UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARLUCI GHIRALDI

**Desenvolvimento de géis polissacarídicos carregados de
emulsão incorporando vitaminas D₃ e B₁₂**

Pirassununga

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARLUCI GHIRALDI

**Desenvolvimento de géis polissacarídicos carregados de
emulsão incorporando vitaminas D₃ e B₁₂**

“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.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

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

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

GG425d Ghiraldi, Marluci
Desenvolvimento de géis polissacarídicos
carregados de emulsão incorporando vitaminas D3 e
B12 / Marluci Ghiraldi ; orientadora Samantha
Cristina de Pinho. -- Pirassununga, 2018.
124 f.

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

1. Gel carregado. 2. Vegano. 3. Pectina LMa. 4.
Estabilizantes naturais. 5. Propriedades mecânicas.
I. Cristina de Pinho, Samantha, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho
a todas as pessoas
que eu amo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre colocar pessoas maravilhosas em minha vida e fazer tudo acontecer na hora certa.

A minha orientadora Samantha, que sempre acreditou em minha competência, me incentivando a seguir em frente e a vencer todos os obstáculos. Obrigada por toda sua compreensão. Você é um modelo de mulher a ser seguido, forte, competente e de um coração enorme.

A minha mãe, minha irmã, meu pai e principalmente a minha sobrinha que a razão da minha vida. Maria Gabriela titia te ama.

A todo grupo Lenalis, em especial a Beatriz Franco, aluna de graduação, pela ajuda em quase todo o Mestrado, pelos momentos de confidências, por ser você.

Aos amigos com quem compartilhei inúmeros momentos e que até hoje mesmo longe ainda se fazem presentes: Marília, Nayla, Taíse, Camila Cazado, Ivana, Marcela Tedesco, Grazielle Bovi e Lorena.

Aos técnicos de laboratório que sempre me ajudaram na realização de análises Guilherme Silva, Carla Mônaco, Camila Molina, Keila Aracava, Fábio Gallo, Rodrigo Lourenço, Arina Rochetti e, principalmente, meu obrigada ao Marcelo Thomazini por toda paciência em me passar seus ensinamentos.

Ao professor Fernando Gustavo Tonin, por me ajudar na análise de quantificação de vitamina D₃.

À professora Izabel C. F. Moraes pela grande ajuda e disponibilidade nas análises reológicas.

Ao INFABIC e ao técnico Vitor pela realização das análises de microscopia confocal.

À FAPESP, pela bolsa de Mestrado (processo 2016/21760-1) concedida.

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

Às Nexira e CpKelco pela doação de goma arábica e pectina, respectivamente.

*Amor é a única coisa que me faz
permanecer e me sentir viva.*

RESUMO

GHIRALDI, Marluci. **Desenvolvimento de géis polissacarídicos carregados de emulsão incorporando vitaminas D₃ e B₁₂**. 2018. 124 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O interesse sobre o mercado de produtos vegetarianos e veganos tem crescido muito na última década, sendo que novos produtos alimentícios fortificados são continuamente introduzidos nesse segmento. Como grande parte do público vegano possui deficiências na ingestão de vitaminas D₃ e B₁₂, torna-se interessante o desenvolvimento de produtos com adição dessas vitaminas como fortificantes de alimentos. O objetivo principal desta Dissertação foi produzir e caracterizar um gel de pectina carregado de emulsão, incorporando vitaminas D₃ e B₁₂. As emulsões foram produzidas com óleo de linhaça como fase dispersa e inulina associada à goma arábica como estabilizantes. A emulsão foi produzida por método de alto cisalhamento, em tampão citrato (pH 4,0) (devido à melhor estabilidade da vitamina B₁₂ em tal pH) e em baixa temperatura (30 °C) para minimizar a degradação de vitamina D₃. As emulsões foram avaliadas utilizando difração a laser, se apresentando estáveis ao longo de 30 dias de estocagem e com diâmetro médio de $2,75 \pm 0,25 \mu\text{m}$. A vitamina D₃ não sofreu degradação no período avaliado. Os géis foram produzidos com pectina de baixo grau de metoxilação amidada (pectina LMa) utilizando-se uma concentração de 4 % (g/g), a 60 °C, com 30 % (g/g) de sacarose, 0,1 % (g/g) de CaCl₂.2H₂O, em tampão citrato (pH 4,0). Substituiu-se 60 % (g/g) da água da matriz do gel pela emulsão e foram obtidos géis carregados firmes. Através de ensaios reológicos e de compressão uniaxial foi possível verificar que os géis carregados possuem uma rede estrutural mais forte do que o gel não-carregado, mostrando que as partículas são ativas. O gel carregado com 40 % de substituição da fase aquosa foi o gel mais forte, a ele adicionou-se as vitaminas. A vitamina B₁₂ se mostrou estável, assim como os parâmetros colorimétricos dos géis carregados e dos géis não-carregados após 30 dias. Assim, foi possível produzir géis de pectina carregados de emulsão, incorporando-se as vitaminas D₃ e B₁₂, que se mostraram estáveis ao longo do tempo de armazenamento.

Palavras-chave: gel carregado. Vegano. Pectina LMa. Estabilizantes naturais. Propriedades mecânicas.

ABSTRACT

GHIRALDI, Marlucci. **Development of polysaccharide emulsion filled gels incorporated with vitamins D₃ and B₁₂**. 2018. 124 p. Dissertation (Master) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Interest in the vegetarian and vegan product market has grown sharply over the past decade, with new fortified food products being continuously introduced into this market segment. As a large part of the vegan public has deficiencies in the intake of vitamins D₃ and B₁₂, it becomes interesting to develop products with addition of these vitamins as food fortifiers. The main objective of this research was to produce and characterize an emulsion-laden pectin gel incorporating vitamins D₃ and B₁₂. The emulsions were produced with flaxseed oil as dispersed phase and inulin associated with gum arabic as stabilizers. The emulsion was produced by the high shear method, in citrate buffer (pH 4.0) (due to the improved stability of vitamin B₁₂ at such pH) and at low temperature (30 °C) to minimize vitamin D₃ degradation. The emulsions were evaluated using laser diffraction, being stable over 30 days of storage and with an average diameter of $2.75 \pm 0.25 \mu\text{m}$. Vitamin D₃ was not degraded in the evaluated period. The gels were produced with low amidated methoxylation pectin (LMA pectin) using a concentration of 4% (w/w) at 60°C with 30% (w/w) sucrose, 0.1% (w/w) of CaCl₂·2H₂O in citrate buffer (pH 4.0). The emulsion replaced a percentage of 60% (w/w) of the gel matrix aqueous phase and strong emulsion-filled gels were obtained. Through rheological and uniaxial compression tests, it was possible to verify that the emulsion-filled gels have a stronger structural lattice than the uncharged gel, showing that the particles are active. The gel filled with 40% aqueous phase replacement was the strongest gel therein, and the vitamins were added to it. Vitamin B₁₂ was shown to be stable, as were the colorimetric parameters of filled and unfilled gels after 30 days. Therefore, it was possible to produce emulsion-filled pectin gels and to incorporate vitamins D₃ and B₁₂, which were shown to be stable over the storage time.

Keywords: emulsion filled gel. Vegan. LMA pectin. Natural stabilizers. Mechanical properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos compostos de cobalamina	25
Figura 2 - Estrutura da vitamina D ₃	27
Figura 3 – Estrutura característica da goma arábica. A= arabinosil; R ₁ = Ramnose→ 4 Ácido glucurônico; R ₂ = Galactose→ 3 arabinose; R ₃ = arabinose→ 3 arabinose→ 3 arabinose; ● = galactopiranosil ligada em 1→3; ○ = galactopiranosil ligada em 1→6 ou ácido urônico.	30
Figura 4 – Repulsão estérica: mecanismo de estabilização das gotículas lipídicas contra a agregação	30
Figura 5 – Estrutura química da inulina (n = 20-30).	31
Figura 6 - Representação teórica das duas estruturas combinada de géis carregados: (a) <i>Emulsion-filled gel</i> e (b) <i>Emulsion gel</i>	33
Figura 7 – Representação esquemática do comportamento das partículas: (a) ativas e (b) inativas.	34
Figura 8 – Estrutura química do monômero da pectina: (a) unidades de α-1,4-D-galacturônico (GalA); (b) unidades de GalA esterificados com metil.	36
Figura 9 – Representação esquemática do processo de desesterificação das pectinas HM para formação das pectinas LMa.	36
Figura 10 – Estruturas da rede de géis de pectinas observadas por microscopia eletrônica de transmissão: (a) HM (0,75 % de pectinas HM e 60 % de sacarose); (b) LM (0,75 % de pectinas LM, 30 % de sacarose e 0,15 % de CaCl ₂ .2H ₂ O); e (c) mistura HM/LM (0,75 % de pectinas HM, 0,75 % de pectinas LM, 60 % de sacarose e 0,15 % de CaCl ₂ .2H ₂ O).	37
Figura 11 – Microestrutura dos géis com 0,8 % de pectinas LMa (a) em pH 3, sem sacarose; (b) em pH 3 com 30 % de sacarose; (c) em pH 7 sem sacarose.	37
Figura 12 – Etapas de produção dos géis de pectina.	50

Figura 13 – Aspecto visual das emulsões preparadas com a: (a) suspensão de goma arábica e inulina hidratadas juntas por 24 h (SGAIN); (b) suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e, em seguida, adicionada de inulina em pó (SGA+IN); (c) suspensão de goma arábica hidratada por 24 h (SGA); (d) suspensão de goma arábica e de inulina hidratadas separadamente por 24 h (FA), após 24 h de sua produção .57

Figura 14 – Micrografias óticas de fluorescência das fases creme, intermediária e sedimentada das amostras SGAIN, SGA+IN e SGA, após 20 dias. Barra de escala = 20µm.58

Figura 15 – Micrografia obtida por microscopia óptica de fluorescência da emulsão em água deionizada, no primeiro dia de armazenagem. Barra de escala = 20 µm.....58

Figura 16 – Índice de cremeação das amostras feitas com SGA+IN, SGAIN e SGA.59

Figura 17 – Índice de sedimentação das amostras SGA+IN e SGAIN.....60

Figura 18 - Rampas de tensão das suspensões de inulina (32 g/100 g), 24 h após preparação, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento64

Figura 19 – Curvas de varredura de frequência das suspensões de inulina (32 g/100 g), 24 h após preparação, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento e G'' é o módulo de perda.64

Figura 20 - Variação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação das amostras, 24 h após sua preparação: (a) suspensão de goma arábica (SGA) a 25 °C; (b) fase aquosa (FA) da emulsão a 25 °C; (c) emulsão (E) a 25 °C; e (d) emulsão a 8 °C.66

Figura 21 – Curvas de distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas com: (a) água deionizada; (b) tampão citrato em pH 3,5; e (c) tampão citrato em pH 4,0, em termos de volume.....68

Figura 22 – Curvas de distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas em tampão citrato (pH 4,0) (a) sem vitamina (b) com vitamina D₃, em termos de volume70

Figura 23 – Perfil temporal de concentração de vitamina D₃ nas emulsões.....71

Figura 24 – Potencial zeta das emulsões sem vitamina e com vitamina D₃ encapsulada, ao longo do tempo de armazenagem. Médias seguidas com a mesma letra maiúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para a mesma amostra ao longo do período de estocagem. Médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para amostras diferentes no mesmo dia de avaliação.....73

Figura 25 - Fluxograma de ação de resultados para a determinação das condições experimentais de produção dos géis de pectina carregados76

Figura 26 – Aspecto visual dos géis de pectinas, produzidos em pH 3,5, a 95 °C, concentração de pectina 3 g/100 g, sacarose 30 g/100 g e CaCl₂.2H₂O 0,1 g/100 g. Pectinas: (a) HM; (b) LM; (c) LMa.77

Figura 27 – Aspecto visual dos géis de pectinas, em pH 3,5, concentrações de pectina 3 g/100 g, sacarose 30 g/100 g e CaCl₂.2H₂O 0,1 g/100 g, com diferentes tipos de pectina (LM e LMa) e temperaturas de 60 a 80 °C.....78

Figura 28 - Aspecto visual dos géis de pectina LMa, em pH 3,5, concentrações de sacarose 30 g/100 g e CaCl₂.2H₂O 0,1 g/100 g, em concentrações de pectina 3 e 4%, em temperaturas entre 30 e 50 °C79

Figura 29 - Aspecto visual dos géis de pectina LMa carregados com: (a) emulsões; (b) emulsões produzidas em tampão (pH 3,5), com substituição de 20, 30 e 40 % da água da matriz do gel por emulsão. Condições do processo: pH 3,5, concentração de sacarose 30 g/100 g e CaCl₂.2H₂O 0,1 g/100 g, a temperatura de 50 °C e com concentração de pectina 4 g/100 g79

Figura 30 – Aspecto visual dos géis de pectina LMa, em pH 4, concentração de sacarose 30 g/100 g e CaCl₂.2H₂O 0,1 g/100 g, em diferentes temperaturas e diferentes concentrações de pectina.....81

Figura 31 – Aspecto visual dos géis de pectina LMa carregados com emulsão em tampão (pH 4), com substituição de 20 e 60 % da água da matriz do gel por emulsão.

Condições do processo: pH 4, concentração de sacarose 30 g/100 g e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, variando a temperatura e a concentração de pectina.....	82
Figura 32 – Aspecto visual das amostras: (a) gel não-carregado; gel carregado com: (b) 20 %; (c) 40 %; (d) 60 %	83
Figura 33 - Imagem de microscopia confocal (ampliação de 40x) do gel não-carregado. A pectina LMa foi corada com FITC (verde) e excitado em 488 nm.....	84
Figura 34 – Imagens de microscopia confocal (ampliação 40x) dos géis carregados com (a) 20; (b) 40; e (c) 60 % de emulsão.	84
Figura 35 – Imagem da gota do gel GC40 ampliada, retirada da microscopia confocal	86
Figura 36 – Aspecto visual do gel, após decorrida as análises reológicas.....	87
Figura 37 – Rampas de tensão dos géis não-carregados (GNC) e dos géis carregados em 20 % (GC20), 40 % (GC40) e 60 % (GC60) de emulsão, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento	88
Figura 38 - Curvas de varredura de frequência dos géis não-carregados (GNC) e dos géis carregados com 20 % (GC20), 40 % (GC40) e 60 % (GC60) de emulsão, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento (símbolos fechados) e G'' é o módulo de perda (símbolos abertos).....	88
Figura 39 - Comportamento de G' e G'' no resfriamento de 60 a 20 °C, da dispersão de pectina LMa 4 g/100 g, sacarose 30 g/100 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, pH 4. À rampa de resfriamento foram aplicadas tensão de 8 Pa e frequência de 1 Hz, constantes.....	90
Figura 40 - Comportamento de G' e G'' no resfriamento de 60 a 20 °C, do gel não-carregado (GNC) e do gel carregado (GC20). À rampa de resfriamento foram aplicadas tensão de 8 Pa e frequência de 1 Hz, constantes.....	91
Figura 41 – (a) Gel de pectina LMa não-carregado (GNC); (b) Gel de pectina LMa carregado (GC40) durante o ensaio de compressão uniaxial	92

Figura 42 – Resultados dos ensaios de compressão uniaxial: (a) deformação de ruptura; (b) tensão de ruptura; (c) módulo de elasticidade de géis não-carregados (GNC) e géis carregados com 20 (GC20), 40 (GC40) e 60 % (GC60) de emulsão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula são estatisticamente iguais ($p < 0,05$). (a) (b) (c).....92

Figura 43 - Aspecto visual dos géis preparados para análise de estabilidade. Tratamento: (a) GNC; (b) GNCB; (c) GC40; (d) GC40B; (e) GC40D; (f) GC40BD....95

Figura 44 – Aspecto visual das embalagens em que foram armazenados os géis...96

Figura 45 - Perfil temporal de: (a) concentração de vitamina B₁₂ nos géis não-carregados (GNCB) e carregados (GC40B e GC40BD); (b) concentração de vitamina D₃ nos géis carregados (GC40BD e GC40D). Valores teóricos adicionado: B₁₂ 5,5 mg/100 g; D₃ 3,3 mg/100 g. Médias seguidas com a mesma letra maiúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para a mesma amostra ao longo do período de estocagem. Médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para amostras diferentes no mesmo dia de avaliação99

Figura 46 – Avaliação colorimétrica dos parâmetros: (a) L; (b) a; (c) b; (d) Croma (C*ab); ângulo de hue (hab); e diferença total de cor (TCD), durante o período de estocagem dos géis com vitaminas. Médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), para a mesma amostra ao longo do período de estocagem..... 101

Figura 47 – Diagrama CIELAB com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de Hue 103

Figura 48 - Curvas de varredura de frequência dos géis não carregados: 0 %, a 25 °C. 118

Figura 49 - Curvas de varredura de frequência dos géis substituídos por emulsão em 20 %, a 25 °C. 118

Figura 50 - Curvas de varredura de frequência dos géis substituídos por emulsão em 40 %, a 25 °C. 119

