente significativa ($p>0,05$)). Apesar de tais comportamentos não se enquadrarem perfeitamente em nenhum dos padrões discutidos anteriormente, eles indicaram que as MLS de estearina de palma estabilizadas com tween 80 e span 80 agiram como partículas ativas nos géis carregados, assim como verificado a partir dos resultados dos testes de varredura de frequência e dos testes de fluência e recuperação.

Como citado anteriormente, os aumentos dos valores de E_g e de σ_H , verificados na Figura 63, são geralmente associados a incorporações de partículas ativas em géis carregados. Por outro lado, adições de tais partículas geralmente levam a reduções nos valores de ϵ_H dos sistemas, e não a aumentos, como verificado no presente trabalho.

Diversos autores afirmam que tais reduções estão associadas ao comportamento das partículas ativas nos sistemas, que é similar ao de defeitos estruturais (*structural defects/structural breakers*) (LIU et al., 2015; OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015). Segundo Oliver, Scholten e van Aken (2015), como os processos de ruptura tem início em regiões mais fracas das redes gelificadas, defeitos estruturais ou partículas ativas tendem a agir como pontos de concentração de tensão nas matrizes, diminuindo a ϵ_H de sistemas (LIU et al., 2015; OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015). Por outro lado, de acordo com Liu et al. (2015), a extensão deste efeito e, conseqüentemente, da diminuição da ϵ_H , dependem de muitos fatores, tais como o diâmetro, a distribuição e o grau de agregação das partículas nos géis.

Nesse contexto, pode-se afirmar que as MLS agiram como estruturas ativas nos géis carregados com formulações G1, G2 e G3, porém não agiram como pontos de concentração

de tensão, possivelmente devido ao diâmetro reduzido, adequada distribuição e baixo grau de agregação das estruturas nas matrizes gelificadas, verificados nas imagens de MEV (item 6.6.1).

Figura 63 Resultados das análises de compressão uniaxial dos géis carregados e não-carregados com MLS, com formulações G1, G2 e G3. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas iguais (carregados ou não-carregados) produzidos com formulações distintas (G1, G2 ou G3). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas distintos, produzidos com a mesma formulação.

Fonte: Própria autoria

6.6.4.2 Efeito da aplicação de diferentes velocidades de compressão nas propriedades dos géis carregados

Embora os resultados mostrados na Figura 63 tenham sido conclusivos, quando avaliados juntamente com os demais dados obtidos ao longo dessa pesquisa (resultados dos testes de varredura de frequência, fluência e recuperação, MCVL e MEV), as propriedades de deformação de ruptura dos géis carregados apresentaram comportamentos diferentes daqueles

geralmente reportados na literatura (LIU et al., 2015; OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; SALA et al., 2008). Como discutido anteriormente, apesar do efeito observado ter sido possivelmente resultado da distribuição e do tamanho das partículas, ele levantou algumas dúvidas quanto às características das interações das MLS com as matrizes dos géis. A interpretação e discussão desses resultados foram ainda mais desafiadoras devido à ausência de pesquisas relacionadas à adição de emulsões estabilizadas com os tensoativos tween 80 e span 80 para a produção de géis carregados.

Nesse contexto, buscando uma melhor compreensão do efeito da incorporação de MLS nas propriedades de grande deformação dos géis com formulações G1, G2 e G3, testes de compressão uniaxial foram realizados nos géis carregados utilizando-se outra velocidade de deformação (0,05 mm/s), e os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 64. É importante destacar que os resultados obtidos com velocidade de compressão de 1 mm/s ilustrados na Figura 63, foram repetidos na Figura 64 para a adequada comparação e discussão dos dados.

Comparações de resultados de testes de compressão uniaxial realizados em diferentes velocidades são interessantes por permitirem discussões relacionadas a fenômenos físicos, levando em consideração balanços de energia e fenômenos de concentração de tensões (SALA et al., 2009b).

Como verificado na Figura 64, o aumento da velocidade de compressão resultou em um aumento nos valores de E_g e tensão de ruptura, e uma redução na deformação de ruptura dos géis carregados. Segundo Sala et al. (2009b) esse comportamento é típico de sólidos viscoelásticos, uma vez que nesses sistemas, o aumento da velocidade de compressão leva a um aumento da energia dissipada, que resulta em um aumento de E_g e tensão de ruptura, e uma redução na deformação de ruptura. Além disso, esses resultados mostraram que as MLS estabilizadas com tween 80 e span 80 agiram, de fato, como partículas ativas em todos os sistemas analisados, uma vez que, segundo os mesmos autores, a presença de partículas inativas levaria a um aumento do fenômeno de atrito entre os elementos estruturais do sistema, com o aumento da velocidade de compressão, que resultariam em um grande aumento em ambas as propriedades de ruptura analisadas (tensão e deformação).

Embora a maioria dos estudos encontrados na literatura indique que a incorporação de emulsões estabilizadas com tensoativos não-íonicos em géis proteicos resulta em um grande enfraquecimento dos sistemas, visto que estes compostos interagem apenas fracamente com a matriz gelificada (SALA et al., 2007), a maioria dos autores utiliza apenas Tween 20 em suas investigações (CHEN et al., 2000; DICKINSON; HONG, 1995; SALA et al., 2007) e

generaliza a explicação para os outros tensoativos de mesma natureza, ignorando, muitas vezes, as especificidades dos diferentes sistemas, que são fundamentais para a compreensão das propriedades, e que tornam as discussões desafiadoras.

Figura 64 Resultados das análises de compressão uniaxial dos géis carregados com MLS, com formulações G1, G2 e G3, realizadas com diferentes velocidades de compressão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas produzidos com formulações distintas (G1, G2 ou G3) e analisados com a mesma velocidade de compressão. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas distintos, produzidos com a mesma formulação e analisados com velocidades de compressão distintas.

Fonte: Própria autoria

6.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS GÉIS CARREGADOS COM MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ENCAPSULANDO CURCUMINA

6.7.1 Colorimetria instrumental

O crescente interesse da indústria de alimentos na aplicação de ingredientes com propriedades bioativas em suas formulações, tais como a curcumina, está associado às novas

exigências do mercado consumidor, que vem optando por produtos mais saudáveis e com elevada qualidade sensorial.

Embora tais substituições de corantes artificiais por curcumina sejam consideradas alternativas promissoras, elas devem ser realizadas de forma cuidadosa, uma vez que processos de oxidação do bioativo podem levar a alterações indesejáveis na cor dos produtos e afetar, por exemplo, a sua aceitação sensorial. Tais alterações sensoriais podem ser monitoradas através da aplicação de técnicas de colorimetria instrumental, que permitem uma caracterização precisa da cor das amostras e podem ser utilizadas como ferramentas interessantes para a quantificação indireta do teor de pigmentos em produtos alimentícios (PATHARE et al., 2013).

Nesse contexto, considerando-se o interesse no estudo da estabilidade da curcumina encapsulada em géis carregados, com formulações G1, G2 e G3, os sistemas foram produzidos e submetidos a análises preliminares para a determinação do aspecto visual e análises de colorimetria instrumental.

As aparências dos géis não-carregados (curcumina livre) e carregados com MLS (curcumina encapsulada), produzidos com formulações G1, G2 e G3, estão mostradas nas Figuras 65 e 66, respectivamente, e os resultados dos ensaios de colorimetria instrumental, realizados no primeiro dia de estocagem na Tabela 14.

Figura 65 Aspecto visual dos géis não-carregados contendo curcumina livre, com formulações G1, G2 e G3

Fonte: Própria autoria

Figura 66. Aspectos visuais dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina, com formulações G1, G2 e G3

Fonte: Própria autoria

Tabela 14. Resultados dos ensaios de colorimetria instrumental dos géis não-carregados contendo curcumina livre e géis carregados com MLS encapsulando curcumina no primeiro dia de estocagem

Formulação	Amostra	Parâmetro					
		a*	b*	L*	C*ab	h°	DTC
G1	Curcumina livre	-8,28 ± 0,46 ^{aA}	48,37 ± 2,98 ^{aB}	56,27 ± 1,66 ^{aB}	49,02 ± 3,01 ^{aB}	99,80 ± 0,29 ^{bA}	18,80 ± 1,66 ^a
	Curcumina encapsulada	-8,74 ± 0,40 ^{aB}	61,77 ± 2,03 ^{aA}	69,20 ± 1,45 ^{aA}	62,38 ± 2,05 ^{aA}	98,40 ± 0,26 ^{aB}	0
G2	Curcumina livre	-8,26 ± 0,45 ^{aA}	46,56 ± 2,98 ^{aB}	57,49 ± 1,22 ^{aB}	47,32 ± 2,60 ^{aB}	100,18 ± 0,24 ^{bA}	19,07 ± 1,70 ^a
	Curcumina encapsulada	-8,45 ± 0,44 ^{aA}	62,02 ± 1,91 ^{aA}	67,24 ± 0,54 ^{aA}	62,68 ± 1,94 ^{aA}	97,90 ± 0,28 ^{bB}	0
G3	Curcumina livre	-8,99 ± 0,45 ^{aB}	46,66 ± 1,71 ^{aB}	58,23 ± 1,44 ^{aB}	47,47 ± 1,73 ^{aB}	100,58 ± 0,42 ^{bA}	16,98 ± 1,02 ^b
	Curcumina encapsulada	-8,16 ± 0,75 ^{bA}	61,45 ± 3,83 ^{aA}	67,35 ± 0,24 ^{aA}	61,99 ± 3,90 ^{aA}	97,55 ± 0,25 ^{cB}	0

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas iguais (carregados com curcumina encapsulada ou não-carregados com curcumina livre) com formulações distintas (G1, G2 ou G3). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas distintos, produzidos com a mesma formulação.

Fonte: Própria autoria

Como verificado na Figura 65, a adição de curcumina aos géis não-carregados resultou na formação de sistemas com cor amarronzada e com aspectos de géis não sustentáveis. O evidente enfraquecimento das estruturas na presença de curcumina não encapsulada (curcumina livre) pode ter sido ocasionado pela complexação do bioativo com o IPS utilizado para a produção dos géis. Segundo a literatura, as moléculas de curcumina são capazes de se ligar às regiões não polares do IPS por meio de interações hidrofóbicas, formando complexos, e as consequências dessas interações dependem das concentrações e proporções de cada componente (TAPAL; TIKU, 2012). Em seu trabalho, Tapal e Tiku (2012) verificaram que a complexação de curcumina e IPS resultou em aumentos expressivos na solubilidade e na estabilidade do bioativo em questão, porém os autores aplicaram elevadas concentrações de curcumina e reduzidas concentrações de IPS, em dispersões. No presente trabalho, porém, as diferentes propriedades dos sistemas e diferentes proporções de IPS e curcumina fizeram com que as consequências das complexações fossem completamente distintas das verificadas por Tapal e Tiku (2012). Devido à presença de baixas concentrações de curcumina e elevadas concentrações de IPS, o processo de complexação possivelmente resultou na redução do grau de exposição dos grupos reativos das proteínas e, consequentemente, na redução das interações proteína-proteína, necessárias para a formação da rede gelificada com aspecto forte. Além disso, nos casos dos sistemas produzidos com formulações G2 e G3, tal

complexação provavelmente alterou as taxas de gelificação e separação de fases, levando a um enfraquecimento das estruturas formadas.

Além do aspecto fraco dos sistemas, a cor amarronzada dos géis com curcumina livre também destacou a importância da encapsulação deste composto, devido a elevada instabilidade da curcumina frente às alterações de pH e temperatura necessárias para a produção de tais amostras. De acordo com a literatura, moléculas de curcumina são instáveis em pHs básicos e neutros, e nessas condições, tendem a apresentar uma rápida decomposição em compostos como a vanilina e o ácido ferúlico (KUMAVAT et al., 2013). Segundo Bernabé-Pineda et al. (2004), a desprotonação das moléculas de curcumina em pH neutro, utilizado para a produção dos géis em questão, resultam na formação de compostos de coloração avermelhada, que na presença do IPS (de cor amarelada) resultaram na obtenção de sistemas com cor amarronzada.

As diferenças de cor dos géis contendo curcumina encapsulada e não encapsulada foram evidenciadas pelos resultados dos testes de colorimetria instrumental, disponíveis na Tabela 14. Esses resultados mostraram que a decomposição da curcumina não encapsulada, bem como os possíveis processos de complexação do bioativo com o IPS, tiveram impacto em todos os parâmetros colorimétricos analisados, porém as maiores alterações foram verificadas nos valores de b^* e L^* . Segundo a literatura, valores de b^* representam variações de cor entre tons azulados (b^* negativo) e tons amarelados (b^* positivo). Nesse contexto, verificou-se que os géis com curcumina livre apresentaram tons menos amarelados que os sistemas com curcumina encapsulada, evidenciando a redução da concentração do bioativo de cor amarela intensa, decorrente de processos oxidativos acelerados. Além disso, os menores valores de L^* indicaram que a decomposição da curcumina livre resultou em amostras com reduzida luminosidade (PATHARE et al., 2013).

Como esperado, as diferenças entre os valores de a^* , b^* e L^* para as diferentes amostras também refletiram nos valores de croma (C^*ab), ângulo de Hue (h°) e, principalmente, de diferença total de cor (DTC), calculado a partir da comparação entre os parâmetros a^* , b^* e L^* dos géis não-carregados (curcumina livre) e dos géis carregados (curcumina encapsulada).

Como verificado na Figura 66, os géis carregados contendo curcumina encapsulada apresentaram aspecto de géis sustentáveis fortes e cor amarela intensa, característica da curcumina. A estabilidade do bioativo encapsulado nesses sistemas foi monitorada durante 60 dias de armazenamento por meio de testes de colorimetria instrumental. Os valores de a^* , b^* e

L* obtidos para as diferentes formulações ao longo do período analisado estão disponíveis na Figura 67.

Os resultados representados na Figura 67(A) mostraram que, para todas as formulações, os valores de a^* permaneceram negativos em todo o período armazenamento, indicando a presença de tons esverdeados nas amostras. Segundo a literatura, o parâmetro a^* pode assumir valores negativos na presença de tons esverdeados e positivos na presença de tons avermelhados (PATHARE et al., 2013).

Por meio da comparação dos resultados obtidos a partir de diferentes amostras, nos mesmos dias de armazenamento, verificou-se que nos dias 1, 3, 7 e 15, as amostras produzidas com formulação G3 apresentaram os maiores valores de a^* , enquanto no dia 30, os maiores valores foram obtidos a partir de sistemas com formulação G1. Por outro lado, após 60 dias de armazenamento, os géis carregados com formulação G3 apresentaram os menores valores desse parâmetro em comparação aos demais géis. Assim, pode-se dizer que, dentre os diferentes sistemas analisado, os géis produzidos com IPS e GL apresentaram os tons menos esverdeados, no início do período analisado, e os tons mais esverdeados após 60 dias de estocagem.

Embora essas observações sejam interessantes, avaliações das variações de a^* em amostras de mesma formulação (G1, G2 ou G3) ao longo do período estocagem, mostraram-se ainda mais importantes, uma vez que permitiram a análise das alterações dos tons esverdeados e amarelados dos sistemas, decorrentes da oxidação da curcumina ao longo dos 60 dias analisados. Nesse sentido, verificou-se que para os géis carregados com formulação G1, os valores de a^* começaram a aumentar significativamente ($p < 0,05$), em comparação ao dia 01, após 30 dias de estocagem, já para as formulações G2 e G3 esse comportamento só foi verificado após os dias 40 e 50, respectivamente. Os aumentos dos valores de a^* verificados mostraram que, durante o período de estocagem, as amostras apresentaram aumentos de tons avermelhados, relacionados, possivelmente, ao aumento da concentração dos produtos da oxidação da curcumina (vanilina e o ácido ferúlico), que tendem a conferir cor vermelha aos sistemas (KUMAVAT et al., 2013).

Por outro lado, os resultados representados na Figura 67(B) mostraram que, para todas as formulações, os valores de b^* permaneceram positivos em todo o período analisado, indicando a presença de tons amarelados nas amostras. Como citado anteriormente, o parâmetro b^* pode assumir valores negativos na presença de tons azulados e positivos na presença de tons amarelados.

A partir da comparação dos resultados obtidos para diferentes amostras, no mesmo dia de armazenamento, foi verificado que nos dias em que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as formulações (3, 22, 30, 40 e 50), os géis mistos apresentaram os menores valores de b^* , especialmente aqueles produzidos com formulação G2.

Por outro lado, a partir da avaliação dos valores de b^* obtidos para uma mesma formulação, em diferentes dias de estocagem, verificou-se que para os géis carregados com formulação G1, variações significativas ($p < 0,05$) nesse parâmetro só foram verificadas a partir do dia 22 de estocagem. Inicialmente verificou-se um aumento no dia 22, seguindo de reduções contínuas até o dia 60, no qual a média dos valores de b^* foi inferior àquela verificada no dia 01. Comportamento semelhante foi verificado em sistemas produzidos com formulação G3, embora nesse caso, a média verificada no dia 60 era estatisticamente igual àquela verificada no dia 01. Por outro lado, em sistemas produzidos com formulação G2, menores variações de b^* foram verificadas, e valores estatisticamente superiores ao dia 01 foram verificados apenas nos dias 22 e 30. As menores reduções de b^* para amostras com formulação G2, em comparação às demais amostras, indicaram que tais sistemas apresentaram menores perdas da cor amarela (característica da curcumina) ocasionadas pelo processo oxidativo desse bioativo.

Outro parâmetro muito importante monitorado no presente trabalho foi L^* , que, segundo a literatura, representa a luminosidade da amostra. Os resultados disponíveis na Figura 67(C) mostraram que, nos dias em que diferenças estatisticamente significativas ($0,05$) foram observadas (7, 15, 22, 30 e 40), os géis mistos apresentaram menores valores de L^* . Por outro lado, diferentemente dos demais parâmetros, os valores de L^* variaram de forma semelhante para as três formulações estudadas, ao longo do período de armazenamento, apresentando uma redução significativa ($p < 0,05$) apenas entre os dias 50 e 60 de estocagem, indicando uma diminuição da luminosidade das amostras possivelmente decorrente do processo oxidativo da curcumina.

Como esperado, os comportamentos dos parâmetros a^* , b^* e L^* também refletiram nos valores de croma (C^*ab), ângulo de Hue (H°) e diferença total de cor (DTC).

A partir da análise dos valores de croma, disponíveis na Figura 68(A), verificou-se que, nos dias em que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (3, 22, 40 e 50), os géis mistos, especialmente aqueles produzidos com GX, apresentaram os menores valores de C^*ab . Assim como citado anteriormente, embora essa discussão seja interessante, as comparações dos valores obtidos para uma mesma amostra em diferentes dias de armazenamento são fundamentais.