Figura 51 - Curvas de varredura de frequência dos géis substituídos por emulsão em 60 %, a 25 °C.	119
Figura 52 – Laudo do óleo de linhaça dourada.	120
Figura 53 – Laudo da vitamina D ₃	121
Figura 54 – Laudo da vitamina B ₁₂	122
Figura 55 – Laudo da pectina LMa.	123
Figura 56 – Laudo da goma arábica.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modos de produção e formulações das suspensões testadas para fazer a emulsão e quantidade da fase oleosa presente na emulsão	41
Tabela 2 – Modos de produção e formulações das suspensões testadas para fazer os testes de tensão interfacial e superficial.....	43
Tabela 3 – Formulações dos géis de pectina não-carregados e carregados (g/100 g de amostra).	48
Tabela 4 - Diferentes formulações (tratamentos) dos géis de pectina, carregados e não-carregados	51
Tabela 5 – Densidades do óleo de linhaça, água deionizada, suspensões de biopolímeros e emulsão, após 24 h de seu preparo, em temperatura ambiente (25 °C).	61
Tabela 6 – Tensão interfacial entre o óleo de linhaça e água deionizada, fase aquosa da emulsão, emulsão, suspensões de: goma arábica, inulina e suspensões e goma arábica e inulina.	61
Tabela 7 – Tensão superficial da água, da emulsão, da fase aquosa da emulsão e das suspensões e goma arábica e inulina preparadas de diferentes formas.....	62
Tabela 8 – Diâmetro hidrodinâmico médio de gotas (D_{43}), em volume, e <i>span</i> das emulsões produzidas com água deionizada e tampão citrato em pH 3,5 e pH 4,0 ...	67
Tabela 9 – Diâmetro hidrodinâmico médio de gotas (D_{43}), em volume, e <i>span</i> das emulsões produzidas em tampão citrato (pH4,0) sem vitamina (EB) e com vitamina D ₃ (ED).	69
Tabela 10 – Valores de umidade (%) para cada tratamento ao longo do período de armazenamento	96
Tabela 11 – Valores de atividade de água para cada tratamento ao longo do período de armazenamento	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A_0 - área inicial

Abs – absorbância da amostra

ADI - água deionizada

d_{10} – frequência de tamanho de 10 % das partículas (μm)

d_{50} – frequência de tamanho de 50 % das partículas (μm)

d_{90} – frequência de tamanho de 90 % das partículas (μm)

d_i – diâmetro médio de partícula

DMSO – dimetilsulfóxido

E - emulsão

EB – emulsão sem vitamina D_3 (utilizado como branco)

ED – emulsão com vitamina D_3

$F(t)$ - força no tempo t de análise

FA - fase aquosa: suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e suspensão de inulina hidratada por 24 h, em seguida misturadas

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GA - goma arábica

GC20 – gel carregado com 20 % de emulsão

GC40 – gel carregado com 40 % de emulsão

GC40B – gel carregado com 40 % de emulsão com vitamina B_{12}

GC40BD – gel carregado com 40 % de emulsão com vitamina B_{12} e D_3

GC40D – gel carregado com 40 % de emulsão com vitamina D_3

GC60 – gel carregado com 60 % de emulsão

GNC – gel não-carregado

GNCB – gel não-carregado com vitamina B_{12}

$H(t)$ - altura no tempo t de análise

H_0 - altura inicial do gel

H_c - altura da fase superior (fase creme)

HM - alto grau de metoxilação

H_s - altura da fase inferior (fase sedimentada)

H_T - altura inicial da dispersão

IC - índice de cremeação

IN - inulina

IS - índice de sedimentação

LM - baixo grau de metoxilação

LMa – baixo grau de metoxilação amidada

m – massa em gramas da fase oleosa

m_0 – coeficiente angular da curva de calibração

n_i – número de partículas

OL - óleo de linhaça

PV = valor de peróxido

RVL - região de viscoelasticidade linear

SGA - suspensão de goma arábica

SGA+IN - suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e, em seguida, adicionada de inulina em pó

SGAIN - suspensão de goma arábica mais inulina hidratadas por 24 h

SIN - suspensão de inulina

span - índice de polidispersidade

TCD – diferença total de cor

LISTA DE SÍMBOLOS

ε - absorvidade molar

ζ - potencial zeta

ε_H - deformação de Hencky

σ_H - tensão de Hencky

ε_{rup} – deformação de ruptura

σ_{rup} – tensão de ruptura

a^* - cromaticidade no eixo variando do vermelho/verde

b^* - cromaticidade no eixo variando do amarelo/azul

C^*_{ab} – croma (saturação da cor)

D_{43} – diâmetro Broukere

E - módulo de elasticidade

G' - módulo elástico ou módulo de armazenamento

G'' - módulo viscoso ou módulo de perda

h_{ab} – ângulo de Hue (tonalidade definida em graus)

L^* - luminosidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Vegetarianos e veganos.....	22
2.1.1	Mercado de produtos alimentícios vegetarianos e veganos.....	22
2.1.2	Definição, benefícios e limitações da dieta	23
2.2	Vitaminas B ₁₂ e D ₃	24
2.3	Emulsões: definição e estabilização com polissacarídeos	27
2.4	Géis carregados com emulsões (<i>emulsion-filled gels</i>)	33
2.5	Pectinas: estrutura e gelificação.....	35
3	OBJETIVOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Material	40
4.1.1	Produção das emulsões	40
4.1.2	Caracterização das emulsões	40
4.1.3	Produção dos géis.....	40
4.2	Métodos	41
4.2.1	Testes preliminares para a produção das emulsões	41
4.2.2	Produção das emulsões	42
4.2.3	Determinação do índice de cremeação e sedimentação.....	42
4.2.4	Microscopia ótica de fluorescência.....	43

4.2.5	Determinação da densidade, tensão interfacial e tensão superficial.....	43
4.2.6	Ensaio reológico das suspensões e da emulsão	44
4.2.6.1	Determinação de curvas de fluxo	44
4.2.6.2	Ensaio oscilatório de pequena amplitude: testes de varredura de deformação e varredura de frequência	45
4.2.7	Avaliação da estabilidade físico-química.....	45
4.2.8	Determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho de gota....	45
4.2.9	Determinação do potencial zeta	46
4.2.10	Quantificação de vitamina D ₃	46
4.2.11	Avaliação da oxidação lipídica	47
4.2.12	Produção dos géis de pectina	48
4.2.13	Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química dos géis.....	50
4.2.14	Ensaio oscilatório de pequena amplitude	51
4.2.15	Ensaio de varredura de temperatura	52
4.2.16	Ensaio de compressão uniaxial	52
4.2.17	Microscopia de varredura a laser confocal.....	53
4.2.18	Quantificação da vitamina B ₁₂	54
4.2.19	Quantificação da vitamina D ₃	54
4.2.20	Determinação da cor instrumental dos géis	55
4.2.21	Determinação da umidade	56
4.2.22	Determinação da atividade de água.....	56
4.2.23	Análises estatísticas.....	56

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	Determinação das condições de produção das emulsões	57
5.1.1	Determinação das tensões interfacial e superficial	60
5.2	Caracterização reológica das emulsões.....	63
5.3	Avaliação da estabilidade físico-química.....	66
5.3.1	Determinação do tamanho médio e distribuição do tamanho de gota....	67
5.3.2	Estabilidade da vitamina D ₃ encapsulada	70
5.3.3	Avaliação da oxidação lipídica	72
5.3.4	Avaliação do potencial zeta.....	73
5.4	Determinação das condições de produção do gel de pectina	75
5.5	Caracterização dos géis não-carregados e carregados sem incorporação das vitaminas	83
5.5.1	Microestrutura dos géis	83
5.5.2	Caracterização reológica dos géis	87
5.5.3	Avaliação da temperatura de gelificação.....	89
5.5.4	Caracterização mecânica dos géis.....	91
5.6	Incorporação das vitaminas D ₃ e B ₁₂ nos géis de pectina – avaliação físico-química.....	95
5.6.1	Aspecto visual	95
5.6.2	Atividade de água e umidade	95
5.6.3	Estabilidade das vitaminas B ₁₂ e D ₃ ao longo do período de estocagem.....	98
5.6.4	Parâmetros colorimétricos instrumentais	100

6	CONCLUSÕES	104
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	105
	REFERÊNCIAS.....	106
	APÊNDICE A - Gráficos de varredura de frequência dos géis	118
	ANEXO A – LAUDOS.....	120

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo mercado vegetariano e vegano cresceu na última década. A dieta do consumidor vegano é totalmente ausente de vitamina B₁₂, pois este nutriente está presente apenas em produtos de origem animal. Além disso, este grupo específico de vegetarianos consomem menores quantidades de vitamina D, sendo que a crônica falta de exposição solar pode ser mais um fator agravante para síntese do colicalciferol (vitamina D₃). Uma maneira de suprir as necessidades diárias dessas vitaminas é suplementar a dieta dos vegetarianos e veganos com alimentos fortificados.

A vitamina B₁₂ é o nome geral dado para os compostos de cobalaminas, sendo solúvel em água e que possuem um sistema de anel complexo, com o cobalto como átomo central. Suas funções principais estão relacionadas com a formação de células vermelhas no sangue e a saúde do sistema nervoso. Anemia e desordens neuropsiquiátricas são as doenças que se manifestam quando a quantidade de B₁₂ absorvida pelo sistema é insuficiente; a deficiência prolongada pode levar a sequelas neurológicas irreversíveis.

A vitamina D é hidrofóbica, insolúvel em água e muito sensível à luz, presença de oxigênio e temperatura. Ela consiste de duas formas fisiologicamente importantes: a vitamina D₂ (ergocalciferol) e a vitamina D₃ (colecalfiferol). A forma ativa (1,25-dihidroxitamina D) tem como função principal manter e controlar a homeostase de cálcio.

Um meio interessante de adicionar compostos bioativos lipofílicos e hidrofílicos em uma mesma matriz são os géis carregados de emulsão onde os compostos lipofílicos serão encapsulados nas gotículas de óleo da emulsão, enquanto os compostos hidrofílicos serão incorporados na rede de gel. Géis carregados de emulsão são sistemas obtidos através da substituição (parcial ou total) da água de uma matriz de gel por uma emulsão estável. Vários trabalhos são desenvolvidos a fim de estudar as propriedades reológicas dos géis carregados para compreender a interação entre os componentes (gotículas de óleo e matriz de gel) e a influência da concentração dos componentes na estrutura do gel. Esses dados possibilitam conhecer a organização estrutural da matriz, e como isso afeta as características sensoriais do produto. Géis carregados são interessantes pelo fato de poderem ser aplicados na estruturação de diversos alimentos que têm características de géis, tais

como sobremesas, sorvetes, queijos, iogurte e produtos cárneos processados, fortificando-os com bioativos lipofílicos.

Vitaminas lipofílicas são amplamente incorporadas em alimentos através de emulsões óleo em água (O/A). É de grande interesse substituir as matrizes encapsulantes sintéticas (p. ex. *tween* e *span*) por ingredientes naturais, que possuam efeitos prebióticos, funcionando não só como materiais de parede, mas também como componentes ativos. Além disso, também se busca utilizar ingredientes de origem vegetal pelo fato de os veganos serem o público-alvo. Assim, a escolha dos componentes da emulsão, para encapsular a vitamina D₃ foram goma arábica, inulina e óleo de linhaça.

Existem diversos compostos como proteínas e polissacarídeos capazes de formar géis, entre eles a pectina. As pectinas são polissacarídeos isolados das paredes celulares de plantas superiores, principalmente frutas cítricas, sendo consideradas fontes de fibra, e também possuem efeito prebiótico. As pectinas podem ser classificadas como de baixo grau de metoxilação (LM) e de alto grau de metoxilação (HM). As pectinas HM formam géis na presença de açúcar e meios ácidos (pH 2,5-3,5), e as pectinas LM formam géis na presença de cátions divalentes. Além desses dois tipos de pectinas, existe a pectina com baixo grau de metoxilação amidada (LMA), que é uma pectina comercial. Diversos estudos analisam como os aspectos reológicos dos géis de pectina são afetados por parâmetros como pH, teor de sacarose, temperatura/taxa de resfriamento, concentração de cálcio e concentração de pectina HM, LM e suas misturas e LMA.

Neste contexto, o presente projeto teve como principal objetivo a produção, caracterização e avaliação da estabilidade dos géis carregados de emulsão com incorporação de vitaminas B₁₂ e D₃, como compostos bioativos. Para alcançar tais objetivos foram necessárias a determinação das condições operacionais otimizadas para a produção da emulsão com óleo de linhaça como fase oleosa, e blenda de goma arábica e inulina como tensoativos e vitamina D₃ encapsulada; a determinação das condições ótimas para a produção do gel de pectina, na presença de açúcar e sal, com adição da vitamina B₁₂ que foi incorporada na rede de gel, com substituição parcial ou total da água do gel por emulsão, o estudo da estabilidade das vitaminas nesse sistema, a caracterização dos géis por meio de ensaios de compressão uniaxial, ensaios oscilatórios de pequena amplitude, microscopia ótica confocal a laser, atividade de água, umidade e parâmetros colorimétricos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vegetarianos e veganos

2.1.1 Mercado de produtos alimentícios vegetarianos e veganos

O interesse sobre a alimentação vegetariana/vegana e suas consequências sobre a saúde vem crescendo rapidamente (RANGEL, 2016; SILVA et al., 2015b). O Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística, IBOPE (2018) realizou uma pesquisa em abril de 2018, no Brasil, e apontou que 14 % da população se considera vegetariana, representando quase 30 milhões de brasileiros. A pesquisa anterior (IBOPE, 2012) indicava que nas regiões metropolitanas 8 % das pessoas eram adeptas a essa dieta e este índice hoje é de 16 %, crescimento de 100 % em cinco anos. É perceptível que em nosso país, a oferta de produtos destinados a esse nicho de mercado ainda é menor que a demanda (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SUPERMERCADOS, 2015; SOLA, 2017). Segundo reportagem divulgada por Mercado (2015), existem cerca de 200 restaurantes vegetarianos no território nacional, que possuem uma clientela não somente vegetariana, mas também simpatizantes desta opção, denominados de flexitarianos (*"flexitarians"*), com perspectivas econômicas positivas para este mercado. Os flexitarianos são pessoas que exploram outras opções fora da tradicional carne vermelha e produtos lácteos, mas não estão comprometidos integralmente, ou seja, reduzem o consumo de produtos de origem animal substancialmente, mas ocasionalmente os consomem (DORIS, 2017). O IBOPE (2018) mostrou em sua pesquisa o interesse de 60 % da população por produtos veganos, se estes tivessem o mesmo preço dos produtos que estão acostumados a consumir. No ano de 2016, apontou-se um crescimento de 40 % nas vendas do setor vegetariano, como por exemplo, pelas empresas Mr. Veggy e a Mãe Terra (RANGEL, 2016). O aumento da certificação vegana na rotulagem dos alimentos pela Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB) é, também, um parâmetro de crescimento deste mercado (SVB, 2018). Além disso, novos produtos alimentícios, como alimentos fortificados e suplementos alimentares de origem vegetal destinados ao público vegetariano estão sendo gradativamente introduzidos no mercado (SILVA et al., 2015b).

Esta tendência de mercado também é vista mundialmente. Nos EUA em 2017, 6% da população afirmou ser vegana, um crescimento de 600 % em relação aos últimos 3 anos (CHIORANDO, 2017), enquanto que no Reino Unido este aumento foi

de 350 % nos últimos dez anos (THE VEGAN SOCIETY, 2016) e em Portugal o número de vegetarianos aumentou 400 % na última década, revelou a Associação Vegetariana Portuguesa (THE PORTUGAL NEWS, 2017). Na Austrália, o número de produtos alimentícios veganos lançados aumentou 92 % e, vegetarianos, 8%, entre 2014 e 2016 (MINTEL, 2017). O movimento internacional denominado de “alimentação baseada em plantas” (*plant-based diet*) é uma nova tendência, que muito provavelmente não irá parar de crescer (OBERST, 2018).

2.1.2 Definição, benefícios e limitações da dieta

A dieta vegetariana é definida como uma dieta que exclui carne, peixe e aves, mas pode incluir ovos e/ou laticínios (HUANG; LIN; CHENG, 1999; SILVA et al., 2015b). A alimentação vegetariana pode ser classificada como ovolactovegetariana, lactovegetariana, ovovegetariana e vegetariana estrita (denominada comumente como dieta vegana) (COUCEIRO; SLYWITCH; LENZ, 2008; HUANG; LIN; CHENG, 1999; SABATÉ, 2001). Além destas classificações, é possível também encontrar, ocasionalmente, pessoas que seguem dietas do tipo frugívora (somente ingestão de frutas), cerealista (somente ingestão de cereais) e crudívora (somente ingestão de alimentos crus) (COUCEIRO; SLYWITCH; LENZ, 2008; JOHNSTON, 1998).