A partir da análise de géis carregados com formulação G1 verificou-se que um aumento significativo no valor de C^*ab foi verificado no dia 22 de estocagem, seguindo de reduções contínuas até o dia 60, no qual a média dos valores de C^*ab foi inferior àquela verificada no dia 01. Comportamento semelhante também foi verificado em sistemas produzidos com formulação G3, embora nesse caso, a média verificada no dia 60 também era estatisticamente igual àquela verificada no dia 01. Já em sistemas produzidos com formulação G2, menores variações de C^*ab foram verificadas, e valores estatisticamente superiores ao dia 01 foram verificados apenas nos dias 22 e 30. Assim, considerando que, croma é um parâmetro quantitativo que indica a intensidade da cor perceptível ao olho humano, pode-se afirmar que as menores variações de cor perceptíveis a olho humano ocorreram nos géis carregados produzidos com IPS e GX (formulação G2).

O ângulo de Hue, por outro lado, é considerado um atributo qualitativo de cor, e está relacionado com as diferenças na absorbância em diferentes comprimentos de onda. De acordo com a literatura, ângulos de 90° , 180° e 270° representam, respectivamente, as cores: amarela, verde e azul. Nesse contexto, os resultados de ângulo de Hue, mostrados na Figura 68(B) indicaram que todas as amostras apresentaram uma cor amarelo-esverdeado, característica da curcumina, durante todo o período de armazenamento (LOPEZ et al., 1997, PATHARE et al., 2013). A partir da comparação dos valores obtidos para diferentes amostras, nos mesmos dias de armazenamento, verificou-se que géis carregados produzidos com formulação G3 apresentaram os menores valores de ângulo de Hue nos dias 1, 3, 7 e 15, porém nos demais dias não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Por outro lado, a partir da comparação dos valores obtidos para as mesmas amostras em diferentes dias de armazenamento, verificou-se que, em sistemas com formulação G1, reduções significativas ($p < 0,05$) de h° ocorreram a partir do dia 22, enquanto em sistemas com formulações G2 e G3, essas alterações só foram verificadas a partir dos dias 50 e 60, respectivamente.

Embora todos os parâmetros discutidos anteriormente sejam importantes, os valores de diferença total de cor (DTC), disponíveis na Figura 68(C), são muito importantes uma vez que refletem simultaneamente as alterações verificadas nos parâmetros a^* , b^* e L^* ao longo de todo o período de armazenamento. Segundo a literatura, DTC representa a magnitude da diferença de cor entre amostras armazenadas e das amostras “controle” (neste caso, géis carregados com MLS contendo curcumina, produzidos com formulações G1, G2 e G3, no primeiro dia de armazenamento). Este parâmetro permite a classificação analítica das cores

como muito distintas ($DTC > 3$), distintas ($1,5 < DTC < 3$) e cores com pequena diferença ($DTC < 1,5$) (ADEKUNTE et al., 2010). Nesse contexto, os resultados mostrados na Figura 68(C) mostraram que géis carregados com formulação G2 apresentaram cores distintas até o dia 15 de estocagem e muito distintas a partir do dia 22, já sistemas com formulações G1 e G3 apresentaram cores muito distintas já a partir do dia 15. É importante destacar que as maiores variações de cor foram verificadas em amostras produzidas com formulações G1, seguido por G3 e por último G2. Os aumentos das médias verificados nos dias 22 e 30, seguidos de reduções de DTC, bem como os aumentos dos desvios padrões das análises indicaram que as amostras se encontravam muito heterogêneas após o dia 22 de estocagem. Tal heterogeneidade pode ter sido causada por alterações estruturais nos géis carregados.

Segundo Renard, van de Velde e Visschers (2006), as ligações e interações existentes na estrutura dos géis são geralmente alteradas ao longo do período de armazenamento, tanto espontaneamente, quanto devido a forças externas. Tais mudanças podem acarretar em modificações na estrutura dos sistemas, nas suas propriedades reológicas e na sua capacidade de retenção de água, por exemplo. Sendo assim, as alterações de cor, decorrentes de uma redução da estabilidade da curcumina encapsulada, verificados a partir do dia 22 de estocagem, podem estar possivelmente relacionadas com alterações estruturais dos sistemas, decorrentes do processo de envelhecimento (*ageing*). Para a avaliação das consequências de tais alterações estruturais nas propriedades de textura e na capacidade de retenção de água, os géis carregados produzidos com formulações G1, G2 e G3 foram submetidos a análises de TPA e CRA em diferentes dias de armazenamento, e os resultados estão discutidos no item 6.7.2.

Figura 67 Resultados dos ensaios de colorimetria instrumental dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem.

(A)

(B)

(C)

Fonte: Própria autoria

Figura 68 Resultados dos ensaios de colorimetria instrumental dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem.

Fonte: Própria autoria

6.7.2 Perfil de textura e capacidade de retenção de água

Como citado anteriormente, as alterações de estabilidade da curcumina encapsulada, verificadas ao longo do período de armazenamento dos géis carregados produzidos com formulações G1, G2 e G3, podem estar relacionadas a alterações estruturais dos sistemas, decorrentes do processo de envelhecimento dos mesmos. De acordo com Renard, van de Velde e Visschers (2006), devido ao seu estado metaestável (do ponto de vista termodinâmico), as estruturas dos géis podem mudar durante o tempo, espontaneamente (i.e. fenômenos de envelhecimento) ou devido a forças externas.

Nesse contexto, para a avaliação do processo de envelhecimento dos géis carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3, os sistemas foram caracterizados em diferentes dias de estocagem, por meio de análises de TPA e avaliações da CRA, e os resultados obtidos estão disponíveis nas Figuras 69 e 70, respectivamente. Embora essas análises não permitam a obtenção de informações detalhadas a respeito das organizações estruturais dos sistemas, elas são interessantes para o desenvolvimento de estudos comparativos das propriedades de textura das amostras ao longo do período de armazenamento, bem como do impacto das alterações estruturais dos géis, decorrentes dos processos de envelhecimento, nas propriedades de interação dos ingredientes com a água.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o processo de envelhecimento dos géis carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3, resultaram em alterações significativas ($p < 0,05$) nas características dos sistemas, principalmente na dureza e na CRA. Embora variações também tenham sido verificadas nos parâmetros elasticidade e coesividade, elas não foram muito pronunciadas e não apresentaram nenhum padrão de comportamento.

Como verificado na Figura 69(A), as alterações estruturais decorrentes do processo de envelhecimento dos sistemas com formulação G1 resultaram em uma redução expressiva da dureza das amostras entre os dias 01 e 03, seguida de um ligeiro aumento entre o 3º e 7º dia de armazenamento. Posteriormente, as alterações levaram a reduções progressivas na dureza dos sistemas até o dia 30.

Por outro lado, as alterações neste parâmetro foram menores para géis carregados produzidos com formulações G2 e G3. Como verificado na Figura 69(A), em ambos os sistemas foram verificados aumentos da dureza entre os dias 1 e 3, e progressivas reduções até o dia 30.

As alterações estruturais resultaram também em aumentos na CRA dos géis com formulações G1 e G2, porém não alteraram significativamente ($p>0,05$) o CRA dos sistemas produzidos com GL.

Para todas as formulações, as alterações estruturais das amostras levaram ao colapso das estruturas entre os dias 30 e 40, que passaram a apresentar aspectos de géis não sustentáveis, impedindo o desenvolvimento de ensaios de TPA e CRA após o 30º dia de armazenamento.

Diferentes estudos encontrados na literatura afirmam que os processos de envelhecimento de géis geralmente envolvem um endurecimento gradual e um aumento da firmeza dos sistemas, como verificado em géis carregados com formulações G2 e G3, entre os dias 1 e 3 de estocagem (CHANG; LEONG, 2014; RENARD; VAN DE VELDE; VISSCHERS, 2006; TEECE et al., 2011). De acordo com Alting et al. (2003), que investigaram as propriedades de géis de isolado proteico de soro de leite, obtidos a frio por acidificação, os aglomerados formados a partir da redução da repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína, na segunda etapa dos processos de gelificação a frio, são geralmente “abertos” e termodinamicamente instáveis, em comparação a aglomerados mais densos. Nesse contexto, as estruturas inicialmente formadas tendem a se rearranjar a partir da formação de ligações dissulfureto covalentes adicionais, que levam a um endurecimento dos sistemas e a formação de géis mais turvos e estruturalmente mais estáveis. Embora tal comportamento tenha sido claramente observado em sistemas com formulações G2 e G3 nos primeiros dias de estocagem, ele não foi expressivo em sistemas com formulação G1, uma vez que pequenos aumentos da dureza dos géis só foram verificados entre os dias 3 e 7, após uma grande redução deste parâmetro entre os dias 1 e 3.

Embora esse processo de endurecimento das amostras seja bem conhecido e reportado na literatura, as reduções de dureza e aumentos da CRA dos sistemas verificadas a partir da intensificação do processo de envelhecimento, bem como o colapso das amostras verificado entre os dias 30 e 40 de estocagem, são extremamente complexos e estão possivelmente relacionados à presença das MLS nos sistemas.