As dietas vegetarianas historicamente estavam relacionadas à filosofia e religião, sendo Pitágoras um dos precursores do vegetarianismo, no século VI a.C. (LEITZMANN, 2005; MELINA; DAVIS; HARRISON, 1998). Além disso, religiões como budismo, hinduísmo e adventistas do sétimo dia, em sua grande maioria, são adeptas do vegetarianismo (COUCEIRO; SLYWITCH; LENZ, 2008; HUANG; LIN; CHENG, 1999). Na atualidade, além destas razões, o aumento do número de vegetarianos no mundo está ligado às questões de saúde, ambientais e ecológicas, biodiversidade, economia e fatores éticos relacionados ao bem-estar e direitos dos animais (COUCEIRO; SLYWITCH; LENZ, 2008; LEITZMANN, 2005; ACKLAND; BALL, 2000; JOHNSTON, 1998).

O vegetarianismo é frequentemente vinculado a vários benefícios, tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças, devido a maior ingestão de produtos de origem vegetal e/ou, menor, de origem animal (SILVA et al., 2015b; COUCEIRO; SLYWITCH; LENZ, 2008). Entretanto, os vegetarianos estritos não ingerem a vitamina B₁₂, devido ao fato de este nutriente estar presente somente em produtos de origem animal, como fígado, carnes, produtos cárneos, queijo, peixes, ostras, mariscos, ovos

e leites (GUGGISBERG; RISSE; HADORN, 2012). Além disso, este grupo específico de vegetarianos consome menores quantidades de vitamina D (JOHNSTON, 1998), devido esta vitamina estar presente em produtos de origem animal, sendo o peixe a sua maior fonte (PICCIANO, 2010) e a falta de exposição solar pode agravar as consequências decorrentes desta menor ingestão (JOHNSTON, 1998).

A dieta dos veganos deve, portanto, ser sempre suplementada com aportes de vitamina B₁₂, através de alimentos fortificados ou suplementos vitamínicos. Caso tal fato não ocorra, tais indivíduos podem, a longo prazo, sofrer riscos decorrentes da deficiência deste nutriente (KOEBNICK et al., 2004; HERRMANN; GEISEL, 2002; JOHNSTON, 1998).

2.2 Vitaminas B₁₂ e D₃

As vitaminas são um grupo amplo de nutrientes, sendo moléculas orgânicas presentes em pequenas quantidades nos alimentos, mas essenciais para o desenvolvimento normal das funções do corpo humano, como crescimento, automanutenção e funcionamento (GAO et al., 2008; LUO et al., 2006; BALL, 1998). A ausência de vitaminas pode causar graves problemas fisiológicos (GAO et al., 2008; BALL, 1998). Com a finalidade de corrigir tais deficiências nutricionais da população, pode-se propor o enriquecimento de alimentos (GAO et al., 2008).

Além disso, diversas vitaminas são instáveis a vários fatores, como temperatura, umidade, oxigênio, luz, agentes oxidantes, agentes redutores e pH, que estão presentes tanto na formulação quanto em diversas fases do processamento de alimentos. Estes fatores podem levar à perda desses micronutrientes nos alimentos (GAO et al., 2008; LASSEN et al., 2002).

A vitamina B₁₂ é a denominação dada para os compostos de cobalaminas, e consiste em um sistema de anel complexo, tendo o cobalto como átomo central (como mostrado na Figura 1), com estrutura similar à clorofila e a hemoglobina (GUGGISBERG; RISSE; HADORN, 2012). De acordo com o radical ligado ao cobalto a cobalamina pode ter várias denominações: hidroxocobalamina, adenosilcobalamina, metilcobalamina e cianocobalamina (BALL, 2005).

Figura 1 – Estrutura dos compostos de cobalamina

Fonte: BALL, G. F. M. **Vitamins in foods**: analysis, bioavailability, and stability. Boca Raton: CRC Press: 2005. 787 p.

A metilcobalamina e a adenosilcobalamina são as duas formas de coenzimas da vitamina B₁₂, e apresentam atividade metabólica conhecida no organismo dos seres humanos (BALL, 2005; MCMARTIN, 2005). A cianocobalamina é utilizada comercialmente em pesquisas devido à sua maior estabilidade (ELLENBOGEN; COOPER, 1991). É um pó higroscópico cristalino, vermelho escuro e solúvel em água (1,25 g / 100 ml a 25 °C) (BALL, 2005).

A vitamina B₁₂ é um nutriente sintetizado por bactérias e outros microrganismos que crescem na água ou no solo e no rúmen ou no trato gastrointestinal dos animais (BALL, 2005). No organismo dos seres humanos, a B₁₂ é acumulada no fígado, na forma de adenosilcobalamina (BALL, 2005). Não é encontrada em fontes vegetais, somente em produtos de origem animal como fígado, carnes, produtos cárneos, queijo, peixes, ostras, mariscos, ovos e leites (GUGGISBERG; RISSE; HADORN, 2012; KUMAR; CHOUHAN; THAKUR, 2010; MARLEY; MACKAY; YOUNG, 2009; HEUDI et al., 2006). Entretanto, um estudo realizado por Vogiatzoglou et al. (2009) correlacionou a concentração de vitamina B₁₂ no plasma com as fontes alimentícias ingeridas, e constatou que a vitamina ingerida a partir de produtos lácteos parece ser

mais biodisponível do que as consumidas de carnes e ovos. A demanda diária de vitamina B₁₂ é de cerca de 1 µg, mas uma ingestão de 3 µg é recomendada devido à sua baixa taxa de absorção no intestino delgado (GUGGISBERG; RISSE; HADORN, 2012).

A vitamina B₁₂ sofre perdas em algumas condições específicas de pH, temperatura, presença de agentes oxidantes e/ou redutores. A estabilidade desta vitamina é maior no intervalo de pH entre 4 e 7, sendo que a exposição aos meios mais ácidos ou mais alcalinos produz derivados de ácidos carboxílicos de vitamina B₁₂ biologicamente inativos (GREGORI III, 2010). Há também perda considerável durante o aquecimento prolongado de alimentos em pH neutro, como por exemplo no processamento do leite (GREGORI III, 2010; WATANABE, 2007). A presença de agentes oxidantes e altas concentrações de agentes redutores, como por exemplo, o ácido ascórbico, acelera a sua degradação (GREGORI III, 2010; BALL, 2005).

Trata-se de um nutriente essencial ligado à formação de células vermelhas do sangue, à síntese de DNA, à manutenção do sistema nervoso (MCMARTIN, 2005; ROBERT; BROWN, 2003; ZIEGLER; FILER, 1996) e desempenha um papel essencial no desenvolvimento da bainha de mielina (STABLER, 2013), além de ser necessária para processar o ácido fólico, outra vitamina essencial (BALL, 1998).

A deficiência de vitamina B₁₂ pode levar à produção de megaloeritócitos, que é o crescimento anormal da hemácia, e resultar em anemia perniciosa, devido à falha na formação de células vermelhas, cujos sintomas incluem cansaço excessivo, falta de ar, apatia e baixa resistência à infecção (KUMAR; CHOUHAN; THAKUR, 2010). A deficiência da citada vitamina também pode levar a doenças cardiovasculares, fraqueza e/ou fadiga (BERNARD; NAKONEZNY; KASHNER, 1998). Além disso, a deficiência prolongada de vitamina B₁₂ pode levar à degeneração dos nervos e danos neurológicos irreversíveis (JAIN; JAIN; JAIN, 2005; SCOTT, 1992), devido às falhas na reparação na bainha de mielina que protege as células nervosas (SCOTT, 1992). A deficiência de vitamina B₁₂ pode ser causada devido a desequilíbrios nutricionais (no caso dos vegetarianos), síndrome da má absorção e outros problemas gastrointestinais (STABLER, 2013; ROBERT; BROWN, 2003).

Por sua vez, a vitamina D consiste de duas formas fisiologicamente importantes: vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalciferol). A vitamina D₃ (Figura 2) é um hormônio esteroide produzido na pele, mediante exposição à luz solar, ou ingerido a partir de produtos de origem animal (ALMOUAZEN et al., 2013; LUO;

TENG; WANG, 2012; GREGORY III, 2010), sendo o peixe a fonte mais abundante de vitamina D₃ (PICCIANO, 2010). No fígado esta vitamina se converte para 25-hidroxi-vitamina D e no sistema renal ela sofre conversão para a 1,25-dihidroxitamina D, que é sua forma ativa (PICCIANO, 2010; BARRAL; BARROS; ARAÚJO, 2007).

Figura 2 - Estrutura da vitamina D₃

Fonte: GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 146, p. 276–290, 2010.

A vitamina D₃ é lipossolúvel e muito sensível a diferentes fatores ambientais (ABBASI et al., 2014; LUO; TENG; WANG, 2012), como radiação UV, presença de oxigênio e calor (ABBASI et al., 2014; NELSON et al., 2007).

Trata-se de um nutriente extremamente necessário para o corpo humano, sendo que alguns estudos mostram a relação dos níveis de vitamina D₃ com a saúde dos órgãos do corpo e prevenção de doenças (ABBASI et al., 2014; LI et al., 2011). A vitamina D₃ é responsável por manter e controlar a homeostase de cálcio (NORMAN; HENRY, 2012; BARRAL; BARROS; ARAÚJO, 2007). Ela também pode prevenir doenças ósseas (PETTIFOR; PRENTICE, 2011), câncer, diabetes, esclerose múltipla, hipertensão e doença cardiovascular (NORMAN; HENRY, 2012; PITTAS et al., 2010) regular o sistema imunológico e controlar a diferenciação celular (CANTORNA; HUMPAL-WINTER; DELUCA, 2000). A deficiência de vitamina D₃ resulta em doenças como raquitismo em lactentes e crianças, e osteomalácia e osteoporose em adultos (NORMAN; HENRY, 2012; PRENTICE; GOLDBERG; SCHOENMAKERS, 2008).

2.3 Emulsões: definição e estabilização com polissacarídeos

Alimentos funcionais são frequentemente enriquecidos com compostos bioativos lipofílicos, no intuito de proporcionar benefícios à saúde (MCCLEMENTS;

DECKER; WEISS, 2007). Entretanto, diversos desses compostos podem apresentar baixa solubilidade em água, degradação em diferentes condições ambientais e de processamento, bem como baixa absorção no trato gastrointestinal, diminuindo sua bioacessibilidade (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010). A encapsulação permite que compostos hidrofóbicos (como por exemplo, as vitaminas lipossolúveis) se tornem dispersíveis em sistemas aquosos, além de proteger esses compostos das condições que os degradem (ABBASI et al., 2014).

Diversas técnicas podem ser empregadas na encapsulação de compostos lipofílicos, e entre eles está a emulsificação (GUPTA et al., 2016; MCCLEMENTS; RAO, 2011). As emulsões têm a vantagem de poderem ser veiculadas diretamente ou incorporadas como ingredientes em alimentos (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010).

Emulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis, no qual um é a fase dispersa ou interna, e o outro é a fase contínua ou externa. Não são sistemas termodinamicamente estáveis, devido à tensão interfacial existente entre a fase dispersa e a contínua (MCCLEMENTS, 2005). Devido a este fato, para facilitar sua formação necessitam de aplicação de energia e de um emulsificante. Tal energia pode ser proveniente de dispositivos mecânicos, como no caso dos métodos de alta energia (homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e homogeneizadores ultrassônicos) (MCCLEMENTS, 2012). Alternativamente, podem ser produzidos pela alteração do sistema tensoativo-óleo-água ou das condições ambientais possibilitando a formação espontânea de gotículas de óleo dentro desse sistema, por meio de métodos de baixa energia (emulsificação espontânea e métodos de inversão de fase) (MCCLEMENTS, 2012).

Emulsificantes são moléculas anfifílicas, necessários para a estabilização de uma emulsão, através da formação de uma interface entre a fase dispersa e a fase contínua. Tais moléculas possuem atividade superficial e adsorvem em interfaces, como na superfície de gotículas, devido à sua estrutura tensoativa anfifílica (MCCLEMENTS, 2005).

Diversos tensoativos mais eficazes atualmente utilizados em produtos alimentícios são sintéticos, como os polisorbatos. Entretanto, os consumidores estão buscando alimentos que utilizem ingredientes naturais, e que sejam benéficos à saúde (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017). Uma alternativa encontrada pela indústria alimentícia é a substituição desses tensoativos sintéticos por naturais (BAINES; SEAL,

2012). Além disso, também se busca atualmente substituir ingredientes de origem animal por ingredientes de origem vegetal (DORIS, 2017).

É importante ressaltar que para os emulsificantes naturais (como as proteínas e os polissacarídeos) serem utilizados como ingredientes alimentícios eles devem ser classificados como seguros (ou *GRAS*, *generally recognized as safe*) (MCCLEMENTS; GUMUS, 2016; MCCLEMENTS, 2010; MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). McClements, Bai e Chung (2017) apresentam como principais emulsificantes naturais os fosfolipídios, os biotensoativos (p. ex. saponinas, soforolipídios, ramnolipídios, manoproteínas), as proteínas e os polissacarídeos, contanto que estes não sejam modificados quimicamente. Diversos estudos utilizam biopolímeros como agentes tensoativos, sendo os mais utilizados os isolados proteicos, os concentrados proteicos, proteínas isoladas do leite (beta-lactoglobulina, caseinato de sódio, por exemplo), goma arábica, pectina, galactomananas e carragenas (OZTURK; MCCLEMENTS, 2016; DICKINSON, 2010; GUZEY; MCCLEMENTS, 2006).

Em relação aos polissacarídeos, eles podem ser classificados em duas categorias para seu uso na estabilização de gotículas de emulsão: atuando como espessantes ou como emulsificantes. Os polissacarídeos são utilizados mais comumente para aumentar a viscosidade da fase contínua, reduzindo o movimento das gotículas e contribuindo na estabilidade das emulsões atuando como espessantes (MCCLEMENTS, 2005), pois a maioria é altamente hidrofílica e não apresenta atividade superficial, não sendo geralmente bons emulsificantes (DICKINSON, 2003). Entretanto, determinados polissacarídeos apresentam notável atividade superficial, devido à presença de grupos apolares ou proteínas ligadas à sua cadeia, possuindo boas propriedades emulsificantes (DOKIĆ; KRSTONOŠIĆ; NIKOLIĆ, 2012; DICKINSON, 2003; MCCLEMENTS, 2003). Exemplos de polissacarídeos com atividade superficial incluem goma arábica, pectina, goma de fibra de milho, mucilagem de mostarda amarela, quitosana, goma de tragacanto, amidos modificados e celuloses modificadas, apesar destes dois últimos não serem considerados estritamente naturais (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017).

A goma arábica é o exsudato de árvores de acácia, solúvel em água e capaz de produzir dispersões com baixa viscosidade, mesmo sendo utilizada em altas concentrações (BEMILLER; HUBER, 2010). Este polissacarídeo possui uma estrutura (Figura 3) altamente ramificada podendo conter unidades de galactose, arabinose,

ácido glucurônico, ramnose e a cadeia principal é constituída de unidades de β -D-galactopiranosil (WILLIAMS; PHILLIPS, 2001), além de unidades de ácido urônico nas extremidades (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

Figura 3 – Estrutura característica da goma arábica. A= arabinosil; R_1 = Ramnose $\rightarrow$ 4 Ácido glucurônico; R_2 = Galactose $\rightarrow$ 3 arabinose; R_3 = arabinose $\rightarrow$ 3 arabinose $\rightarrow$ 3 arabinose; ● = galactopiranosil ligada em 1 $\rightarrow$ 3; ○ = galactopiranosil ligada em 1 $\rightarrow$ 6 ou ácido urônico.

Fonte: IZYDORCZYK, M.; CUI, S. W.; WANG, Q. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. In: CUI, S.W. (Ed.) **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

A goma arábica possui caráter anfifílico, por ser um polieletrólito híbrido que contém proteínas e subunidades de polissacarídeos, o que facilita sua adsorção na interface óleo-água (DICKINSON, 2003; IDRIS; WILLIAMS; PHILLIPS, 1998). Devido a tais características, é capaz de estabilizar gotas de emulsão principalmente por repulsão estérica (Figura 4) (OZTURK et al., 2015; SILVA et al., 2015a;), pois forma uma camada interfacial espessa em torno das gotículas de óleo (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017; OZTURK et al., 2015).

Figura 4 – Repulsão estérica: mecanismo de estabilização das gotículas lipídicas contra a agregação

Fonte: MCCLEMENTS, D. J.; GUMUS, C. E. Natural emulsifiers - biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 234, p. 3–26, 2016.

A goma arábica é o tensoativo natural mais utilizado na indústria de alimentos (WILLIAMS; PHILLIPS, 2009), porém a sua maior desvantagem é a elevada razão tensoativo:óleo (~1:1) necessária para formar emulsões estáveis (CHAROEN et al., 2011). Além destas características, a goma arábica também é compatível com altas concentrações de açúcares, sendo usada na produção de balas de gomas, caramelos e pastilhas (BEMILLER; HUBER, 2010).

Como dito anteriormente, polissacarídeos são também utilizados como espessantes nas emulsões para contribuir com sua estabilidade. Exemplos de polissacarídeos que não possuem atividade superficial, ou seja, não adsorvem na interface óleo-água incluem goma xantana, alginatos, carragenas, ácido hialurônico (BOUYER et al., 2012) e inulina (SILVA et al., 2015a).