Como mostrado a partir das imagens de MEV (item 6.6.1), no primeiro dia de estocagem, as MLS produzidas com estearina de palma como fase lipídica e estabilizadas com tween 80-span 80 encontravam-se fisicamente ligadas às matrizes dos géis carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3, porém, os rearranjos estruturais dos sistemas durante o processo de envelhecimento das amostras, possivelmente prejudicaram o “ancoramento” dos grupos proteicos e/ou cadeias de polissacarídeos nos espaços existentes na

interface das MLS (discutido no item 6.6.1), diminuindo a resistência e a dureza dos sistemas. Além disso, essas reduções das interações MLS-matriz, provavelmente permitiram um aumento das interações matriz-água, que resultaram, por sua vez, no pequeno aumento de CRA verificado nas amostras com formulações G1 e G2 (Figura 70).

Provavelmente, devido a este processo, após o trigésimo dia de armazenamento, as MLS passaram a agir como partículas inativas, não interagindo com a matriz. Nesse contexto, tais estruturas passaram a apresentar o efeito de defeitos estruturais nos géis, reduzindo drasticamente as interações proteína-proteína e resultando na obtenção de uma rede descontínua com aspecto mais líquido.

Recentemente, diferentes pesquisadores relataram o colapso de géis decorrentes dos processos de envelhecimento (BARTLETT; TEECE; FAERS, 2012; BUSCALL et al. 2009; CHANG; LEONG, 2014; TEECE et al. 2011). Em sua pesquisa, Teece et al. (2011) explicaram que, durante os mecanismos de envelhecimento dos géis, as redes relativamente estáveis e capazes de suportar seu próprio peso (no presente trabalho indentificadas como géis sustentáveis), começam a ceder e a exibir interfaces em sua microestrutura. Posteriormente tais interfaces começam a crescer suavemente, conforme os géis encolhem-se/contraem-se e um colapso repentino é observado quando as separações de fases nas estruturas são praticamente completas, e, nesses casos, as interfaces se encontram em estados de equilíbrio finais (TEECE et al., 2011).

De acordo com esses mesmos autores, o colapso é uma das manifestações macroscópicas mais drásticas do processo de envelhecimento e requer uma maior atenção de pesquisadores, especialmente porque uma previsão quantitativa da estabilidade dos géis é fundamental para o desenvolvimento de diversas formulações alimentícias.

Embora no presente trabalho o colapso das estruturas tenha sido observado, os géis carregados não apresentaram um encolhimento contínuo, mas sim uma alteração gradual que resultou em diminuição da dureza. Nesse contexto, os resultados destacaram a importância da investigação do processo de envelhecimento de géis carregados, especialmente considerando a complexidade e as especificidades dos diferentes sistemas e a ausência de estudos que abordem essa questão.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que embora as alterações estruturais decorrentes do envelhecimento dos géis carregados durante o período de armazenamento analisado tenham conduzido ao colapso dos sistemas, evidenciando a necessidade de melhorias nas formulações, a elevada estabilidade da curcumina encapsulada até ao 15º dia de armazenamento e a taxa relativamente baixa de alterações de cor até ao 30º

dia, indicaram que a encapsulação deste bioativo em MLS incorporadas em géis carregados pode ser considerada uma potencial alternativa para futuras substituições de corantes artificiais em sistemas alimentícios gelificados.

Figura 69 Resultados dos ensaios de TPA dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem.

(C)

Fonte: Própria autoria

Figura 70 CRA dos géis carregados com MLS encapsulando curcumina em diferentes dias do período de armazenamento. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com diferentes formulações (G1, G2 ou G3), no mesmo dia de estocagem.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) para sistemas com a mesma formulação (G1, G2 ou G3) em diferentes dias de estocagem.

Fonte: Própria autoria

7 CONCLUSÕES

Considerando-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas que reduzam os problemas de formulação e bioacessibilidade da curcumina e permitam sua aplicação em larga escala, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram-se interessantes uma vez que permitiram o estudo da encapsulação desse bioativo em MLS em diferentes sistemas: dispersões e géis carregados, produzidos com diferentes formulações.

Inicialmente, a aplicação combinada de tween 80 (1,8 % m/m) e span 80 (2,7 % m/m) para a estabilização de MLS de estearina de palma (4,5 % m/m) mostrou-se extremamente eficiente, uma vez que resultou em sistemas com elevada estabilidade e elevada capacidade de proteção da curcumina encapsulada. Tais resultados foram interessantes, principalmente considerando que o método de produção das partículas não envolveu processos de homogeneização a alta pressão, o que facilita o escalonamento do processo para níveis industriais. Além disso, a elevada estabilidade das MLS foi fundamental para a posterior aplicação dessas estruturas para a produção de géis carregados de IPS, na presença e ausência de polissacarídeos.

Embora o estudo das melhores condições para a produção das MLS tenha sido relativamente simples, o processo de seleção das melhores formulações de géis de IPS e géis biopoliméricos mistos, obtidos a frio, para o desenvolvimento do estudo comparativo, foi

desafiador, devido às propriedades do IPS comercial, que apresentou baixas solubilidades em pHs ácidos e neutros (entre 7% e 32%), geralmente aplicados em produtos alimentícios.

Considerando o reduzido número de estudos que investigam as propriedades funcionais de IPS comerciais, os resultados obtidos a partir das caracterizações do ingrediente em questão foram esclarecedores, uma vez que evidenciaram os reais desafios enfrentados pela indústria de alimentos para a aplicação desse ingrediente.

A partir dos estudos das melhores condições para a produção dos géis de IPS e géis biopoliméricos mistos, carregados e não-carregados, três formulações foram selecionadas para o desenvolvimento da pesquisa: formulação G1 (15% IPS, 10 mM CaCl_2 , na ausência de polissacarídeos), formulação G2 (15% IPS, 0,1% GX e 5 mM de CaCl_2) e formulação G3 (15% IPS, 0,2% GL e 15 mM CaCl_2), todas em pH 7 e pré-aquecidas a 80 °C por 30 minutos. A produção de sistemas carregados com aspectos de géis sustentáveis fortes foi possível a partir da substituição de 75% da água dos sistemas por dispersões de MLS

Os resultados dos ensaios de perfil de textura, avaliações da capacidade de retenção de água, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal de varredura a laser e ensaios reológicos de pequena e grande deformação, mostraram que a presença dos diferentes polissacarídeos (goma xantana e goma locusta) alterou de formas distintas a organização estrutural e as propriedades dos géis de IPS, porém, em ambos os casos, as interações entre os biopolímeros resultaram no fortalecimento das estruturas formadas.

Além disso, foi verificado que nos géis carregados, produzidos com formulações G1, G2 e G3, as MLS aparentavam estar fisicamente ligadas às matrizes, possivelmente devido ao ancoramento de grupos proteicos e/ou cadeias de polissacarídeos nos espaços existentes na interface formada por tween 80 e span 80, resultantes dos diferentes tamanhos das cabeças polares desses tensoativos. Os resultados dos ensaios reológicos de pequenas e grandes deformações revelaram que tais interações entre as MLS e matrizes gelificadas aumentaram a força dos sistemas, confirmando que as partículas se encontravam ativas nos géis carregados produzidos com as diferentes formulações.

A partir do estudo da estabilidade da curcumina encapsulada nos diferentes sistemas, verificou-se que, o bioativo encapsulado em MLS em dispersão apresentou elevada estabilidade ao longo dos 60 dias de armazenamento, por outro lado, em géis carregados, a estabilidade da curcumina foi reduzida após 15 dias de estocagem. Esses resultados estão possivelmente relacionados às alterações estruturais dos géis carregados, verificados a partir de análises de perfil de textura e capacidade de retenção de água, que levaram ao colapso dos sistemas entre os dias 30 e 40 de armazenamento.

Embora as alterações estruturais decorrentes do envelhecimento dos géis carregados durante o período de armazenamento analisado tenham conduzido ao colapso dos sistemas, evidenciando a necessidade de melhorias nas formulações, a elevada estabilidade da curcumina encapsulada até ao 15º dia de armazenamento e a taxa relativamente baixa de alterações de cor até ao 30º dia, indicaram que a encapsulação deste bioativo em MLS incorporadas em géis carregados pode ser considerada uma potencial alternativa para futuras substituições de corantes artificiais em sistemas alimentícios gelificados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHYANKAR, A.R.; MULVIHILL, D.M., AUTY, M.A.E. Combined confocal microscopy and large deformation analysis of emulsion filled gels and stirred acid milk gels. **Food structure**, Amsterdam v. 1, n. 2, p. 127 – 136, 2014.

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

ABRAMOWITZ, M.; STEGUN, I. A. **Handbook of mathematical functions with formulas, graphs and mathematical tables**. New York: Dover Publications, Inc. 1964

ADEKUNTE, A. et al. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 122, n. 3, p. 500–507, 2010

ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R.M. Qualidade de fruto da aceroleira cv. Olivier em dois estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, Volume Especial, p. 541-545, 2011.

AIDER, M.; DJENANE, D.; OUNIS, W.D. Amino acid composition, foaming, emulsifying properties and surface hydrophobicity of mustard protein isolate as affected by pH and NaCl. **International Journal of Food and Technology**, Chester, v. 47, n. 5, p. 1028–1036, 2012.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, New York, v. 8, n. 1, p. 102 – 110, 2013.

ALTING, A. C. **Cold gelation of globular proteins**. 2003. 129 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Wageningen, Wageningen. 2003.

ALVAREZ et al. A rheological characterisation of mashed potatoes enriched with soy protein isolate. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 133, n. 4, p. 1274–1282, 2012.

ANAND, P. et al. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANUCHAPREEDA, S. et al. Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy. **Journal of Nanotechnology**, Cairo v. 41, p. 1-11. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 326 de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association Chemistry**, Washington, D. C., A.O.A.C., 1997.

ARRESE, E. L. et al. Eletrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 6, p.1029-1032, 1991.

BADLEY, R. A. et al. The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 412, n. 2, p. 214-228, 1975.

BARAK, S; MUDGIL, D. Locust bean gum: Processing, properties and food applications - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, New York, v. 66, p. 74–80, 2014.

BARBUT, S. Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. **Food Research International**, Great Britain, v. 28, n. 5, p. 437- 443, 1995.

BARUI, S. et al. Simultaneous delivery of doxorubicin and curcumin encapsulated in liposomes of pegylated RGDK-lipopeptide to tumor vasculature. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 35, n. 5, p. 1643-1656, 2014.

BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 6, p. 4567-4598, 2011.

BARTLETT, P.; TEECE, L.J.; FAERS, M.A. Sudden collapse of a colloidal gel. **Physical Review E**, Maryland, v. 85 n. 2, p. 1-14, 2012.

BAYRAK, O. et al. Curcumin protects against ischemia/ reperfusion injury in rat kidneys. **World Journal of Urology**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 285-291, 2008.

BEMILLER, J.N.; HUBER, K.C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química dos Alimentos de Fennema**. 4.Ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 3.

BERNABÉ-PINEDA, M. et al. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 1091–1097, 2004.

BERTRAND, M.; TURGEON, S.L. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 159-166, 2007.

BEUSCHEL, B. C. et al. Gelation and emulsification properties of partially insolubilized whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 3, p. 605-609, 1992.

BI, C. et al. Effect of LBG on the gel properties of acid-induced SPI gels. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 75, p. 1-8., 2007.

BLIGH, E.G., DYER, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BRAGA, A. L. M. et al. Interactions between soy protein isolate and xanthan in heat-induced gels: the effect of salt addition. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1178-1189, 2006.

BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 4-6, p. 609-617, 2001.

BRYANT, C.M.; MCCLEMENTS, D.J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat denatured whey. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 9, n. 4, 143–151, 1998.

BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D.J. Influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 5, p. 801–804, 2000.

BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D.J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 383–390, 2000.

BOLDER, S. et al. Ca²⁺-induced cold-set gelation of whey protein isolate fibrils. **Applied Rheology**, Lappersdorf v. 16, n. 5, p. 258-264, 2006.

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

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 62-66, 1978.

BUNJES, H; KOCH, M.H.J.; WESTESEN, K. Influence of Emulsifiers on the Crystallization of Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Columbus, v. 92, n. 7, 2003.

BUSCALL, R. et al. Towards rationalising collapse times for the delayed sedimentation of weakly-aggregated colloidal gels. **Soft Matter**, Weinheim, v. 5, p. 1345–1349, 2009.

CAVALLIERI, A.L.F. **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

CAVALLIERI, A.L.F.; CUNHA, R. L. The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 439–448, 2008.

CAVALLIERI, A. L. F.; CUNHA, R. L. Cold-set whey protein gels with addition of polysaccharides. **Food Biophysics**, New York, v. 4, n. 2, p. 94-105, 2009.

CHANG, W.; LEONG, Y. Ageing and collapse of bentonite gels—effects of Li, Na, K and Cs ions. **Rheologica Acta**, Berlim, v. 53, p. 109–122, 2014.

CHANG, Y. et al. Effect of gums on the rheological characteristics and microstructure of acid-induced SPI-gum mixed gels. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 108, p. 183–191, 2014.

CÈSARO, A. et al. Thermodynamic Behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 388, n. 1-2, p. 143-153, 1999.

CHEFTEL, J. C., CUQ, J. L., LORIENT, D. Aminoácidos, péptidos y proteínas. In: FENNEMA, O.R. **Química de los Alimentos**. Zaragoza, España. Ed. Acribia, 1993. Cap. 5, p. 275-414.

CHEN, J.; DICKINSON, E. Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels. **Journal of Texture Studies**, Oxford, v. 29, p. 285-304, 1998.

CHEN, J.; DICKINSON, E.; EDWARDS, M. Rheology of acid induced sodium caseinate stabilized emulsion gels. **Journal of Texture Studies**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 377-396, 1999.

CHEN, W.S.; SOUCIE W.G. The Ionic Modification of the Surface Charge and Isoelectric Point of Soy Protein. **JAACS**, Berlim, v. 63, n. 10, 1986.

CHEN, J. et al. Mechanical properties and microstructure of heat-set whey protein gels: Effect of emulsifiers. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 33, p. 299–307, 2000.

CHEN, L. et al. Encapsulation of curcumin in recombinant human H-chain ferritin increases its water-solubility and stability. **Food Research International**, Great Britain, v. 62, p. 1147–1153, 2014.

CHOUDHURI, T. et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 512, n. 1-3, p. 334–340, 2005.

CHOJNICKA, A. et al. The interactions between oil droplets and gel matrix affect the lubrication properties of sheared emulsion-filled gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, p. 1038-1046, 2009.

CHOJNICKA-PASZUN, A.; DOUSSINAULT, S.; DE JONGH, H.H.J. Sensorial analysis of polysaccharide gelled protein particle dispersions in relation to lubrication and viscosity properties. **Food Research International**, Great Britain, v. 56, p. 199–210, 2014.

CLARK, A. H. et al. Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Nova Jersey v. 17, p. 380-392, 1981.

DAKIA, P.A. et al. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 807–818, 2008.

DAMODARAN, S. Food proteins: An overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed). **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997. Cap. 1, p.1-24.

DAMODARAN, S. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In: KINSELLA, J. E.; SOUCIE, W. G. **Food Proteins**. Urbana: The Americam Oil Chemists' Society. 1989. Cap. 3, p. 21-51.

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

DAVID, S. A.; KATAYAMA, A. H. Fractional order for food gums: modeling and simulation. **Applied Mathematics**, Hubei Province, v. 4, p. 305-309, 2013.

DAVIES, R.; GRAHAM, D.E.; VINCENT, B.. Water-Cyclohexane-"Span 80"-"Tween 80" Systems: Solution Properties and Water/Oil Emulsion Formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam v. 116, n. 1, 1987.

DEA, I. C. M. et al. Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems. **Carbohydrate Research**, New York, v. 57, p. 249–272, 1977.

DELÉAGE, G.; GEOURJON, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 2, p. 197-199, 1993.

DICKINSON, E. Protein–polysaccharide interactions in food colloids. In E. DICKINSON; WALSTRA. **Food colloids and polymers: Stability and mechanical properties**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993, p. 77–93.

DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 347–354, 1998.

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.

DICKINSON, E.; CHEN, J. Heat-set whey protein emulsion gels: Role of active and inactive filler particles. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 20, n.1-2, p. 197–213, 1999.

DICKINSON, E.; HONG, S.T. Influence of water-soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein stabilised emulsion gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 2560–2566, 1995.

DINIZ, A.C.P. **Geleificação a frio de isolados protéicos de soja**. Tese (Doutorado) – Departamento de alimentos e nutrição. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

DOLZ, M.; HERNÁNDEZ, M. J.; DELEGIDO, J. Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, p. 421-427, 2008.

EKAMBARAM, P. et al. Solid lipid nanoparticles: a review. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, Hampshire, v. 2, n. 1, p. 80-102, 2012.

FERRARI, R. A., DEMIATTI, I.M. Isoflavona de soja uma breve revisão. **Biological and Health Sciences**, Paraná v. 7, n. 7, p. 39-46, 2001.

FOEGEDING, E.A.; DAVIS, J.P. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1853 - 1864., 2011.

FOEGEDING, E. A. et al. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 13, n. 5, p.151-159, 2002.

FUKUSHIMA, D. Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. **Foods and Biotechnology**, v. 8, n. 2-3, p. 83-135, 1994.

FUKUSHIMA, D. Soy proteins. In: YADA, R.Y. **Proteins in food processing**. New York, CRC Press. 2004. Cap.6, p. 123-145.

GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

GARCIA, M. C. et al. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998.

GARCIA, M. C. et al. Composition and characterization of soybean and related products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.37, n.4, p.361-391, 1997.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 75, n. 4, p. 789-809, 2008.

GOSAL, W. S., ROSS-MURPHY, S. B. Globular protein gelation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, London, v. 5, n 3-4, p.188-194, 2000.

GOTA, V.S. et al. Safety and pharmacokinetics of a solid lipid curcumin particle formulation in osteosarcoma patients and healthy volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n.4, p. 2095-2099, 2010.

GREENFIELD, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, New York, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, New York, v. 1, n. 1, p. 311-326, 1949.

GRINBERG, V.Y. ; TOLSTOGUZOV; V.B.. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 145–158, 1997.

GUERRERO, P. et al. 2012). Extrusion of soy protein with gelatin and sugars at low moisture content. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 110, n. 1, p. 53–59, 2012.

HAYAKAWA, S., NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 486-491, 1985.

HELGASON, T. et al. Impact of Surfactant Properties on Oxidative Stability of β - Carotene Encapsulated within Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 17, p. 8033-8040, 2009.

HENDRICKS, D.W. **Water Treatment Unit Processes: Physical and Chemical**. Boca Raton: CRC Press. p. 341.