A inulina é um polissacarídeo de reserva de vários vegetais comestíveis, tais como cebola, alho, aspargo, alho-poró, alcachofra, banana e trigo (KARIMI et al., 2015; MEYER et al., 2011; KAUR; GUPTA, 2002). Entretanto, comercialmente é extraído das raízes de chicória (WOUTERS, 2010; BOECKNER; SCHNEPF; TUNGLAND, 2000). Este frutano possui baixo peso molecular e é composto por unidades de β -D-frutofuranosil unidas por ligações 2 $\rightarrow$ 1 (Figura 5) (BEMILLER; HUBER, 2010; IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

Figura 5 – Estrutura química da inulina (n = 20-30).

Fonte: IZYDORCZYK, M.; CUI, S. W.; WANG, Q. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications In: CUI, S.W. (Ed.) **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

A inulina tem baixo valor calórico (1,5 kcal/g) (ROBERFROID, 1999) e é considerada uma fibra dietética (TUNGLAND; MEYER, 2002; ANDERSSON; ELLEGÅRD; BOSAEUS, 1999), devido a presença de ligações β (2 $\rightarrow$ 1), que impedem sua digestão e absorção (ALVAREZ-SABATEL; MARAÑÓN; ARBOLEYA, 2015; ROBERFROID; SLAVIN, 2000). Entretanto ela é fermentada no cólon para fornecer lactato e ácidos graxos de cadeia curta que estimulam a multiplicação de bifidobactérias benéficas (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005). Devido a essas características ela é considerada um composto prebiótico (MEYER et al., 2011; BEMILLER; HUBER, 2010), e por causa de tais vantagens nutricionais, bem como características tecnológicas (tais como a formação de géis), o uso deste biopolímero em alimentos vem crescendo (ALVAREZ-SABATEL; MARAÑÓN; ARBOLEYA, 2015; MEYER et al., 2011).

A inulina é geralmente utilizada em conjunto com outros polissacarídeos (especialmente amidos e hidrocoloides), interagindo e produzindo efeito sinérgico (WITCZAK; WITCZAK; ZIOBRO, 2014). Alguns estudos utilizam inulina em combinação com outros materiais encapsulantes, como por exemplo, no estudo conduzido por Fernandes, Borges e Botrel (2014), em que os autores combinaram inulina com goma arábica, ou maltodextrina, ou amido modificado para encapsular óleo essencial de alecrim, utilizando a técnica de emulsificação por alta energia seguida de *spray-dryer*. Por sua vez, Silva et al. (2016) usaram misturas de inulina com goma arábica, ou isolado proteico de soro de leite (WPI) ou amido modificado (*Hi-Cap*) para encapsular óleo de semente de urucum, através de emulsificação por ultrassom seguido de secagem por liofilização. Em trabalho realizado por Zabot et al. (2016), os autores também utilizaram emulsificação por ultrassom seguido de secagem por liofilização e obtiveram resultados promissores ao misturar amido modificado com inulina para encapsular extrato de orégano. Por sua vez, Wang et al. (2016) combinaram inulina com alginato de sódio e leite desnatado para encapsular *Lactobacillus plantarum*, garantindo seu efeito probiótico, usando a técnica de extrusão. Através de microencapsulação por *spray-dryer* com emulsões por ultrassom Fernandes et al. (2016) estudaram diferentes proporções de blends de inulina com goma de cajueiro para encapsular óleo essencial de gengibre e, em seu estudo mais recente, Fernandes et al. (2017) encapsularam este mesmo óleo utilizando uma mistura de inulina com WPI e outras misturas de biopolímeros. Por fim, também através deste método de encapsulação, Campelo et al. (2017) utilizaram misturas de

inulina e WPI para encapsular óleo essencial de lima; Castel, Rubiolo e Carrara (2018) compararam blendas de inulina com goma arábica, ou com goma Brea para encapsular óleo de milho; e Oliveira et al. (2018) estudaram misturas de WPI com inulina para encapsular óleo de pequi. É importante notar que os estudos utilizando inulina em técnicas de microencapsulação são recentes, sendo mais numerosos nos últimos cinco anos, o que torna o tema do projeto, o qual engloba o uso de biopolímeros como tensoativos para a produção de emulsões, tema bastante atual.

2.4 Géis carregados com emulsões (*emulsion-filled gels*)

Géis são redes poliméricas tridimensionais estruturadas, formados pela reticulação das cadeias poliméricas através de ligações covalentes ou não-covalentes (CUI; WANG, 2005). Tais sistemas apresentam características de sólido elástico e, também, de líquido viscoso, sendo então considerados semisólidos viscoelásticos (BEMILLER; HUBER, 2010).

Segundo Geremias-Andrade et al. (2016), um gel carregado de emulsão é um sistema obtido através da substituição (parcial ou total) da água de uma matriz de gel por uma emulsão estável. Tais estruturas podem ser produzidas de duas formas: através da gelificação da fase contínua ou por agregação das gotículas da emulsão (Figura 6). Segundo Dickinson (2012), na prática, tais estruturas ocorrem simultaneamente, ou seja, o gel carregado de emulsão é uma rede híbrida que compreende gotículas incorporadas e também parcialmente agregadas.

Figura 6 - Representação teórica das duas estruturas combinada de géis carregados: (a) *Emulsion-filled gel* e (b) *Emulsion gel*.

Fonte: GEREMIAS-ANDRADE, I. M. et al. Rheology of emulsion-filled gels applied to the development of food materials. **Gels**, Basel, v. 2, p. 22-40, 2016.

Géis carregados são interessantes pelo fato de poderem ser aplicados na estruturação de diversos alimentos que têm características de géis, tais como sobremesas, sorvetes, queijos, iogurte e produtos cárneos processados, fortificando-

os com bioativos lipofílicos (GEREMIAS-ANDRADE et al., 2016; MUN et al., 2015). Para que sejam obtidas as propriedades viscoelásticas nestes produtos, eles são produzidos usando-se proteínas e/ou polissacarídeos de grau alimentício capazes de formar uma rede polimérica tridimensional ou particulada em fase aquosa (MUN et al., 2015).

As propriedades reológicas dos géis carregados de emulsão são fortemente dependentes das propriedades da rede de gel do polímero (LUPI et al., 2015; LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013). É importante estudar as propriedades reológicas dos géis carregados para compreender a interação entre os componentes (gotículas de óleo e matriz de gel) e a influência da concentração dos componentes na estrutura do gel (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013).

As gotículas lipídicas podem estar ou não estar ligadas à rede do gel. Se ocorrerem interações entre as macromoléculas da matriz do gel e as moléculas do tensoativos as gotículas interagem com o gel, as gotas são denominadas de partículas ativas (Figura 7a) e podem aumentar ou diminuir o módulo elástico. Se as gotículas não interagirem com a matriz de gel e tiverem pouca afinidade físico-química com as macromoléculas da matriz biopolimérica, são denominadas de partículas inativas (Figura 7b) e normalmente reduzem o módulo elástico do gel (SALA et al., 2007; VAN VLIET, 1988).

Figura 7 – Representação esquemática do comportamento das partículas: (a) ativas e (b) inativas.

Fonte: GEREMIAS-ANDRADE, I. M. et al. Rheology of emulsion-filled gels applied to the development of food materials. **Gels**, Basel, v. 2, p. 22-40, 2016.

Géis carregados de emulsão, além de poderem ser aplicados na estruturação de diversos alimentos, têm como vantagem a capacidade de incorporar não só componentes ativos lipofílicos (aprisionados no interior da gotícula de óleo), mas também, hidrofílicos (aprisionado na rede de gel) (AJAZUDDIN et al., 2013). A literatura apresenta vários estudos sobre géis carregados, tanto em sistemas proteicos quanto polissacarídicos, como géis produzidos com isolado proteico de soro

de leite, gelatina, micelas de caseína (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015), isolado proteico de soja (KIM; RENKEMA; VAN VLIET, 2001), goma gelana (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013), inulina (PARADISO et al., 2015), alginato (SATO; MORAES; CUNHA, 2014) e ágar (DE LAVERGNE et al., 2015).

2.5 Pectinas: estrutura e gelificação

As pectinas são polissacarídeos aniônicos lineares compostos em grande parte por unidades de ácido galacturônico (Figura 8a), sendo obtidas das paredes de células de plantas superiores (CHAN et al., 2017). Na indústria alimentícia estes polissacarídeos são muito utilizados como agentes gelificantes, espessantes ou estabilizantes, aplicados em compotas, geleias, sorvetes, molhos, gelatinas e bebidas lácteas acidificadas (KASTNER et al., 2014; BOLAND et al., 2004; DOUBLIER; CUVELIER, 1996). As pectinas não são digeridas ao longo do trato gastrointestinal, mas são facilmente degradadas pela microbiota do cólon, por isso elas são consideradas fibras dietéticas solúveis (MEHTA et al., 2015). Devido à sua capacidade de formar géis no trato gastrointestinal, as pectinas possuem muitos efeitos benéficos no organismo como, por exemplo, melhorar os níveis de colesterol e o metabolismo dos lipídeos (BROUNS et al., 2012) e prevenir e/ou controlar o diabetes (JENKINS et al., 1977).

Uma das características mais importantes das pectinas é seu grau de metoxilação, que pode ser definido como a porcentagem de grupos carboxílicos presentes na molécula que são esterificados com grupos metil (Figura 8b) (CHAN et al., 2017). Pectinas com alto grau de metoxilação (denominadas *pectinas HM*) possuem mais de 50 % dos grupos carboxila metilados e, pectinas com menos que 50% dos grupos carboxila metilados são denominadas de pectinas com baixo grau de metoxilação (*pectinas LM*) (HOLM; HERMANSSON; WENDIN, 2009; SHARMA et al., 2006). O tipo de pectina utilizado interfere na escolha das condições de processo para formação de géis. Pectinas LM contém uma maior quantidade de grupos livres de ácido carboxílico, e por isso formam géis na presença de cátions divalentes (como Ca^{2+}), sendo que essa capacidade aumenta com a diminuição do grau de metoxilação. Por sua vez, as pectinas HM formam géis na presença de açúcar (55-75 %) e em condições ácidas (pH 2,5-3,5) (KASTNER et al., 2014; FRAEYE et al., 2010; SHARMA et al., 2006).

Figura 8 – Estrutura química do monômero da pectina: (a) unidades de α -1,4-D-galacturônico (GalA); (b) unidades de GalA esterificados com metil.

Fonte: CHAN, S. Y. Pectin as a rheology modifier: origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 161, p. 118–139, 2017.

Além desses dois tipos de pectinas, existe outro tipo de pectina comercial, conhecida como pectina de baixo grau de metoxilação amidada (*pectinas LMa*), que é obtida através da desesterificação da pectina HM (Figura 9) (CHAN et al., 2017). A principal diferença entre as pectinas LMa e as pectinas LM é que existem grupos amida primários na estrutura química das pectinas LMa substituindo grupos éster de metil nos grupos carboxílicos das pectinas HM (CHAN et al., 2017). Outra característica do gel de pectinas LMa é que eles são termodinamicamente reversíveis, ou seja, eles podem ser aquecidos e solidificados novamente durante o resfriamento, enquanto que os géis com pectinas convencionais permanecem líquidos nesta condição (CHEN et al., 2014).

Figura 9 – Representação esquemática do processo de desesterificação das pectinas HM para formação das pectinas LMa.

Fonte: CHAN, S. Y. Pectin as a rheology modifier: origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 161, p. 118–139, 2017.

Segundo Löfgren, Hermansson e Walkenström (2002), os géis de pectinas HM podem formar redes mais homogêneas do que de pectinas LM puros; entretanto, é possível produzir géis com microestruturas semelhantes com pectinas diferentes (Figura 10), porque ambos os tipos de pectinas formam géis com fios que são agregados em feixes ou aglomerados e se ramificam de forma irregular. No estudo de Löfgren, Guillotin e Hermansson (2006), os autores constataram que a sacarose não influenciou na microestrutura do gel de pectinas LMa, mas em meio ácido (pH 3) a estrutura do gel parecia possuir fios retos, enquanto que em meio neutro (pH 7) a estrutura se apresentava mais fina, densa e ramificada (Figura 11).

Figura 10 – Estruturas da rede de géis de pectinas observadas por microscopia eletrônica de transmissão: (a) HM (0,75 % de pectinas HM e 60 % de sacarose); (b) LM (0,75 % de pectinas LM, 30 % de sacarose e 0,15 % de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); e (c) mistura HM/LM (0,75 % de pectinas HM, 0,75 % de pectinas LM, 60 % de sacarose e 0,15 % de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Fonte: LÖFGREN, C.; WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A.-M. Microstructure and rheological behavior of pure and mixed pectin gels. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 3, p. 1144-1153, 2002.

Figura 11 – Microestrutura dos géis com 0,8 % de pectinas LMa (a) em pH 3, sem sacarose; (b) em pH 3 com 30 % de sacarose; (c) em pH 7 sem sacarose.

Fonte: LÖFGREN, C.; GUILLITI, S.; HERMANSSON, A.-M. Microstructure and kinetic rheological behavior of amidated and nonamidated Lm pectin gels. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 7, p. 114-121, 2006.

As medidas reológicas são os dados mais comuns e confiáveis para o exame da transição sol-gel da pectina (KASTNER et al., 2014). Diversos estudos analisam como os aspectos reológicos dos géis de pectinas são afetados por variáveis como

pH, teor de sacarose, temperatura/taxa de resfriamento, concentração de cálcio e concentração de pectinas HM, LM e misturas de tipos diferentes de pectinas (KASTNER et al., 2014; FRAEYE et al., 2010; HOLM; HERMANSSON; WENDIN, 2009; LÖFGREN; HERMANSSON, 2007; CAPEL et al., 2006; GILSENAN; RICHARDSON; MORRIS, 2000).

Não foram encontrados na literatura muitos estudos sobre géis de pectinas carregados com emulsão. Sistemas de hidrogéis de pectina (HM ou LM) carregados com emulsão utilizando o princípio de complexação eletrostática para formar os géis, com a pectina sendo o biopolímero aniônico escolhido, e o caseinato de sódio o catiônico foram os mais estudados (CHUNG; DEGNER; MCCLEMENTS, 2013; CHUNG et al., 2013; MATALANIS; DECKER; MCCLEMENTS, 2012; MATALANIS et al., 2010; ZHANG; DECKER; MCCLEMENTS, 2014). Lupi et al. (2015) testaram quatro pectinas LM com diferentes graus de metoxilação e a pectina que apresentou o gel mais forte (maior G') foi carregado com emulsão. A emulsão foi preparada pela mistura da fase oleosa (azeite de oliva e tween 60) com a aquosa (dispersão de pectina em etanol e tampão) passando em seguida pelo processo de ultra-agitação. Os géis carregados foram obtidos através da gelificação da emulsão por adição de cloreto de cálcio, a temperatura ambiente.

Diante do exposto nesta revisão bibliográfica, pode-se observar que a incorporação de bioativos em alimentos é uma problemática relevante. O interesse na aplicação das vitaminas B₁₂ e D₃ é justificado pela suplementação necessária de dietas vegetarianas/veganais, em um nicho de mercado em franca expansão, e cuja oferta de produtos é muito menor que a demanda. Emulsões são uma alternativa interessante para a incorporação de vitamina D₃ aos alimentos por serem dispersíveis em meio aquoso, e possibilitarem um aumento na bioacessibilidade do micronutriente em questão, devido à sua natureza lipídica. Além disso, géis carregados de emulsão podem incorporar não só componentes ativos lipofílicos, mas também, hidrofílicos (como a vitamina B₁₂), aprisionando-os na rede de gel. Como o foco do trabalho é o público vegetariano, é importante ressaltar que os componentes utilizados devem ser provenientes de fontes naturais, e, por isso a escolha dos estabilizantes polissacarídicos. O óleo de linhaça também foi escolhido pensando-se no eventual apelo que este óleo pode ter junto ao público consumidor do produto, que não aceita produtos transgênicos, estruturado a partir do gel carregado de emulsão.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho de Mestrado teve como objetivo principal a produção, a caracterização e a avaliação da estabilidade físico-química de um gel de pectina carregado de emulsão incorporando vitaminas D₃ e B₁₂.

Para atingir o citado objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Determinação de condições otimizadas de produção das emulsões encapsulando vitamina D₃, utilizando inulina e goma arábica como estabilizantes, e óleo de linhaça como fase dispersa, por método de alto cisalhamento, avaliando-se parâmetros como tamanho médio de gota, potencial zeta e proteção da vitamina D₃ encapsulada;
- Determinação de condições otimizadas de produção dos géis de pectinas, avaliando parâmetros de pH, temperatura e concentração e tipo de pectina;
- Incorporação da emulsão de óleo de linhaça nos géis de pectinas, com determinação da influência da quantidade de emulsão adicionada na formação e nas características reológicas e mecânicas dos géis;
- Caracterização físico-química dos géis não-carregados e carregados através de ensaios oscilatórios de pequena amplitude, ensaios de compressão uniaxial e análise da microscopia ótica confocal a laser.
- Avaliação da estabilidade físico-química dos bioativos incorporados ao longo do tempo nos géis, através da quantificação das vitaminas D₃ e B₁₂, atividade de água, umidade e colorimetria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Produção das emulsões

Para a produção das emulsões foi utilizado óleo de linhaça dourada (CISBRA, Panambi, RS, Brasil) como fase lipídica. Os estabilizantes utilizados foram a goma arábica (Instantgum BB®, Nexira Commercial Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e a inulina (Frutafit®, IQ, Sensus, Roosendaal, Holanda). O bioativo incorporado nas emulsões foi a vitamina D₃ (colicalciferol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Benzoato de sódio foi utilizado como conservante (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Para o tampão citrato foi utilizado ácido cítrico (C₆H₈O₇) e citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil).

4.1.2 Caracterização das emulsões

O corante vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como fluoróforo, na análise de microscopia de fluorescência, dissolvido em etanol absoluto (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil). Para as análises de oxidação lipídica foram utilizados: clorofórmio (CHCl₃) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), iso-octano (C₈H₁₈), isopropanol (C₃H₈O), tiocianato de amônio (NH₄SCN), cloreto de bário (BaCl₂.2H₂O), sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) e metanol (UV-IR-HPLC) (Panreac, Barcelona, Espanha). Para a análise de quantificação de vitamina D₃ foi utilizado metanol (UV-IR-HPLC) (Panreac, Barcelona, Espanha). Óleo de silicone (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) foi utilizado durante as análises reológicas. Cloreto de potássio (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) foi utilizado na análise de potencial zeta.

4.1.3 Produção dos géis

Os géis foram produzidos com pectina de baixa metoxilação parcialmente amidada (pectina LMa, GENU® LM-102 AS-CAB, CPKelco, Limeira, SP, Brasil). Nos testes iniciais também foram usadas as pectinas de alta metoxilação (pectina HM, GENU® 121 *slow set*, CPKelco, Limeira, SP, Brasil) e de baixa metoxilação (pectina LM, GENU® LM 102-AS, CPKelco, Limeira, SP, Brasil).

Foram utilizados também a sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) e o cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil). O bioativo utilizado foi a vitamina B₁₂ (metilcobalamina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Para as análises dos géis foram utilizados hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Água deionizada foi utilizada nos experimentos, tendo sido proveniente de um sistema de purificação Direct Q3 (Millipore, Billerica, MA, EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Testes preliminares para a produção das emulsões

Foram realizados testes preliminares de produção das emulsões variando-se a forma de hidratação dos polissacarídeos (inulina e goma arábica). Também foi produzida uma emulsão somente com a goma arábica como tensoativo. Os métodos de preparo das suspensões de goma arábica e/ou inulina estão apresentados na Tabela 1. A razão de goma arábica e inulina foi de 1:1 (g/g), de acordo com a usada por Silva et al. (2016).

Tabela 1 – Modos de produção e formulações das suspensões testadas para fazer a emulsão e quantidade da fase oleosa presente na emulsão

Siglas	Goma arábica (g)	Inulina (g)	Água (g)	Óleo de linhaça (g)
SGA ^a	15,4	-	80,8	3,8
SGAIN ^b	7,7	7,7	80,8	3,8
SGA+IN ^c	7,7	7,7	80,8	3,8
FA ^d	10,0	10,0	75,0	5,0

^a: suspensão de goma arábica hidratada por 24 h;

^b: suspensão de goma arábica mais inulina hidratadas por 24 h;

^c: suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e, em seguida, adicionada de inulina em pó;

^d: suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e suspensão de inulina hidratada por 24 h, em seguida misturadas.

Fonte: Própria autoria.

Em seguida, estas suspensões passaram pelo processo de emulsificação pelo método de alta energia, utilizando-se ultra-agitação de acordo com o método descrito no item 4.2.2.

4.2.2 Produção das emulsões

A razão entre os biopolímeros goma arábica (GA) e inulina (IN) foi 1:1 (g/g) de acordo com o que foi utilizado por Silva et al. (2016). As formulações continham, em 100 g de emulsão: 75 g de tampão citrato, 10 g de IN, 10 g de GA, 5 g de óleo de linhaça. Para as amostras com bioativo, 12,5 mg de vitamina D₃ foram adicionadas diretamente na fase oleosa (FO). Foram preparadas suspensões de goma arábica (10 g de GA hidratada em 53,75 g de água) e de inulina (10 g de IN hidratada em 21,25 g de água) em água deionizada ou em tampão citrato (pH 3,5 e pH 4,0), sob agitação magnética. As suspensões foram preparadas pelo menos 24 h antes da emulsificação e armazenadas em repouso, a temperatura ambiente, para garantir a completa hidratação das cadeias de biopolímeros. Após a hidratação das suspensões, elas foram misturadas, constituindo a fase aquosa da emulsão. A FA e a FO foram colocadas sob temperatura controlada de 30 °C, e ao se atingir tal temperatura verteu-se a FA na FO. A mistura foi então submetida a um processo de ultra-agitação (T25, IKA, Staufen, Alemanha) a 13.000 rpm, por 5 min, sempre sob temperatura controlada (30 °C). Por fim, a dispersão obtida foi deixada sob agitação magnética em banho de gelo (10 °C) até atingir cerca de 20 °C.

4.2.3 Determinação do índice de cremação e sedimentação

O índice de cremação (IC) das emulsões foi analisado, de acordo com o método descrito por Silva et al. (2015a), durante o período de 20 dias. Imediatamente após a preparação da emulsão, alíquotas de 30 mL de cada uma das emulsões foram vertidas em uma proveta, seladas e armazenadas a aproximadamente 4 °C. A estabilidade da emulsão foi medida pela altura da fase superior durante o período de armazenamento. O IC foi determinado de acordo com a equação (1):

$$IC(\%) = \left(\frac{H_c}{H_T} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que:

H_T = altura inicial da dispersão

H_c = altura da fase superior (fase creme)

Para o índice de sedimentação (IS) o mesmo processo foi realizado, entretanto este valor foi obtido pela altura da fase inferior (fase sedimentada) (H_s) durante o período de armazenamento. Na equação (1) substituiu-se, então, H_c por H_s .

4.2.4 Microscopia ótica de fluorescência

O corante vermelho do Nilo foi encapsulado na emulsão para determinar a distribuição do material encapsulado, segundo protocolo adaptado de Abhyankar et al. (2011). Uma solução-estoque de corante vermelho do Nilo (0,1 g/100 mL de etanol) foi preparada e adicionada à fase oleosa (10 μ L de solução-estoque/g de óleo) no processo de produção da emulsão. A análise de microscopia de fluorescência no microscópio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC One Zeiss Drive, Thornwood, NY, EUA) com fonte de luz fluorescente HBO 100 foi realizada no dia seguinte (dia 0) ao preparo da emulsão. No caso das emulsões instáveis esta análise foi realizada no dia 20, para as fases sedimentada, intermediária e cremeada. Esta análise foi realizada no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (ZMV/FZEA/USP).

4.2.5 Determinação da densidade, tensão interfacial e tensão superficial

Foram preparadas suspensões de inulina e/ou goma arábica na proporção de 1:1 (g/g) (SILVA et al., 2016) de cinco modos diferentes, de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2 – Modos de produção e formulações das suspensões testadas para fazer os testes de tensão interfacial e superficial.

Siglas	Suspensão de goma arábica		Suspensão de inulina		
	Goma arábica (g)	Água (g)	Inulina (g)	Água (g)	Água* (g)
SGA ^a	10	52,5	-	-	-
SIN ^b	-	-	10	52,5	-
SGAIN ^c	10	75,0	10	-	-
SGA+IN ^d	10	52,5	10	-	22,5
FA ^e	10	53,75	10	21,25	-

a: suspensão de goma arábica hidratada por 24 h;

b: suspensão de inulina hidratada por 24 h;

c: suspensão de goma arábica e inulina misturadas e hidratadas por 24 h;

d: suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e, em seguida, adicionada de inulina em pó e o restante da água;

e: suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e suspensão de inulina hidratada por 24 h, em seguida misturadas.

*água adicionada após as 24 h de hidratação, para se completar 95 g de fase aquosa.

Fonte: Própria autoria.

As densidades foram obtidas por densímetro DMA 4500 (Anton Paar, Graz, Áustria) e estes dados foram utilizados como entrada para o cálculo das tensões interfacial e superficial. As tensões interfacial e superficial foram medidas utilizando-se anel de Du Nouy. Os valores de tensões registrados no mostrador do equipamento utilizam o fator de correção de acordo com o modelo matemático proposto por Huh e Mason (1975).

A tensão interfacial entre o óleo de linhaça e a água deionizada, e entre o óleo de linhaça e as suspensões de biopolímeros (SGA, SIN, SGA+IN, SGAIN, FA) e a tensão superficial das suspensões, do óleo e da água deionizada foram determinadas no tensiômetro de força Sigma 702 (Attension, KSV Instruments, Helsinque, Finlândia) utilizando-se anel de Du Nouy, de platina-irídio, com raio de 9,545 mm e raio do filamento de 0,185 mm. O equipamento possui sistema de controle de temperatura por meio de banho termostatzado, sendo assim as análises foram realizadas a $25 \pm 0,1$ °C. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Separações (ZEA/FZEA/USP).

4.2.6 Ensaios reológicos das suspensões e da emulsão

Os ensaios reológicos foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (ZEA/FZEA/USP), utilizando-se reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Tais análises reológicas foram realizadas em triplicata.

4.2.6.1 Determinação de curvas de fluxo

As análises foram realizadas utilizando geometria de cilindros concêntricos de parede dupla. Foram analisadas a suspensão de goma arábica, a fase aquosa da emulsão e a emulsão, na temperatura de 25 °C. A emulsão também foi analisada na temperatura de 8 °C (temperatura de armazenamento, sob refrigeração). Foi realizado inicialmente o *peak hold* por 5 min. As curvas de escoamento foram obtidas a uma taxa de deformação variando de 0,01 a 100 s⁻¹.

4.2.6.2 Ensaios oscilatórios de pequena amplitude: testes de varredura de deformação e varredura de frequência

Os protocolos utilizados para os testes de varredura de deformação e frequência foram adaptados de Chang et al. (2014). As amostras de suspensão de inulina (32 g/100 g) foram submetidas a testes oscilatórios de pequena amplitude. Esses testes foram realizados com geometria de placa-placa, 60 mm de diâmetro e *gap* de 1 mm. O óleo de silicone foi aplicado ao redor da amostra para prevenir perda de umidade durante o experimento. A amostra foi colocada no reômetro e as análises de varredura de deformação foram conduzidas para a determinação da região de viscoelasticidade linear (RVL), a uma frequência constante de 1 Hz, com a taxa de deformação variando de 0,01 a 100 %, a temperatura de 25 °C.

O teste de varredura da frequência foi realizado após a determinação da RVL. O tempo de acomodação das amostras antes do início de cada processo foi de 5 min. A varredura de frequência foi realizada a 25 °C, a uma taxa de deformação constante de 10 Pa, com frequência variando de 0,1 a 10 Hz. Os dados dos testes descritos foram tratados pelo programa *Rheology Advantage Data Analysis* (TA Instruments, New Castle, DE, EUA).

4.2.7 Avaliação da estabilidade físico-química

As emulsões foram armazenadas sob refrigeração em vidros âmbar com tapas de rosca e, em tempos determinados, foram retiradas alíquotas que foram analisadas em termos de tamanho médio e distribuição do tamanho de gota (conforme protocolo descrito no item 4.2.8), potencial zeta (conforme protocolo descrito no item 4.2.9), quantificação da vitamina D₃ (conforme protocolo descrito no item 4.2.10), avaliação da oxidação lipídica por análise de índice de peróxido (conforme protocolo descrito no item 4.2.11).

4.2.8 Determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho de gota

A distribuição de tamanho de gota e o diâmetro médio de gota foram obtidos utilizando-se difração a laser (SALD-201V, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 25 °C, realizado no Laboratório de Processos de Engenharia de Alimentos (ZEA/FZEA/USP). O comprimento de onda do laser foi 670 nm, com medições na faixa de 0 a 5 mW (resolução de 0,01 mW). As amostras foram dispersas em água deionizada antes das medições. O processamento dos dados foi realizado pelo software incluso no sistema

(Wing-1). As emulsões foram analisadas um dia após sua preparação (dia 0) e nos dias 10, 20 e 30. O tamanho das gotas de óleo foi expresso em diâmetro Broukere (D_{43}) (equação 2) e o índice de polidispersidade (*span*) foi determinado de acordo com a equação (3). Três replicatas das amostras foram medidas em triplicata.

$$D_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2)$$

$$span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (3)$$

Em que:

d_i = diâmetro médio de partícula

n_i = número de partículas

d_{10} = frequência de tamanho de 10 % das partículas (μm)

d_{50} = frequência de tamanho de 50 % das partículas (μm)

d_{90} = frequência de tamanho de 90 % das partículas (μm)

4.2.9 Determinação do potencial zeta

Os valores do potencial zeta (ζ) nas emulsões com e sem vitamina D₃ foi determinado por mobilidade eletroforética pelo equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA). As amostras foram diluídas em solução 1 mM de KCl e a mobilidade eletroforética foi calculada pelo equipamento utilizando a equação de Helmholtz–Smoluchowski. Para cada medida foram feitas 10 corridas, fornecendo como resultado uma média do potencial zeta (em mV).

4.2.10 Quantificação de vitamina D₃

Primeiramente foi realizada a extração da vitamina D₃ da emulsão. Durante a extração os tubos utilizados foram envolvidos com papel alumínio para evitar possíveis perdas durante o procedimento, visto que se tratava de um processo relativamente demorado. Uma massa de 0,3 g de emulsão e 5 mL de metanol foram misturados. Em seguida, cada amostra foi agitada sob vórtex durante 10 s, por 3 vezes e, depois, submetidas ao banho ultrassônico (410US, UNIQUE, Indaiatuba, SP, Brasil) por 5 min. As amostras foram então centrifugadas (centrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 7100 g a 4 °C, por 5 min, e o sobrenadante foi

coletado e reservado. Adicionou-se 5 mL de metanol ao tubo contendo o corpo de fundo e o procedimento foi repetido mais uma vez. Por fim, o sobrenadante retirado foi misturado com o sobrenadante reservado e o extrato coletado foi filtrado através de membrana de nylon de 0,45 µm com 13 mm de diâmetro interno. Em seguida, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 265 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração de vitamina D₃ foi determinada usando uma curva padrão da amostra (sem vitamina) extraída com metanol, segundo procedimento descrito, e acrescida de concentrações conhecidas de D₃ dissolvido em metanol. A análise foi realizada em sextuplicata e lidas com brancos extraídos da triplicata de emulsões sem D₃.

4.2.11 Avaliação da oxidação lipídica

Para análise dos produtos primários de oxidação, foi analisado o índice de peróxido adaptado do protocolo descrito por Shantha e Decker (1994). O valor de peróxido das emulsões foi avaliado durante 30 dias de estocagem a temperatura de refrigeração (~ 8°C). Primeiramente extraiu-se a fase oleosa da emulsão. Para tal, uma amostra de 500 µL de emulsão foi agitada em vórtex 3 vezes durante 10 s com 2 mL de uma mistura de iso-octano/isopropanol (3:2 v/v). As fases foram separadas por centrifugação (1.300 g durante 5 min). Uma alíquota de 200 µL da fase inferior foi coletada e adicionada a 2,8 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (7:3 v/v), 15 µL de solução de tiocianato de amônio 3,9 M e 15 µL de solução de ferro ferroso (preparado com quantidades iguais de cloreto de bário 0,132 M e sulfato ferroso 0,144 M). A amostra foi brevemente agitada em vórtex e ficou reagindo por 5 min no escuro. Em seguida, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 500 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração de hidroperóxido foi determinada por curva padrão de solução de Fe (III). O índice de peróxido foi determinado a partir da equação (4), expressa em miliequivalentes de peróxido por quilo de fase oleosa:

$$PV = \frac{Abs \times m}{55,84 \times m_o \times 2} \quad (4)$$

Em que:

PV = valor de peróxido

Abs = absorbância da amostra

m = coeficiente angular da curva de calibração

m_o = massa em gramas da fase oleosa

55,84 = peso atômico do Fe

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

4.2.12 Produção dos géis de pectina

Os géis de pectina foram preparados baseando-se em metodologia descrita por Holm, Hermansson e Wendin (2009), com modificações. Inicialmente foram testadas três pectinas diferentes: pectina de alto grau de metoxilação (denominada neste trabalho como *pectina* HM), pectina de baixo grau de metoxilação (denominada neste trabalho como *pectina* LM) e pectina de baixo grau de metoxilação parcialmente amidada (denominada neste trabalho como *pectina* LMa). Também foi testada a produção dos géis em tampão citrato pH 3,5 e 4,0, bem como em meio não-tamponado (pH aproximado de 4,5). Diferentes temperaturas foram testadas, até se chegar à temperatura mais baixa possível em que ocorresse gelificação. Assim, foi possível determinar a metodologia a ser utilizada para produção dos géis, cujo protocolo está descrito a seguir.

Para a produção de géis carregados houve substituição parcial da fase aquosa da matriz dos géis de pectina pelas emulsões. Substituiu-se 20, 40 e 60 % (mássica) da fase aquosa da matriz do gel pelas emulsões e as formulações estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Formulações dos géis de pectina não-carregados e carregados (g/100 g de amostra).