HERMANSSON, A.M. Soy protein gelation. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, Champaign, v. 63, n. 5, p.658-666, 1986.

HIEMENZ, P.C; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 3ed. Marcel Decker: New York. 1997.

HIGIRO, J. et al. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution: Effect of salt. **Food Research International**, Great Britain, v. 40, n. 4, p. 435–447, 2007.

HIMAWAN, C.; STAROV, V.M.; STAPLEY, A.G.F.. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. **Advances in Colloid and Interface Science**, New York, v. 122, n. 1-3, p. 3-33, 2006.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Ca^{2+} - Induced cold gelation of whey protein isolate: effect of two-stage gelation. **Food Research International**, Great Britain, v. 30, n. 7, 1997, 523-527.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Protein and Salt Effects on Ca^{2+} - Induced Cold Gelation of Whey Protein Isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, 1997, p. 382-385.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Use of cold-set whey protein gelation to improve poultry meat batters. **Poultry Science**, Oxford, v. 78, p. 1074–1078, 1999.

HORNER, D. S. Formation and structure of acidified milk gels. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 9, n. 3-6, p. 261-268, 1999.

HU, H. et al., Effects of ultrasound on structural and physical properties of soyprotein isolate (SPI) dispersions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 647–655, 2012.

HUA,Y.; CUI, S.W. ; WANG, Q. Gelling property of soy protein–gum mixtures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 889–894, 2003.

HUNTER, R.J. **Zeta Potential in Colloid Science: Principles And Applications**. London: Academic Press, 1988.

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

IPSEN, R. Mixed gels made from protein and κ -carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 28, n. 4, p. 337–339, 1995.

JAISHANKAR, A.; MCKINLEY, G. H. A Fractional K-BKZ constitutive formulation for describing the nonlinear rheology of multiscale Complex fluids. **Journal of Rheology**, New York, v. 58, n. 6, p. 1751-1788, 2014.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, New York, v. 45, n. 1, p. 275–282, 1975.

JAUREGUI, C. A.; REGENSTEIN, J. M.; BAKER, R. R. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture, a water-binding property of muscle foods. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 46, p. 1271, 1981.

JEONG, S.H; PARK, J.H; PARK, K. Formulation issues around lipid-based oral and parenteral drug delivery systems. In: WASAN, K.M. (Ed.) **Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery**. New Jersey: Wiley- Interscience, 2007. cap. 2. p. 32–204.

JIANG, J.; CHEN, J.; XIONG, Y.L. Structural and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolate Subjected to Acid and Alkaline pH-Shifting Processes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 16, p. 7576–7583, 2009.

JIMÉNEZ-AVALOS, H.A.; RAMOS-RAMÍREZ, E.G.; SALAZAR-MONTOYA, J.A. Viscoelastic characterization of gum arabic and maize starch mixture using the Maxwell model. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 62, p. 11-18, 2005.

JOHNSON, A.E. Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. **Traffic**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1078-1092, 2005.

JONG, S.; VAN DE VELDE, F. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 1172–1187, 2007.

JONG, S.; JAN KLOK, H.; VAN DE VELDE, F. The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein–polysaccharide cold-set gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 755–764, 2009.

JU, Z.Y.; KILARA, A. Effects of Preheating on Properties of Aggregates and of Cold-Set Gels of Whey Protein Isolate. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3604–3608, 1998.

KALAPATHY, U.; HETTIARACHCHY, N. S.; RHEE, K. C. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 74, n. 3, p. 195-199, 1997.

KARIMI, N.; MOHAMMADIFAR, M.A. Role of water soluble and water swellable fractions of gum tragacanth on stability and characteristic of model oil in water emulsion. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 37, 2014, p. 124–133.

KASRAN, M.; CUI, S. W.; GOFF, H. D. Emulsifying properties of soy whey protein isolate–fenugreek gum conjugates in oil-in-water emulsion model system. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 691–697, 2013.

KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of soy proteins. **Biochimistry and Biophysics Acta**, Amsterdam, v. 624, p. 13-20, 1980.

KIDD, P.M. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 14, n. 3, p. 226–46, 2009.

KIM, K.H.; RENKEMA, J.M.S; VAN VLIET, T. Rheological properties of soybean protein isolate gels containing emulsion droplets. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 295-302, 2001.

KIM, K.S. et al. Changes of glycinin conformation due to pH, heat and salt determined by differential scanning calorimetry and circular dichroism. **International Journal of Food Science and Technology**, New Jersey, v. 39, p. 385–393, 2004.

KIM, S. et al. pH- controlled delivery of curcumin from a compartmentalized solid lipid nanoparticle mesostructured silica matrix. **Journal of Materials Chemistry B**, London, v. 2, n. 45, p. 7910-7917, 2014.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 56, p. 242-258, 1979.

KITAMURA, K. (Ed.). **All about soybeans**. Tokyo: Science Forum. 2010

KRUIF, C.G; TUINIER, R. Polyssacharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 4-6, p. 555-563 , 2001.

KUHN, K.R.; CAVALLIERI, A.L.F; CUNHA, R.L. Cold-set whey protein/flaxseed gum gels induced by mono or divalent salt addition. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1302 – 1310, 2011.

KUHN, K. R.; PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Food Gels. In: TÉLIS, V. R. N. (Org.). **Biopolymer Engineering in Food Processing**. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2012, v. 1, p. 111-144.

KUMAVAT, S.D. et al. Degradation studies of curcumin. **International Journal of Pharmacy Review & Research**, v. 3, n. 2, p. 50-55, 2013.

KUWAJIMA, K. The Molten Globule State as a Clue for Understanding the Folding and Cooperativity of Globular-Protein Structure. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, New Jersey, v. 6, p. 87-103, 1989.

LA TORRE, L.G.; PINHO, S.C. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In: Hernandez-Sanchez, H.; Gutierrez-Lopez, G.F. (Org.). **Food Engineering Series**. 1ed.: New York: Springer International Publishing, 2015, p. 99-143.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer Science Business Media, LLC, 1983. p. 495.

LAKEMON, C. M. M., et al. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 6, p. 1985-1990, 2000.

LALIGANT, A. et al. Surface hydrophobicity and aggregation of β -lactoglobulin heated near neutral pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 12, p. 2147–2155, 1991.

LANGMAID, S. **Solid lipid nanoparticles stabilized with poloxamer 188 and tween 20: beta-carotene stability and bioaccessibility**. 2010. Dissertação (Mestrado), University of Guelph, Guelph, Canadá, 2010.

LEEA, K.H.; RYUB, H.S.; RHEEA, K.C. Protein Solubility Characteristics of Commercial Soy Protein Products, **JAOCs**, New York, v. 80, n. 1, p. 85-90, 2003.

LI, J.; ELEYA, M.M.O.; GUNASEKARAN, S. Gelation of whey protein and xanthan mixture: effect of heating rate on rheological properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 678-686, 2006.

LI, L.; BRAITEH, F. S.; KURZROCK, R. Liposome-encapsulated curcumin: In vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. **Cancer**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1322–1331, 2005.

LIM, G.P. et al. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 21, n. 21, p. 8370–8377, 2001.

LIN, V.J.C.; KOENIG, J.L. (1976). Raman studies of bovine serum albumin. **Biopolymers**, New Jersey, v. 15, p. 203-218, 1976.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman and Hall, 1997, 532 p.

LIU, K. et al. Fat droplet characteristics affect rheological, tribological and sensory properties of food gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 44, p. 244-259, 2015.

LÓPEZ, A. et al. Influence of Drying Conditions on the Hazelnut Quality. III. Browning. **Journal of Drying Technology**, Abingdon, v. 15, n.3-4, p. 989-1002, 1997.

LORENZO, G. et al. Linear viscoelastic assessment of cold gel-like emulsions stabilized with bovine gelatine. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 44, p. 457-464, 2011.

LORENZO, G.; ZARITZKY, N.; CALIFANO, A. Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, p.672-680, 2013.

MA, F. et al. Effects of high pressure and CaCl_2 on properties of salt-soluble meat protein gels containing locust bean gum. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 14, p. 31–37, 2012.

MAIER, M. et al. Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums. In: WHISTLEY, R. L; BEMILLER, J. N. **Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives**. 3ed. New York: Academic Press, 1993. p. 205–213.

MAITI, K. et al. Curcumin– phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 330, n. 1, p. 155–163, 2007.

MALHOTRA, A.; COUPLAND, J.N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, p. 101–108, 2004.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer Nano Series User Manual**. United Kingdom, 2013. Disponível em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf>. Acesso em: 31 mar 2017.

MALTAIS, A. et al. Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 67-73, 2005.

MALTAIS, A.; REMONDETTO, G.E.; SUBIRADE, M. Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 550–559, 2008.

MALTAIS, A.; REMONDETTO, G.E.; SUBIRADE, M. Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1647–1653, 2009.

MANGINO, M. E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of**

Dairy Science, Savoy, v. 67, n. 11, p. 2711-2722, 1984.

MANIKANDAN, P. et al. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 36, n. 10, p. 1967–1980, 2004.

MANNION, R.O. et al. Mixed gels made from protein and k-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 28, n. 4, p. 337–339, 1995.

MARANGONI, A. G. et al. On the structure of particulate gels-the case of salt-induced cold gelation of heatdenatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 61-74, 2000.

MARCZYLO, T. H. et al. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, New York, v. 60, n. 2, p. 171–7. 2007

MARTÍNEZ, V.Y. et al. Viscoelastic characteristics of Granny Smith apple during glucose dehydration. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 83, p. 394-403, 2007.

MCCLEMENTS D.J. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.

MCGUFFEY, M. K.; FOEGEDING, E. A. Electrostatic effects on physical properties of particulate whey protein isolate gels. **Journal of Texture Studies**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 285–305, 2001.

MEHNERT, W.; MÄDER, K.. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, New York, v. 47, n. 2-3, p. 165 – 196, 2001.

MEURE, L.A.; FOSTER, N.R.; DEHGHANI, F. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. **Aaps Pharmscitech**, Arlington, v. 9, n. 3, p. 798–809, 2008.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.

MEZGER, T. G. **The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers**. Hannover: Ulrich Zorll, 2002.

MITCHELL, J.R. Rheology of gels. **Journal of Texture Studies**, Oxford, v. 7, p. 313-339, 1976.

MONTEIRO, S.R. et al. The influence of galactomannans with different amount of galactose side chains on the gelation of soy proteins at neutral pH. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 33, p. 349-360, 2013.

MORR, C. V. et al. A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p.1715-1718, 1985.

MORRIS, V. J. Gelation of Polysaccharides. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, London, v. 2, n. 6, p. 567-572, 1997.

MOUTINHO, I.L.D.; BERTGES, L.C.; ASSIS, R.V.C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C Yellow No 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 67, n. 1, p. 141-145, 2007.

MÜLLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, New York, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 242, n. 1-2, p. 121-128, 2002.

NAKAI, S., LI-CHAN, E., ARTEAGA, G.E. **Methods of testing protein functionality: Measurement of surface hydrophobicity**, 1. ed. London: Ed. G. M. Hall, 1996. 265p.

NISHINARI, K. Food Hydrocolloids in Japan. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D; WILLIAMS, P.A. (Eds.) **Gums and stabilisers for the food industry** 4 ed. Oxford. IRL Press, 1988. p. 373-390.

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

OAKENFUL, A.; PEARCE, J.; BURLEY, R.W. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (editors). **Food proteins and their applications**. New York. Marcel Dekker, 1997.

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.

ÖZKAN, N.; XIN, H.; CHEN, X. D. Application of a depth sensing indentation hardness test to evaluate the mechanical properties of food materials. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1814-1820, 2002.

PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 21-32, 2007.

PARADISO, V.M. et al. Production and characterization of emulsion filled gels based on inulin and extra virgin olive oil. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 45, p. 30-40, 2015.

PATHARE, P.B.; OPARA, U.L.; AL-SAID, F.A. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 1, p. 36–60, 2013.

PENG, I. C. et al. The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin e a review. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 61, p. 480-490, 1984.

PEREIRA, R.B.; BENNETT, R.J.; HEMAR, Y.; CAMPANELLA, O.H. Rheological and microstructural characteristics of model processed cheese analogues. **Journal of Texture Studies**, Oxford, v. 32, p. 349-373, 2001.

PEREZ, A. A. et al. Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 1253–1262, 2009.

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

PETRUCELLI, S.; AÑON, M.C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2161-2169, 1994.

PETRUCELLI, S.; AÑON, M.C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 12, p.3035-3041, 1995.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. E. **Structure function properties of food proteins**. San Diego. Academic Press, 1994

PIAZZA, L.; BENEDETTI, S. Investigation on the rheological properties of agar gels and their role on aroma release in agar/limonene solid emulsions. **Food Research International**, Great Britain, v. 43, p. 269-276, 2010.

PICONE, P.S.F.; CUNHA, R.L. Interactions between milk proteins and gellan gum in acidified gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 502–511, 2010.

PILOSOOF, A. M. R. Propiedades de hidratación. In: PILOSOOF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G. B. (eds.) **Caracterización funcional y estructural de proteínas**. Buenos Aires: Eudeba Cytod, 2000. Cap. 1, p. 17-28.

PRASAD, S. et al.. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, New York, v. 32, n. 6, p. 1053-1064, 2014

PTITSYN, O.B. Molten globule and protein folding. In: ANFINSEN, C.B. et al. **Advances In Protein Chemisiry**, Massachusetts: Academic Press, 1995, v. 47, p. 83-229.

POOL, H. et al. Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. **Food and Function**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 162-74, 2013.

PUPPO, M. C. **Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido**. 1997. Tese (Doutorado). Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, 1997.

PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N.. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews: Drug Discovery**, England, v. 6, n. 3, p. 231-248, 2007.

PUPPO, M. C.; SORGENTINI, D.A.; AÑÓN, M.C. Rheological Properties of Emulsions Containing Modified Soy Protein Isolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 605-611, 2003.

RAMÍREZ, J.A. et al. Effect of xanthan and locust bean gums on the gelling properties of myofibrillar protein. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.16, n. 1, p. 11-16, 2002.

RAMIREZ-TOSTOSA, M.C. et al. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. **Artherosclerosis**, v. 147, n. 2, p. 371–378, 1999.

RAO, M.A. **Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods, Food Engineering Series**. New York: Springer Science+Business Media. 2014

RAHMAN, M.H.; RAMANATHAN, M.; SANKAR, V. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity assay of curcumin loaded solid lipid nanoparticle in IMR32 neuroblastoma cell line. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Columbus, v. 27, n. 5, p. 1281-1285, 2014.

RENARD, D.; VAN DE VELDE, F.; VISSCHERS, R.W. The gap between food gel structure, texture and perception. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 423–431, 2006.

RENKEMA, J. M. S. Relations between rheological properties and network structure of soy proteins gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, n. 1, p.39-47, 2004.

RENKEMA, J.M.S. et al. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 79, n. 3, p. 223-230, 2000.

RENKEMA, J. M. S.; GRUPPEN, H.; VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy proteins gels and in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 21, p. 6064-6071, 2002.

RIGOS, C.F. **Mecanismos de dissociação das subunidades alfa e Beta da Na,K-ATPase por agentes químicos e físicos: comparação entre a enzima solubilizada e reconstituída em lipossomos**. 2007. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

RING, S.; STAINSBY, G. Filler reinforcement of gels. **Progress in Food and Nutrition Science**, Bethesda, v. 6, p. 355-361, 1982

ROCHA, C. et al. Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, p. 1734–1745, 2009.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A.I.; TECANTE, A. Dynamic viscoelastic behaviour of gellan- ι -carrageenan and gellan-xanthan gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, n. 1, p.59–64, 1999

ROSALAM, S; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 197–207, 2006.

ROUSSEAU, D. Fat crystals and emulsion stability – a review. **Food Research International**, Great Britain, v. 33, n. 1, p. 3-14, 2000.

SA, G.; DAS, T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. **Cell Division**, London, v. 3, p. 14, 2008.

SAHA, D.; BHATTACHARYA, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. **Journal of Food Science and Technology**, New York v. 47, n. 6, p. 587–597, 2010.

SANCHEZ, C. et al. Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels, Effect of pH and xanthan concentration. **Food/ Nahrung**, Weinheim, v. 41, n. 6, p.336–343, 1997.

SALA, G. et al. Effect of droplet–matrix interactions on large deformation properties of emulsion-filled gels. **Journal of Texture Studies**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 511–535, 2007

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

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

SALA, G. et al. Matrix properties affect the sensory perception of emulsion-filled gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 353–363, 2008.

SALGIN, S.; SALGIN, U; BAHADIR, S. Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths. **International Journal of Electrochemical Science**, Belgrade, v. 7, p. 12404 – 12414, 2012.

SÁNCHEZ, V.E.; BARTHOLOMAI, G.B.; PILOSOFF, A.M.R. Rheological Properties of Food Gums as related to their Water Binding Capacity and to Soy Protein interaction. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 28, p. 380-385, 1995.

SARI, T.P. et al. Preparation and characterization of nanoemulsions encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 43, p. 540-546, 2015.

SCHAFFTER, S.; CORVALAN, C. M.; CAMPANELLA, O. H. (2015). A creep and recovery model based on fractional calculus for the characterization and design of viscoelastic food materials (internal communication).

SCHMIELE, M. et al. Influência da adição de farinha integral de aveia, flocos de aveia e isolado proteico de soja na qualidade tecnológica de bolo inglês. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 71-82, 2011.

SCHMIELE, M. et al. Determinação da concentração de diferentes sistemas de solventes na solubilização de proteínas de análogo de carne. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 6, p. 1120-1125, 2015.

SEMISOTNOV, G. V. et al. Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B. **FEBS Lett.**, New Jersey, v. 224, n. 1, p. 9–13, 1987.

SEMISOTNOV, G. V. et al. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. **Biopolymers**, New Jersey, v. 31, n. 1, p. 119-128, 1991.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. p. 85-109.

SILVA, G.S. et al. Characterization of curcumin-loaded proliposomes produced by coating of micronized sucrose and hydration of phospholipid powders to obtain multilamellar liposomes **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, p. 772-780, 2017.

SILVA FILHO, C.R.M. et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 19, n. 4, p. 919-923, 2009.

SIVIERO, A. et al. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p.57–70, 2015.

SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 9, p. 2471-2479, 1995.

SOUTO, E.B. **SLN and NLC for topical delivery of antifungals**. 2005. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia, Química e Farmácia, Freie Universität Berlin, Berlim. 2005.

SOUTO, E.B.; MULLER, R.H. The use of SLN and NLC as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 431-437, 2006.