Amostra	CaCl ₂ .2H ₂ O	Sacarose	Pectina LMa	Tampão citrato	Emulsão*
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
GNC	0,1	30,0	4,0	65,90	0
GC20	0,1	30,0	4,0	52,72	13,18
GC40	0,1	30,0	4,0	39,54	26,36
GC60	0,1	30,0	4,0	31,36	34,54

*Em 100 g de emulsão contem: 75 g de tampão citrato, 10 g de inulina, 10 g de goma arábica e 5 g de óleo de linhaça e as emulsões com vitamina contem 12,5 mg de D₃.

Fonte: Própria autoria.

Em todas as formulações testadas foram adicionadas as quantidades de 0,1 % (mássica) CaCl₂.2H₂O e 30 % (mássica) de sacarose. Nos géis com vitaminas foram

adicionadas 5,5 mg de vitamina B₁₂ e a vitamina D₃ já estava encapsulada na emulsão. Uma solução-estoque de CaCl₂.2H₂O em solução tampão citrato (pH 4) foi feita para que fosse adicionada já solubilizado. A sacarose foi solubilizada em solução tampão citrato (pH 4) (ou na emulsão) (formando uma “calda” de açúcar), em temperatura controlada de 80 °C, facilitando assim a sua adição no processo de gelificação, e evitando que ela não solubilize completamente devido as temperaturas baixas testadas na produção do gel, na etapa de mistura dos ingredientes. Uma solução-estoque de vitamina B₁₂ (2 mg/mL) também foi preparada em tampão citrato (pH 4).

Uma dispersão-estoque de pectina LMa (14 g pectina LMa/100 g dispersão) foi preparada em tampão citrato (pH 4). A pectina LMa foi vertida no tampão (pré-aquecido a 40 °C, para melhor dispersão da pectina) sob agitação magnética constante. Esta mistura foi então agitada mecanicamente com impelidor tipo hélice (diâmetro 5 cm) por 120 min a 1000 rpm, a temperatura ambiente.

Uma concentração de 4 % (em massa) da solução-estoque de pectina LMa foi pesada e adicionada de tampão citrato (pH 4) (ou emulsão) e colocada em banho-maria sob temperatura controlada para atingir 60 °C (Figura 12a). A vitamina B₁₂ foi adicionada nesta dispersão de pectina, para os géis com bioativo. Em seguida, sob agitação mecânica contínua a 500 rpm, a solução de cloreto de cálcio (3 g CaCl₂.2H₂O/100 mL solução), foi adicionada (Figura 12b), a intensidade de agitação foi aumentada para 1000 rpm por 1 min (Figura 12c). A seguir, com a agitação mecânica a 500 rpm, a solução de sacarose fundida foi vertida na dispersão de pectina (Figura 12d) e a intensidade de agitação foi então aumentada para 1000 rpm por 1 min (Figura 12e). A massa da amostra foi corrigida com tampão citrato (pH 4) (Figura 12f) e, em seguida, foi reaquecida a 60 °C (Figura 12g). As amostras foram resfriadas e armazenadas a temperatura ambiente (Figura 12h). No agitador mecânico foi utilizado impelidor tipo hélice, com diâmetro de 5 cm.

Figura 12 – Etapas de produção dos géis de pectina.

Fonte: Própria autoria.

4.2.13 Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química dos géis

A caracterização físico-química foi realizada nos géis não-carregados e nos carregados com 20, 40 e 60 % de emulsão, através de ensaios oscilatórios de pequena amplitude, ensaios de compressão uniaxial e análise da microscopia ótica confocal a laser.

A avaliação da estabilidade físico-química foi realizada nos diferentes tratamentos (Tabela 4) em tempos determinados. As vitaminas B₁₂ e D₃ foram extraídas e quantificadas depois de incorporadas no gel, a fim de monitorar a capacidade dos géis carregados e não-carregados de proteção dos bioativos. A atividade de água, umidade e cor também foram mensurados. Os géis foram armazenados sob refrigeração (~ 8°C) em embalagens plásticas (Wyda zip, 18 x 23 cm).

Tabela 4 - Diferentes formulações (tratamentos) dos géis de pectina, carregados e não-carregados

Tratamento (gel)	Carregado com emulsão?	Incorporando vitamina D ₃ ?	Incorporando vitamina B ₁₂ ?
1 (GNC)	Não	Não	Não
2 (GNCB)	Não	Não	Sim
3 (GC40)	Sim	Não	Não
4 (GC40B)	Sim	Não	Sim
5 (GC40D)	Sim	Sim	Não
6 (GC40BD)	Sim	Sim	Sim

Fonte: Própria autoria.

4.2.14 Ensaios oscilatórios de pequena amplitude

Os protocolos utilizados para os testes de varredura de deformação e frequência foram adaptados de Capel et al. (2006). Os ensaios oscilatórios de pequena amplitude foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (ZEA/FZEA/USP), utilizando-se reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Estas análises foram realizadas em triplicata. Esses testes foram realizados com geometria de cone-placa (2°, 60 mm de diâmetro).

Os géis de pectina foram preparados de acordo com o item 4.2.12 e, após o ajuste de massa e reaquecimento a 60 °C, a dispersão foi imediatamente vertida no reômetro, com geometria pré-aquecida a 60 °C. O óleo de silicone foi aplicado ao redor da amostra para prevenir perda de umidade durante o experimento. Em sequência, a temperatura foi diminuída para 25 °C e esperou-se um tempo de acomodação de 20 min. Este tempo foi necessário para completa gelificação da amostra. As análises de varredura de deformação foram conduzidas para a determinação da RVL, a uma frequência constante de 1 Hz, com a taxa de deformação variando de 0,01 a 100 %, a temperatura de 25 °C.

O teste de varredura de frequência foi realizado após a determinação da RVL. Da mesma maneira as amostras de géis foram preparadas e imediatamente vertidas no reômetro com geometria pré-aquecida a 60 °C. A temperatura de acomodação das amostras antes do início de cada processo foi de 25 °C e o tempo de acomodação foi de 20 min. A varredura de frequência foi realizada a 25 °C. Foi monitorado o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') com frequência variando de 0,01 a 10 Hz, a uma tensão constante de 8 Pa.

Os dados dos testes descritos foram tratados pelo programa *Rheology Advantage Data Analysis* (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Os géis analisados foram: géis não-carregados e géis carregados com 20, 40 e 60 % de emulsão.

4.2.15 Ensaio de varredura de temperatura

Para os géis GNC e GC20 foi possível fazer a varredura de temperatura, utilizando-se reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Esses testes foram realizados com geometria de cone-placa (2°, 60 mm de diâmetro). Os géis de pectina foram preparados de acordo com o item 4.2.12 e, após o ajuste de massa e reaquecimento a 60 °C, a dispersão foi imediatamente vertida no reômetro, com geometria pré-aquecida a 60 °C. O óleo de silicone foi aplicado ao redor da amostra para prevenir perda de umidade durante o experimento. Em sequência, a temperatura foi diminuída enquanto que os módulos G' e G'' foram monitorados. Os experimentos foram realizados resfriando-se as amostras de 60 a 20 °C a uma taxa de decaimento de 2 °C por minuto. A varredura de temperatura foi realizada a frequência constante de 1 Hz e a tensão constante de 8 Pa (RVL). Os dados dos testes descritos foram tratados pelo programa *Rheology Advantage Data Analysis* (TA Instruments, New Castle, DE, EUA).

4.2.16 Ensaio de compressão uniaxial

As propriedades mecânicas foram determinadas no Centro Multiusuário de Funcionalidade de Macromoléculas (ZEA/FZEA/USP), utilizando um texturômetro TA.XTPlus (StableMicroSystems, Godalming, Surrey, Reino Unido).

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. Esperou-se 24 h após sua produção, para desenformá-las e realizar os testes de compressão uniaxial. A velocidade de compressão utilizada foi de 1 mm/s. Cada formulação foi analisada 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 (5) e (6), respectivamente:

$$\sigma_H = F(t) \cdot \frac{H(t)}{H_0 \cdot A_0} \quad (5)$$

$$\varepsilon_H = \ln \frac{H(t)}{H_0} \quad (6)$$

Em que:

$F(t)$ = força no tempo t

A_0 = área inicial

H_0 = altura inicial do gel

$H(t)$ = altura do gel no tempo t

Os valores de módulo de elasticidade (E) 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.

4.2.17 Microscopia de varredura a laser confocal

As análises de microscopia ótica confocal a laser foram realizadas segundo metodologia adaptada de Abhyankar, Mulvihill e Auty (2014). O corante isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1 mg/mL DMSO) foi utilizado para corar os polissacarídeos (inulina e goma arábica e pectina) e foi adicionado no momento da produção dos géis, na proporção de 0,05 mL da solução FITC para 1 mL de amostra de gel. A fase lipídica foi corada com o corante vermelho do Nilo (0,1 g/100 mL de etanol) e foi adicionado no momento da produção da emulsão uma proporção de 20 μ L de solução vermelho do Nilo para cada g de óleo. Após a gelificação das amostras, as imagens da microestrutura dos géis foram registradas com o microscópio invertido LSM780-NLO Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, LLC One Zeiss Drive Thornwood, NY, EUA), utilizando uma lente objetiva de imersão em óleo de 40 ampliações. A análise foi realizada no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC/ UNICAMP). Os polissacarídeos corados foram visualizados excitando o corante FITC no comprimento de onda de 488 nm, utilizando laser argônio e medindo a emissão em uma faixa de comprimento de onda de 505-530 nm. A fase lipídica foi visualizada excitando o corante vermelho do Nilo no comprimento de onda de 543 nm, utilizando laser neônio e medindo a emissão em uma faixa de comprimento de onda de 560-615 nm.

4.2.18 Quantificação da vitamina B₁₂

Para a extração da vitamina B₁₂, foi pesada uma massa de gel, à qual adicionou-se água deionizada na proporção de 1:2, em massa. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 80 °C até a completa fusão (por aproximadamente 20 min) e, depois, resfriadas até a temperatura ambiente. O pH das amostras foi ajustado para 8,3-8,5 com NaOH 5M. As amostras foram centrifugadas (centrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 7100 g a 25 °C, por 5 min, e a fase intermediária foi coletada. Por fim, o extrato coletado foi filtrado através de membrana de nylon de 0,45 µm (13 mm de diâmetro interno).

A determinação de vitamina B₁₂ foi feita por espectrofotometria, em valores de absorbância obtidos no comprimento de onda de 361,4 nm (ESTEVINHO et al., 2016) em espectrofotômetro Genesys^M 10S UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As análises foram realizadas em triplicata. Foi utilizado como branco o extrato dos tratamentos GNC, para gel não-carregado GC40, para os géis carregados. A concentração de vitamina B₁₂ foi determinada usando duas curvas-padrão, uma utilizando o extrato do tratamento GNC e, outra, o extrato do tratamento GC40, acrescidos de concentrações conhecidas de vitamina B₁₂.

4.2.19 Quantificação da vitamina D₃

A extração da vitamina D₃ do gel foi realizada de maneira semelhante à extração das emulsões. Primeiramente foi misturada 10 g gel com 20 g de água deionizada. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 80 °C até completa fusão (por aproximadamente 20 min) e, depois, resfriadas até a temperatura ambiente. Foi pesada uma massa de 2,0 g desta amostra, que foi misturada com 4 mL de metanol. Em seguida, cada amostra foi agitada sob vórtex durante 10 s, por 3 vezes e, depois, submetidas ao banho ultrassônico (410US, UNIQUE, Indaiatuba, SP, Brasil) por 5 min. As amostras foram então centrifugadas (centrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 7100 g a 4 °C, por 5 min, e o sobrenadante foi coletado e reservado. Adicionou-se 4 mL de metanol ao tubo contendo o corpo de fundo e o procedimento foi repetido mais uma vez. Por fim, o sobrenadante retirado foi misturado com o sobrenadante reservado e o extrato coletado foi filtrado através de membrana de nylon de 0,45 µm com 13 mm de diâmetro interno. Em seguida, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 265 nm em espectrofotômetro

(Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), utilizando-se como branco o extrato do tratamento GC40. As análises foram realizadas em triplicata. A concentração de vitamina D₃ foi determinada usando uma curva-padrão utilizando o extrato do tratamento GC40 acrescidos de concentrações conhecidas de D₃.

4.2.20 Determinação da cor instrumental dos géis

A cor instrumental dos géis foi determinada em colorímetro MiniScan EZ (HunterLab, Reston, VA, EUA). Para essa análise, foi necessário fazer a calibração do colorímetro com duas placas padrões, preta e branca, respectivamente. Utilizou-se como fundo papel sulfite branco, para leitura das amostras. As análises foram realizadas em triplicata. Foram determinados os parâmetros colorimétricos (L*, a*, b*) e calculados os valores de croma (C*_{ab}), ângulo de Hue (h_{ab}) e diferença total de cor (TCD). Esta análise foi realizada no Centro Multiusuário de Funcionalidade de Macromoléculas (ZEA/FZEA/USP).

A determinação do parâmetro C*_{ab} foi determinada pela equação (7).

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (7)$$

Em que:

C*_{ab} = croma (saturação da cor)

b* = cromaticidade no eixo variando do amarelo/azul

a* = cromaticidade no eixo variando do vermelho/verde

A tonalidade do sistema, definida como o ângulo de Hue, foi obtida pela Equação (8).

$$h_{ab} = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (8)$$

Em que:

h_{ab} = ângulo de Hue (tonalidade definida em graus)

b* = cromaticidade no eixo variando do amarelo/azul

a* = cromaticidade no eixo variando do vermelho/verde

Por sua vez, a diferença total de cor (TCD) foi obtida pela Equação (9).

$$TCD = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (9)$$

Em que:

L_0^* , a_0^* e b_0^* = parâmetros obtidos no dia zero de estocagem

L^* , a^* e b^* = parâmetros obtidos nos dias de amostragem

4.2.21 Determinação da umidade

A determinação da umidade dos géis foi realizada utilizando-se analisador de umidade MB35 (Ohaus, OH, EUA).

4.2.22 Determinação da atividade de água

A atividade de água foi determinada utilizando-se o equipamento Aqualab (Decagon Devices, Pullman, WA, EUA).

4.2.23 Análises estatísticas

Para a obtenção das análises estatísticas dos resultados, utilizou-se o programa SAS (*Statistical Analyses System*, Cary, NC, EUA), versão 9.3, o qual foi aplicado o teste de médias (teste de Tukey) ao nível de 5 % de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação das condições de produção das emulsões

Um dos primeiros objetivos do presente Mestrado foi definir os parâmetros de produção das emulsões, como intensidade e tempo de cisalhamento, temperatura, concentração da fase oleosa e da fase aquosa e as quantidades de tensoativos utilizadas.

Inicialmente foram testados modos de preparo das suspensões de goma arábica e/ou inulina, de quatro maneiras. A razão de goma arábica e inulina foi de 1:1 (g/g) e a de óleo e biopolímeros foi de 1:4 (g/g). A Figura 13 mostra o aspecto visual das amostras, 24 h após seu preparo.

Figura 13 – Aspecto visual das emulsões preparadas com a: (a) suspensão de goma arábica e inulina hidratadas juntas por 24 h (SGAIN); (b) suspensão de goma arábica hidratada por 24 h e, em seguida, adicionada de inulina em pó (SGA+IN); (c) suspensão de goma arábica hidratada por 24 h (SGA); (d) suspensão de goma arábica e de inulina hidratadas separadamente por 24 h (FA), após 24 h de sua produção

Fonte: Própria autoria

A amostra preparada com suspensão de goma arábica (16 g/100 g de suspensão) e suspensão de inulina (32 g/100 g suspensão) hidratadas separadamente por 24 h e, em seguida, misturadas para formar a fase aquosa (FA) da emulsão, foi a única que formou uma emulsão estável, no dia seguinte a sua preparação (Figura 13d). Todas as demais emulsões desestabilizaram. As dispersões SGAIN e SGA+IN com o tempo apresentaram também mais uma fase. A Figura 14

apresenta as micrografias das três fases que as emulsões desestabilizadas apresentaram com o tempo. A Figura 15 apresenta a micrografia da emulsão estável.

Figura 14 – Micrografias óticas de fluorescência das fases creme, intermediária e sedimentada das amostras SGAIN, SGA+IN e SGA, após 20 dias. Barra de escala = 20µm.

Fonte: Própria autoria

Figura 15 – Micrografia obtida por microscopia óptica de fluorescência da emulsão em água deionizada, no primeiro dia de armazenagem. Barra de escala = 20 µm

Fonte: Própria autoria.

Nas imagens do microscópio óptico de fluorescência, a fase oleosa (óleo de linhaça) está corada em vermelho. Pode-se observar que as suspensões desestabilizadas não possuíam tamanho médio de gota de óleo uniforme, sendo que algumas apresentam tamanhos muito grandes, além disso sua distribuição não era homogênea e as gotas em algumas fases das suspensões se mostraram floculadas. Pode-se perceber que haviam gotículas de óleo presentes em todas as micrografias, portanto as emulsões se separaram em 3 fases denominadas neste trabalho de fase creme, intermediária e sedimentada. A emulsão estável apresentou gotículas de óleo uniformemente distribuídas pela fase contínua.