SPOTTI, M.J. et al. Whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis and heat treatment: Comparison of creep and recovery behavior. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 63, p. 696–704, 2016.

SREERAMA N.; WOODY RW. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 32-44, 1993.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. Seed Galactomannans: An Overview. **Chemistry and Biodiversity**, New Jersey, v. 2, p. 295-317, 2005.

STADING, M.; HERMANSSON, A. M. Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin structures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 121-135, 1990.

STASWICK, P.E.; HERMODSON, M.A.; NIELSEN, N.C. Identification of the cysteines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 10, p. 13431-13435, 1984.

STEFFE, J.F. (1996). **Rheological methods in food process engineering**. East Lansing: Freeman Press.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A.. Curcumin: Preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. **Antioxidants and Redox Signaling**, New York, v. 10, n. 3, p. 511–545, 2008.

SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems—an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 8, n. 3, p. 179–193, 1998.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 67, n. 2-3, p. 147–156, 2005.

TAKAHASHI, M. et al. Characterization and bioavailability of liposomes containing a ukon extract. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tóquio, v. 72, n. 5, p. 1199-1205, 2008.

TOBITANI, A.; ROSS-MURPHY, S.B. Heat-Induced Gelation of Globular Proteins. 1. Model for the Effects of Time and Temperature on the Gelation Time of BSA Gels. **Macromolecules**, New York, v. 30, n. 17, p. 4845–4854, 1997.

TANG, Q.; MCCARTHY, O.J.; MUNRO, P.S. Oscillatory rheological study of the effects of pH and salts on gel development in heated whey protein concentrate solutions. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 62, n. 3, p. 469–477, 1995.

TAPAL, A.; TIKU, P.K. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 130, n. 4, p. 960–965, 2012.

TARHAN, O. et al. Rheological and structural characterization of whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 61, p. 211-220, 2016.

TAVARES, C. et al. Does the branching degree of galactomannans influence their effect on whey protein gelation? **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, p. 270–271, p. 213–219, 2005.

TEECE, L.J.; FAERS, M.A.; BARTLETT, P. Ageing and collapse in gels with long-range attractions. **Soft Matter**, Weinheim, v. 7, p. 1341–1351, 2011.

THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. Beta-conglycinin from soybean proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 490, n. 2, p. 370-384, 1977.

TIKEKAR, R.V.; NITIN, N. Effect of physical state (solid vs. liquid) of lipid core on the rate of transport of oxygen and free radicals in solid lipid nanoparticles and emulsion. **Soft Matter**, Weinheim, v. 7, n. 18, p. 8149–8157, 2011.

TIKEKAR, R.; PAN, Y.; NITIN, N. Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized pickering emulsion during storage and simulated digestion. **Food Research International**, Great Britain, v. 51, n.1, p. 370-377, 2013.

TIMMS, R.E. Phase behaviour of fats and their mixtures. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 1–38, 1984.

TOLSTOGUZOV, V. B. Protein–polysaccharide interactions. In: DAMODARAN, S. ; PARAF, A. (Eds.). **Food proteins and their applications**. New York. Marcel Dekker Inc., 1997. p. 171–198.

TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2003.

TOTOSAUS, A. et al. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food and Technology**, Chester, v. 37, n. 6, p. 589-601, 2002.

TURGEON, S. L. et al. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, London, v. 8, p. 401-414, 2003.

UTSUMI, S.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Structure-Function Relationships of Soy Proteins. In: DAMODARAN, S. P. (Ed.), **Food proteins and Their Applications**. New York. Marcel Dekker, Inc., 1997.

VAN AKEN, G. A.; OLIVER, L.; SCHOLTEN, E. Rheological effect of particle clustering in gelled dispersions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 48, p. 102-109, 2015.

VAN DE VELDE, F. et al. Protein-Polysaccharide Interactions to Alter Texture. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 6, p. 371-388, 2015.

VAN VLIET, T. Factors determining small-deformation behaviour of gels. In: DICKINSON, E.; RODRIGUEZ-PATINO, J. M. **Food emulsions and foams. Interfaces, interactions and stability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999.

VAN VLIET, T. On the relation between texture perception and fundamental mechanical parameters for liquids and time dependent solids. **Food Quality and Preference**, New York, v. 13, n. 4, p.227–236, 2002.

VAN VLIET, T. Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction. **Colloid & Polymer Science**, Darmstadt, v. 266, n.6, p. 518-524, 1988.

VILELA, J.A.P.; CAVALLIERI, A.L.F.; CUNHA, R.L. The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate-gellan gum. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 1710-1718, 2011.

VISSER, A., THOMAS, A. Review: Soya protein products-their processing, functionality, and application aspects. **Food Review International**, New York, v. 3, n. 1, p. 1-32, 1987.

WANG, C.; DAMODARAN, S. Thermal Gelation of Globular Proteins: Influence of Protein Conformation on Gel Strength. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 3, p. 433 – 438, 1991.

WANG, Z. et al. Relationship between Secondary Structure and Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate Subjected to Heat Treatment. **Journal of Chemistry**, New York, v. 5, p. 1-10, 2014.

WANG, Y. et al. The effect of addition of flaxseedgum on the emulsion properties of soybean protein isolate (SPI). **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 104, n.1, p. 56–62, 2011.

WEISS, J.; SCHERZE, I.; MUSCHLIOLIK, G. Polysaccharide gel with multiple emulsion. **Food Hydrocolloids**, Oxford, 19, 605-661, 2005.

WILSON, L. A. Soy foods. In: ERICKSON, D.R. (Ed) **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Urbana: A.O.C.S. Press, 1995. Cap. 22, p. 428-459.

WOODY, R. W. Circular dichroism and conformation of unordered peptides. **Advances in Biophysical Chemistry**, Cairo, v. 2, p. 37–79, 1992.

XIONG, Y. L.; AGUILERA, J. M.; KINSELLA, J. E. Emulsified milk fat effects on rheology of acid-induced milk gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 920-925, 1991.

XIA, X. et al. Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 110, n.2, p.356-363, 2007.

YAMAUCHI, F.; YAMAGISHI, T.Y.; IWABUSHI, S. Molecular understanding of heatinduced phenomena of soybean protein. **Food Review International**, New York, v.7, n. 3, p. 283-322. 1991.

YANG, J. et al. β -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 7, p. 3236-3243, 2001.

ZANIN, S.M.W. et al. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n.1, p. 13-18, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Aspecto visual dos géis sustentáveis de isolado proteico de soja obtidos a frio produzidos com pH 7, não-carregados com MLS.

APÊNDICE B - Aspecto visual dos géis sustentáveis de isolado proteico de soja obtidos a frio produzidos com pH 9, não-carregados com MLS.

APÊNDICE C - Aspecto visual dos géis sustentáveis de isolado proteico de soja obtidos a frio produzidos com pH 11, não-carregados com MLS.

APÊNDICE D - Aspecto visual dos géis biopoliméricos mistos de isolado proteico de soja e diferentes polissacarídeos (goma xantana – GX e goma locusta – GL), obtidos a frio, classificados como géis sustentáveis fortes, não-carregados com MLS.

ANEXOS

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

PROTIMARTI M-90 - PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

DESCRIÇÃO DO PRODUTO:

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

APLICAÇÃO DO PRODUTO:

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

CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE:

PARÂMETRO	PADRÃO	METODOLOGIA
Aspecto	pó fino, cor natural	observação visual
Proteína (base seca)	mín. 88,0%	Normas Analíticas - Instituto Adolfo Lutz
Umidade	máx. 8,0%	Normas Analíticas - Instituto Adolfo Lutz
Gordura	máx. 2,0%	Normas Analíticas - Instituto Adolfo Lutz
pH (solução 1%)	6,0 – 8,5	Normas Analíticas - Instituto Adolfo Lutz
Granulometria (retido #100)	máx. 5,0%	Normas Analíticas - Instituto Adolfo Lutz
<i>E. coli</i>	máx. 10 UFC/g	APHA
<i>Bacillus cereus</i> *	máx. 5 x 10 ² UFC/g	EMBRAPA
<i>Salmonella sp.</i> *	ausência em 25g	APHA
* Conforme Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001.		

EMBALAGEM:

Embalado em saco de polietileno, revestido por saco de papel multifoldado; peso líquido de 5kg ou 20kg. Também, disponível embalado em saco de polietileno, revestido por saco plástico leitoso; peso líquido de 20kg.

VALIDADE:

Doze meses, a contar da data de fabricação.

ARMAZENAMENTO:

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

ANEXO B – Ficha de especificação da estearina de palma, disponibilizada pelo fornecedor (Agropalma).

LAUDO DE QUALIDADE – ESTEARINA DE PALMA REFINADA

Características físico-químicas (AOAS)

Atributos	Resultados	Limites
Acidez (% Palmítico)	0,038	≤0,05
Índice de peróxido(mEq/kg)	0,388	≤1,0
Cor Lovibond Red 5 ¼	3,0	≤4,0
Ponto de Fusão (°C)	50,1	51 ± 2
Índice de Iodo (wijjs)	37,44	36 - 42
Odor / Sabor	Neutro	Neutro
SFC a 10 °C	73,43	69-80
SFC a 20 °C	57,42	52-64
SFC a 25 °C	44,92	40-52
SFC a 30 °C	35,07	28-40
SFC a 35 °C	27,31	22-34
SFC a 40 °C	20,29	17-27
SFC a 45 °C	15,41	10-21