O índice de cremação e sedimentação das emulsões foram obtidos e medidos durante 20 dias e estão mostrados nas Figuras 16 e 17, respectivamente:

Figura 16 – Índice de cremação das amostras feitas com SGA+IN, SGAIN e SGA.

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 – Índice de sedimentação das amostras SGA+IN e SGAIN.

Fonte: Própria autoria.

Pelos gráficos apresentados observa-se que a amostra que continha somente goma arábica em sua composição não sedimentou, somente cremeou, mas que as amostras que continham a mistura de goma arábica com inulina cremearam e sedimentaram.

5.1.1 Determinação das tensões interfacial e superficial

As densidades do óleo de linhaça, da água deionizada, das suspensões usadas nos testes iniciais das emulsões, exceto de inulina, foram determinadas e os resultados estão apresentados na Tabela 5. Para este teste a suspensão de inulina foi usada na mesma concentração da de goma arábica (16 g/100 g de suspensão), devido à inulina ter formado um gel na concentração 32 g/100 g de suspensão (seção 5.2), sistema este muito viscoso, que não flui no tubo do equipamento.

Tabela 5 – Densidades do óleo de linhaça, água deionizada, suspensões de biopolímeros e emulsão, após 24 h de seu preparo, em temperatura ambiente (25 °C).

Sistema	Densidade (g/cm ³)
Óleo de linhaça (OL)	0,92429 ± 0,00016
Água deionizada (ADI)	0,99714 ± 0,00000
Suspensão de inulina (SIN)	1,05729 ± 0,00010
Suspensão de goma arábica (SGA)	1,05865 ± 0,00008
Suspensão de goma arábica misturada com a suspensão de inulina (FA)	1,07832 ± 0,00024
Suspensão de goma arábica mais inulina (SGAIN)	1,07893 ± 0,00009
Suspensão de goma arábica adicionando inulina após 24 h (SGA+IN)	1,07955 ± 0,00017

Fonte: Própria autoria

Os valores de densidade obtidos foram utilizados como valores de entrada para o cálculo da tensão interfacial entre o óleo de linhaça e os outros sistemas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Tensão interfacial entre o óleo de linhaça e água deionizada, fase aquosa da emulsão, emulsão, suspensões de: goma arábica, inulina e suspensões e goma arábica e inulina.

Fase aquosa	Tensão Interfacial (mN/m)
	Huh-Mason
ADI	5,05 ± 0,26 ^a
SGAIN	4,60 ± 0,11 ^a
SGA+IN	4,57 ± 0,31 ^a
SIN	4,53 ± 0,29 ^a
FA	4,51 ± 0,20 ^a
SGA	3,71 ± 0,35 ^b
Sign.	*

^{a-b} – médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

Sign. = Significância: * significativo ao nível de 5 % de probabilidade (p<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Segundo os dados da Tabela 6, o sistema óleo de linhaça+SGA apresentou a menor tensão interfacial. Apesar de esta suspensão ter uma menor tensão interfacial

com o óleo ela pode ter não formado uma emulsão estável devido à necessidade de utilizar a goma arábica em grandes quantidades para produzir emulsões estáveis (CHAROEN et al, 2011). A tensão interfacial dos demais sistemas com o óleo não apresentou diferença significativa, apesar do sistema denominado de fase aquosa ter formado uma emulsão estável. Somente com estes dados não é possível ainda explicar porque está emulsão foi estável. Na seção 5.3.4 será discutida uma hipótese para tal estabilidade.

A tensão superficial de todos os sistemas, com o ar, foi analisada e os resultados estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Tensão superficial da água, da emulsão, da fase aquosa da emulsão e das suspensões e goma arábica e inulina preparadas de diferentes formas.

Sistema	Tensão Superficial (mN/m)
	Huh-Mason
ADI	72,50 ± 0,35 ^a
SIN	55,34 ± 2,23 ^b
SGAIN	48,72 ± 1,53 ^c
SGA+IN	47,22 ± 0,97 ^c
SGA	47,12 ± 2,24 ^c
FA	46,75 ± 1,92 ^c
OL	33,33 ± 0,25 ^d
Sign.	*

^{a-d} – médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

Sign. = Significância: * significativo ao nível de 5 % de probabilidade (p<0,05).

Fonte: Própria autoria.

Todos os sistemas que continham goma arábica na composição apresentaram tensão superficial menor do que da SIN e não apresentaram diferença significativa entre si. Esses dados, somente corroboram com o fato que a goma arábica é um tensoativo natural, por ser um polieletrólito híbrido, que contem proteínas e subunidades de polissacarídeos, propriedades que conferem a esta goma um caráter anfifílico, permitindo sua adsorção na interface óleo-água (DICKINSON, 2003; SILVA et al., 2016). Entretanto, apesar de não haver diferença significativa dos sistemas com a mistura goma arábica e inulina, somente uma formulação (a FA) resultou em uma emulsão estável. Este fato pode ser explicado pelo método de preparação da

suspensão de inulina a qual formou um gel (seção 5.2), antes de ser misturada com a suspensão de goma arábica. A alta viscosidade da suspensão de inulina possivelmente restringiu o movimento das gotículas de óleo proporcionando maior resistência à separação de fases.

A suspensão de inulina aumentou a tensão interfacial. Dispersões que têm interações com o solvente mais fortes que as interações com a fase gasosa evitam a interface, fazendo com que a tensão superficial da suspensão aumente (SHAW, 1992). A inulina é um polissacarídeo que não possui atividade superficial (SILVA et al., 2016), por esse motivo ela apresentou uma tensão superficial maior que as suspensões que continham goma arábica.

5.2 Caracterização reológica das emulsões

Foram avaliados o comportamento reológico da suspensão de inulina (32 g/100 g) da suspensão de goma arábica (16 g/100 g), da mistura destas suspensões (fase aquosa da emulsão) e da emulsão, a fim de determinar a viscosidade aparente dos sistemas e o comportamento do fluido em cada etapa do processo de emulsificação. Estes dados auxiliam na discussão da estabilidade da emulsão e na compreensão de suas características.

Os ensaios oscilatórios de pequena amplitude foram realizados para a suspensão de inulina, no intuito de confirmar se havia a formação de gel. Foi realizado o teste de varredura de deformação para poder definir a região de viscoelasticidade linear (RVL), na temperatura de 25 °C, e a triplicata da análise está representada na Figura 18.

Figura 18 - Rampas de tensão das suspensões de inulina (32 g/100 g), 24 h após preparação, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento

Fonte: Própria autoria.

Pode-se visualizar a RVL e escolher a tensão de 10 Pa para aplicar na varredura de frequência. Os módulos de armazenamento e de perda em função da frequência angular foram analisados e os resultados podem ser vistos na Figura 19.

Figura 19 – Curvas de varredura de frequência das suspensões de inulina (32 g/100 g), 24 h após preparação, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento e G'' é o módulo de perda.

Fonte: Própria autoria

Através das curvas de varredura de frequência pode-se constatar que houve formação de gel na suspensão de inulina de concentração 32 g/100 g, deixada hidratando por 24 h, visto que o G' é maior que G'' (STEFFE, 1996). Também foi possível perceber que G' foi constante no intervalo de frequência aplicado, dados similares foram obtidos por Glibowski (2010).

As curvas de viscosidade da suspensão de goma arábica, fase aquosa da emulsão e emulsão foram obtidas e estão representadas na Figura 20. Através das curvas de viscosidade foi possível avaliar o tipo de comportamento dos fluidos. A suspensão de goma arábica (Figura 20a) apresentou comportamento de fluido newtoniano, com viscosidade de $0,01437 \pm 0,00010$ Pa.s, a temperatura de 25 °C. Esta goma tem como peculiaridade a capacidade de formar suspensões com baixa viscosidade mesmo em altas concentrações (BEMILLER; HUBER, 2010).

As curvas de viscosidade da fase aquosa (Figura 20b), da emulsão a 25 °C (Figura 20c) e da emulsão a 8 °C (Figura 20d) mostram que os fluidos a baixas taxas de deformação, ou seja, quando o fluido está em repouso, apresentaram comportamento de fluido não newtoniano, do tipo pseudoplástico. A viscosidade da fase aquosa, que é a mistura da suspensão de goma arábica com a suspensão de inulina foi maior que a suspensão de goma arábica, a baixas taxas de deformação. Esse fato comprova que a suspensão de inulina, por ter formado um gel, aumentou a viscosidade do sistema, fato que possivelmente ajudou na estabilidade da emulsão formada. Também foi possível perceber que, a baixas taxas de deformação, as emulsões, em ambas as temperaturas analisadas, apresentaram uma maior viscosidade aparente que sua fase aquosa. Este fato pode ser explicado devido este sistema ter sido adicionado de óleo, enquanto que a fase aquosa somente há mistura de polissacarídeos.

Outro fato importante a ser observado nas curvas de viscosidade foi que em maiores taxas de deformação, quando o fluido está escoando, todos os sistemas apresentaram comportamento de fluido newtoniano, como a suspensão de goma arábica.

Figura 20 - Variação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação das amostras, 24 h após sua preparação: (a) suspensão de goma arábica (SGA) a 25 °C; (b) fase aquosa (FA) da emulsão a 25 °C; (c) emulsão (E) a 25 °C; e (d) emulsão a 8 °C.

Fonte: Própria autoria.

Assim, a formulação de emulsão escolhida para continuar o projeto foi a única que se mostrou estável, que foi preparada com suspensão de goma arábica (16 g/100 g) e inulina (32 g/100 g) hidratadas por 24 h, separadamente, para posteriormente serem misturadas e formarem a fase aquosa da emulsão (FA).

5.3 Avaliação da estabilidade físico-química

Para a avaliação da estabilidade físico-química, a emulsão escolhida foi preparada em tampão citrato (pH 3,5 e 4,0) devido ao fato de que ela foi usada para produzir os géis de pectina carregados com emulsão. O uso de pH 3,5 deve-se ao fato de que a pectina que foi utilizada na constituição do gel forma géis em valores de pH ácidos. Sabe-se também que a vitamina B₁₂ é mais estável em meios a pH 4,0, e por isso a escolha deste valor de pH para produção dos géis. O tampão citrato foi escolhido devido ao fato de se pretende chegar próximo à formulação de uma bala

de goma, sendo que este tampão poderia eventualmente auxiliar nas características sensoriais do produto.

Em seguida, a emulsão em pH 4,0 foi escolhida e adicionada de vitamina D₃ e avaliada durante o período de 30 dias em termos de tamanho médio e distribuição do tamanho de gota, potencial zeta, oxidação lipídica e quantificação da vitamina D₃.

5.3.1 Determinação do tamanho médio e distribuição do tamanho de gota

A estabilidade das emulsões (em água deionizada e em tampão citrato com pH 3,5 e com pH 4,0) foi acompanhada ao longo do tempo de estocagem, sob refrigeração, em relação à distribuição do diâmetro hidrodinâmico das gotículas e do diâmetro médio. A Tabela 8 apresenta os resultados para o diâmetro médio, em volume, durante o período de estocagem avaliado.

Tabela 8 – Diâmetro hidrodinâmico médio de gotas (D₄₃), em volume, e *span* das emulsões produzidas com água deionizada e tampão citrato em pH 3,5 e pH 4,0

Tempo (dias)	Água deionizada		Tampão pH 3,5		Tampão pH 4,0	
	D ₄₃ (µm)	<i>span</i>	D ₄₃ (µm)	<i>span</i>	D ₄₃ (µm)	<i>span</i>
0	2,68±0,13 ^{ab}	1,86±0,09	2,62±0,08 ^{ab}	1,87±0,03	2,74±0,08 ^b	1,85±0,03
5	2,63±0,10 ^{abc}	1,86±0,03	2,52±0,06 ^{ab}	1,90±0,06	3,16±0,24 ^a	1,98±0,27
10	2,68±0,09 ^a	1,89±0,04	3,15±1,02 ^a	2,47±1,20	2,57±0,08 ^b	1,82±0,04
20	2,60±0,08 ^{abc}	1,85±0,05	2,68±0,25 ^{ab}	1,94±0,28	2,65±0,07 ^b	1,85±0,02
30	2,54±0,10 ^c	1,86±0,06	2,49±0,10 ^b	2,15±0,72	2,60±0,09 ^b	1,86±0,04
40	2,55±0,07 ^{bc}	1,91±0,04	-	-	-	-
Sign.	*		*		*	

^{a-b} – médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

Sign. = Significância: * significativo ao nível de 5 % de probabilidade (p<0,05),

Fonte: Própria autoria

O diâmetro médio de gota apresentou diferença significativa para as emulsões produzidas nas diferentes fases aquosas. Os valores de *span* expressam o grau de uniformidade da distribuição das gotículas, e quanto menor o seu valor, maior a homogeneidade do diâmetro de gota da emulsão. Entretanto, estes dados não devem ser analisados sozinhos. Assim, as curvas de distribuição de tamanho (em termos de volume) foram também avaliadas e estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Curvas de distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas com: (a) água deionizada; (b) tampão citrato em pH 3,5; e (c) tampão citrato em pH 4,0, em termos de volume.

Fonte: Própria autoria.

As curvas de distribuição em volume apresentaram bases largas, com população heterogênea. Entretanto, observa-se que o diâmetro médio foi estável ao longo do tempo, para todas as fases aquosas. Os polissacarídeos tendem a estabilizar as gotas de emulsão pelo mecanismo de repulsão estérica; devido a este fato, as gotículas revestidas com a goma arábica tendem a ser muito menos afetadas pelas mudanças de pH (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017; OZTURK et al., 2015). Também é devido a esse mecanismo de estabilização que o volume das gotas é heterogêneo, visto que a goma arábica forma uma camada interfacial espessa em torno das gotículas de óleo, fazendo com que apresentem diversos tamanhos. A distribuição de tamanho da fase dispersa da emulsão fresca pode ser confirmada através de microscopia ótica de fluorescência (Figura 15).

Posteriormente foi avaliada ao longo do tempo de estocagem, sob refrigeração, a estabilidade das emulsões em tampão citrato (pH 4,0) com e sem vitamina D₃, para efeito comparativo. A emulsão em tampão citrato sem vitamina foi novamente avaliada devido a mudança no lote de óleo de linhaça utilizado como fase oleosa e, também, para um melhor efeito comparativo, visto que as emulsões com e sem vitamina foram preparadas no mesmo dia e foram armazenadas juntas, no mesmo refrigerador, sofrendo influências ambientais iguais. A Tabela 9 apresenta os resultados para o diâmetro médio, em volume, durante o período de estocagem avaliado.

Tabela 9 – Diâmetro hidrodinâmico médio de gotas (D₄₃), em volume, e span das emulsões produzidas em tampão citrato (pH4,0) sem vitamina (EB) e com vitamina D₃ (ED).

Tempo (dias)	EB		ED		Sign.
	D ₄₃ (µm)	span	D ₄₃ (µm)	span	
0	2,41 ± 0,07 ^{BC}	1,93 ± 0,29 ^A	2,46 ± 0,12 ^A	1,78 ± 0,08 ^A	n.s.
10	2,62 ± 0,18 ^{Aa}	1,78 ± 0,11 ^{ABa}	2,32 ± 0,08 ^{Bb}	1,58 ± 0,07 ^{Bb}	*
20	2,52 ± 0,10 ^{ABa}	1,66 ± 0,04 ^{Ba}	2,23 ± 0,03 ^{Bb}	1,57 ± 0,05 ^{Bb}	*
30	2,25 ± 0,03 ^{Cb}	1,57 ± 0,07 ^{Ba}	2,33 ± 0,08 ^{Ba}	1,63 ± 0,11 ^{Ba}	*
Sign.	*	*	*	*	

^{a-b} – médias seguidas com a mesma letra minúscula na mesma linha não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

^{A-C} – médias seguidas com a mesma letra maiúscula na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

Sign. = Significância: * significativo ao nível de 5 % de probabilidade (p<0,05), n.s.: não significativo, Fonte: Própria autoria.

O diâmetro médio de gota para a emulsão sem vitamina (EB) apresentou diferença significativa durante o tempo de estocagem, que não foi regular, entretanto seu valor de *span* diminui ao longo de tempo, sem diferença significativa a partir do dia 10 de estocagem, indicado que a distribuição das gotas de óleo na emulsão não se modificou ao longo do tempo. Já a emulsão com vitamina D₃ (ED) encapsulada apresentou valores de diâmetro médio e de *span* diminuído no dia 10, comparado ao dia 0 e, sem diferença significativa nos dias posteriores analisados. Comparando-se as emulsões em um mesmo período percebe-se que no dia 10 e 20 a ED apresentou valores de *span* e diâmetro médio menores que EB, entretanto no dia 30 ela apresentou um valor de diâmetro maior que EB. Apesar desta discrepância, o valor do diâmetro no dia 30 teve um aumento pequeno e os valores de *span*, entre estas emulsões no dia 30, não apresentaram diferença significativa.

Os valores de *span* apresentaram valores um pouco menores do que os da Tabela 8, mas ainda assim consistentes, indicando homogeneidade da distribuição de diâmetro de gota das emulsões, podendo este fato ser explicado devido a mudança de lote do óleo. Novamente, estes dados não devem ser analisados sozinhos. Assim, as curvas de distribuição de tamanho (em termos de volume) foram avaliadas e estão apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Curvas de distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas em tampão citrato (pH 4,0) (a) sem vitamina (b) com vitamina D₃, em termos de volume

Fonte: Própria autoria.

Em relação à distribuição do diâmetro hidrodinâmico das gotículas, observa-se curvas com bases largas, com população iniciando em 0,5 µm até aproximadamente 9 µm. A distribuição foi estável ao longo do tempo para as duas emulsões. Estes dados foram semelhantes aos obtidos quando se analisou a emulsão sem vitamina em diferentes pHs. Esta distribuição, novamente, deve-se ao mecanismo de estabilização dos polissacarídeos por repulsão estérica.

5.3.2 Estabilidade da vitamina D₃ encapsulada

Foram testados alguns protocolos para a quantificação da vitamina D₃ por cromatografia líquida de alta eficiência e por espectrofotometria. Optou-se pelo uso da espectrofotometria devido ao fato de a presença da inulina causar possíveis danos à coluna cromatográfica, devido não se conseguir separar completamente a inulina do extrato de D₃ com metanol, nem mesmo depois do processo de filtração.

Durante as tentativas iniciais de quantificação por espectrofotometria, entretanto, descobriu-se que a emulsão tem compostos que interferem na leitura da absorbância em 265 nm. O interferente está presente na inulina e no óleo de linhaça.

Dessa forma foi necessário construir uma curva-padrão utilizando a extração da própria amostra sem vitamina, a qual também foi utilizado como branco. É importante ressaltar que a absorvidade molar (ϵ) da vitamina D₃ é de 18200 (NAPOLI; KOSZEWSKI; HORST, 1986), sendo necessária a utilização de uma concentração alta desta vitamina na emulsão para que se consiga quantificá-la em espectrofotômetro.

Para melhor reprodutibilidade dos resultados, foram feitas três emulsões sem vitamina D₃ obtendo-se, assim, três brancos diferentes, que foram estocados da mesma maneira que as emulsões com vitamina D₃, assim, diminuindo a interferência dos compostos na leitura de absorbância em 265 nm. Foram feitas seis emulsões iguais e todas foram analisadas com três brancos, obtendo 18 respostas das quais seis foram eliminadas devido a discrepância com os demais resultados, causada erros indeterminados.

Teoricamente, adicionou-se 12,5 mg de vitamina D₃ em 100 g de emulsão. A concentração de vitamina D₃, em mg/100 g de emulsão, ao longo de 30 dias de estocagem sob refrigeração, está apresentada na Figura 23.

Figura 23 – Perfil temporal de concentração de vitamina D₃ nas emulsões.

Fonte: Própria autoria.

A perda inicial do bioativo foi baixa, e a quantidade verificada no início do período de armazenamento (dia 0) e no dia final não apresentou diferença significativa. O desvio padrão observado também foi baixo para uma escala em mg.

Sabe-se que a vitamina D₃ é muito sensível a diversos fatores ambientais como: radiação UV, presença de oxigênio e calor (ABBASI et al., 2014). Um dos fatores importantes para a baixa perda de vitamina verificada foi a metodologia de preparo da emulsão que utilizou uma temperatura baixa e controlada, além de cuidados na hora do preparo e da extração, em que a luz do ambiente ficou apagada. Assim, foi possível verificar que a emulsão possui alta capacidade de proteção a vitamina D₃. É interessante ressaltar que, apesar da alta concentração de vitamina adicionada a emulsão para se conseguir quantificá-la, pode-se diminuir a sua quantidade na emulsão, visto que ela foi encapsulada adequadamente e sem perdas ao longo do tempo, caso deseje adequar ao limite de ingestão diário, dependendo da quantidade de emulsão a ser utilizada como ingrediente alimentício.

5.3.3 Avaliação da oxidação lipídica

O óleo de linhaça é um produto rico em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente $\omega 3$ (ácido alfa-linolênico) (TRUCOM, 2006) o que o torna susceptível a deterioração (MCCLEMENTS; DECKER, 2010), mesmo estando encapsulado na emulsão. O processo de oxidação lipídica reduz a qualidade sensorial do produto e, conseqüentemente, sua aceitação, devido ao desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis e, também levam à formação de compostos tóxicos, afetando a segurança do alimento (ARAÚJO, 2011; RAMALHO; JORGE, 2006). Além disso, levam a perda do valor nutricional, devido à degradação de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (RAMALHO; JORGE, 2006).

Neste contexto, a oxidação lipídica foi monitorada medindo-se a formação dos produtos primários da oxidação, nas emulsões com e sem vitamina D₃, durante o período de armazenamento de 30 dias.

Verificou-se que no período de 30 dias de estocagem, sob refrigeração, não houve oxidação lipídica, tanto da emulsão sem vitamina D₃, quanto da emulsão com o bioativo encapsulado. Também foi verificado que não houve alteração de odor e cor da amostra durante este período.

Diversos fatores influenciam a oxidação lipídica na emulsão, como por exemplo: o pH da emulsão, tipo de emulsificante, estrutura química dos lipídeos, concentração de oxigênio, tipo e concentração de antioxidantes, e interações com os componentes da fase aquosa (ARAÚJO, 2011). No caso deste trabalho, foi utilizada uma temperatura baixa no processo de emulsificação, também foram utilizados dois

polissacarídeos, inulina e goma arábica, um atuando no aumento da viscosidade da fase aquosa (inulina), diminuindo a difusão das espécies reativas e, o outro (goma arábica), que influenciou na espessura da interface. Além disso, o óleo de linhaça utilizado foi o comercial. Nas especificações (ANEXO A) de seu fabricante, pode-se perceber a presença de vitamina E. O tocoferol é, dentre os compostos naturais, o que tem mais capacidade de agir como antioxidante (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Estes fatores explicam a ausência da oxidação lipídica na emulsão, mesmo não se utilizando nenhum antioxidante na sua formulação.

5.3.4 Avaliação do potencial zeta

Há dois mecanismos que ocorrem no processo de estabilização da emulsão usando biopolímeros: por repulsão estérica e eletrostática, que podem ocorrer de forma simultânea, sendo denominado de repulsão eletrostérica (BOUYER et al, 2012). A estabilização eletrostática é mensurada pelo potencial zeta (HUNTER; 1981).

A figura 24 apresenta os valores de potencial zeta obtidos para as emulsões sem e com vitamina D₃, ao longo do tempo de estocagem.

Figura 24 – Potencial zeta das emulsões sem vitamina e com vitamina D₃ encapsulada, ao longo do tempo de armazenagem. Médias seguidas com a mesma letra maiúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para a mesma amostra ao longo do período de estocagem. Médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para amostras diferentes no mesmo dia de avaliação.

Fonte: Própria autoria.

Os valores encontrados para o potencial zeta no primeiro dia foram altos, porém com altos desvio-padrão e a ED apresentou maior potencial zeta que a EB. Ao longo do tempo o potencial zeta diminui para as duas emulsões e o desvio-padrão também diminui e, no último dia de análise, estes valores se comportaram de maneira mais estável e as duas emulsões apresentaram valores próximos.

A emulsão é constituída de uma mistura de goma arábica e inulina. Sabe-se que somente a goma arábica possui atividade superficial. Silva et al. (2015a) encontrou em seu estudo um potencial zeta de -23,2 mV para suspensão de goma arábica em pH 5. Toniazzi (2013) sugere que dispersões coloidais com valores de zeta menor que - 30 mV e maior que + 30 mV, se repelem mais fortemente, sendo mais estáveis ao longo do tempo. Pelos valores encontrados neste trabalho, pode-se supor que a goma arábica confere estabilidade eletrostática à emulsão.

Jayme, Dunstan e Gee (1999) concluem em seu estudo que a goma arábica confere estabilidade a emulsão pelo mecanismo eletrostático, porém que a contribuição estérica é dominante. Este fato ocorre devido os polissacarídeos serem moléculas grandes que formam camadas espessas depois de adsorverem na gotícula de óleo, fazendo com que a repulsão estérica seja, provavelmente, o mecanismo dominante da estabilização da emulsão (McCLEMENTS, 2005; SILVA et al., 2015a).

Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que a emulsão estável foi a qual o método de preparação da suspensão de inulina gelificou. A alta viscosidade da suspensão de inulina possivelmente restringiu o movimento das gotículas de óleo, proporcionando maior resistência à separação de fases. Por sua vez, a goma arábica, por ser constituída de um “esqueleto” de polipeptídeo hidrofóbico unido covalentemente a numerosas cadeias de polissacarídeos aniônicos hidrofílicos, pode ter feito com que a parte hidrofóbica ancorasse na superfície das gotículas de óleo, enquanto a parte hidrofílica proporciona a estabilização por repulsão estérica e eletrostática paralelamente (McCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017). Tanto emulsificantes quanto espessantes são possíveis estabilizantes de emulsões (McCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017). Neste caso, supõe-se então que a inulina se comportou como um espessante, enquanto a goma arábica funcionou como um emulsificante. É interessante usar uma mistura de inulina e goma arábica, pois se diminui a quantidade de goma arábica necessária para estabilizar a emulsão, fato importante devido à disponibilidade, qualidade e custo desta matéria-prima (FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2014; WILLIAMS; PHILLIPS, 2009). Além disso,

utilizar uma concentração elevada deste emulsificante natural pode levar à floculação por depleção, quando a quantidade de biopolímero não adsorvido nas gotículas de óleo excede uma concentração crítica (CHANAMAI; McCLEMENTS, 2001). A floculação por depleção ocorre devido ao aumento das forças atrativas entre as gotículas que ocorre como consequência do efeito osmótico associado à exclusão de partículas coloidais de uma região estreita (denominada de zona de depleção) que envolve as gotículas (McCLEMENTS, 2005).

5.4 Determinação das condições de produção do gel de pectina

A Figura 25 mostra as etapas da escolha das variáveis de produção do gel de pectina. Todas as etapas estão descritas posteriormente.

Figura 25 - Fluxograma de ação de resultados para a determinação das condições experimentais de produção dos géis de pectina carregados

Fonte: Própria autoria.

Primeiramente foi testada a produção dos géis em pH 3,5, na temperatura de 95 °C, com concentração de pectina de 3 g/100 g de solução, variando-se o tipo de pectina testada (HM, LM e LMa). Os resultados obtidos, em termos de aspecto visual das estruturas, estão mostrados na Figura 26.

Figura 26 – Aspecto visual dos géis de pectinas, produzidos em pH 3,5, a 95 °C, concentração de pectina 3 g/100 g, sacarose 30 g/100 g e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g. Pectinas: (a) HM; (b) LM; (c) LMa.

Fonte: Própria autoria.

A pectina HM não formou gel nestas condições de processo, provavelmente devido à quantidade de sacarose utilizada (30 g/100 g de gel), sendo necessária maiores concentrações para formação de gel com este polissacarídeo (55-75 %) (KASTNER et al., 2014). A alta concentração de sacarose reduz a atividade de água, assim, promovendo as interações cadeia-cadeia em vez das interações cadeia-solvente (THIBAUT; RALET, 2003). Esse fato ocorre para a pectina HM, pois suas cadeias são estabilizadas por ligações de hidrogênio intermoleculares e principalmente por ligações hidrofóbicas entre ésteres de metila (WALKINSHAW; ARNOTT, 1981). Supõe-se que as zonas de junção neste tipo de interação hidrofóbica entre os grupos ésteres de metila são estabilizadas pela sacarose (OAKENFULL; SCOTT, 1984).

As pectinas LM e LMa formaram géis firmes, e por isso continuaram a ser consideradas em outras condições de produção de géis. A concentração de pectina foi mantida e o pH também, mas a temperatura foi diminuída até o ponto em que não ocorresse gelificação. O intuito de diminuir a temperatura de produção do gel foi devido à sensibilidade da vitamina D₃ a temperaturas mais altas, sabendo-se que tal nutriente será incorporado posteriormente, encapsulado nas emulsões. Assim, foram testadas as temperaturas de 80, 70 e 60 °C para gelificação das pectinas LMa e LM e os resultados obtidos para os géis estão mostrados na Figura 27.

Figura 27 – Aspecto visual dos géis de pectinas, em pH 3,5, concentrações de pectina 3 g/100 g, sacarose 30 g/100 g e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, com diferentes tipos de pectina (LM e LMa) e temperaturas de 60 a 80 °C

Fonte: Própria autoria.

A dispersão de pectina LM na temperatura de 60 °C não formou um gel sustentável. Os géis de pectina LM são estabilizados por ligações iônicas cruzadas através de ligações de cálcio entre dois carboxilatos de duas cadeias diferentes (AXELOS; THIBAUT, 1991). Em temperaturas mais altas estas zonas de junção, apoiadas por interações hidrofóbicas, são predominantes, promovendo o processo de estruturação (CHAN et al., 2017). Assim, supõe-se que em temperaturas mais baixas tais zonas de junções modelo “caixa de ovo” que se formam são menores, resultando em um gel fraco, ou não-sustentável, e, devido também, a concentração de 0,1 % (g/g) de cloreto de cálcio utilizada ser baixa.

Assim, os testes de produção de géis seguiram somente com a pectina LMa. Para continuação dos testes e, para conseguir chegar a mesma temperatura em que é preparada a emulsão, foi utilizada uma maior concentração de pectina LMa. Então, testou-se as temperaturas de 50, 40 e 30 °C, adicionando-se 3 ou 4 g de pectina LMa/100 g de solução e os resultados visuais dos géis estão mostrados na Figura 28.

Figura 28 - Aspecto visual dos géis de pectina LMa, em pH 3,5, concentrações de sacarose 30 g/100 g e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, em concentrações de pectina 3 e 4%, em temperaturas entre 30 e 50 °C

Fonte: Própria autoria.

A dispersão de pectina LMa com concentração de 3 g/100 g de solução, a 30 °C foi a única que formou um gel não-sustentável. Os géis mais firmes, do ponto de vista visual, foram os produzidos com aquecimento a 50 °C. Portanto, estes foram os escolhidos para testar a substituição da água da matriz do gel pelas emulsões de óleo de linhaça. Os resultados podem ser vistos na Figura 29.

Figura 29 - Aspecto visual dos géis de pectina LMa carregados com: (a) emulsões; (b) emulsões produzidas em tampão (pH 3,5), com substituição de 20, 30 e 40 % da água da matriz do gel por emulsão. Condições do processo: pH 3,5, concentração de sacarose 30 g/100 g e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, a temperatura de 50 °C e com concentração de pectina 4 g/100 g

Fonte: Própria autoria.

Os géis carregados de emulsão se mostraram, aparentemente, mais firmes que os géis não-carregados. Uma possível explicação é que a goma arábica, usada na emulsão, possui grupos ionizáveis que podem contribuir com cargas elétricas para a superfície das gotículas (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017). Os polissacarídeos também tendem a estabilizar as gotas de emulsão pelo mecanismo de repulsão estérica. Devido a este fato, as gotículas revestidas com a goma arábica tendem a ser muito menos afetadas pelas mudanças de temperaturas (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017; OZTURK et al., 2015), fato importante para a fase de formação do gel carregado de emulsão.

Comparando-se os géis substituídos com emulsão produzida em água deionizada com os géis substituídos com emulsão produzida em tampão, percebe-se que não houve diferença na firmeza (aparente) do gel. Entretanto, como se pretende obter um produto semelhante a uma bala cítrica, o produto foi provado e o sabor do gel carregado que foi preparado com emulsão produzida em tampão era mais agradável por ser cítrico.

Foi possível substituir até 40 % da fase aquosa usada na produção dos géis pela emulsão. Também foram testadas substituições da ordem de 60, 80 e 100 %, mas não resultaram na formação de géis. Para se conseguir estas porcentagens de substituições mais altas foi necessário preparar uma dispersão-estoque de pectina utilizando a emulsão, porque parte da água do gel é usada nesta dispersão-estoque. Entretanto, a dispersão-estoque de pectina ao ser produzida com emulsão “coagulou”. Nesse caso, esse fenômeno pode ter advindo de uma interação entre a pectina LMa e os polissacarídeos da emulsão, ou ter sido um efeito do óleo, por haver menos água no sistema para formar o gel. Supõe-se, portanto, que tais interações não permitiram a formação de um gel sustentável.

Em seguida, foram testados géis em pH 4,0, porque posteriormente será incorporada a vitamina B₁₂ em sua formulação e, sabe-se que esta vitamina é mais estável em meios a pH 4,0. Estes géis foram testados somente com pectina LMa (escolhida pelos testes em pH 3,5), a temperaturas de 60, 50 e 40 °C, variando-se a concentração de pectina (4; 3,5 e 3 g/100 g). Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 30.

Figura 30 – Aspecto visual dos géis de pectina LMa, em pH 4, concentração de sacarose 30 g/100 g e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, em diferentes temperaturas e diferentes concentrações de pectina

Fonte: Própria autoria.

Os géis com concentração de 3 g de pectina LMa/100 g de dispersão se mostraram estruturados, mas aparentemente não tão firmes quantos os outros, e por isso foram excluídos dos testes seguintes. Comparando-se com os géis de pectina em pH 3,5, os géis em pH 4,0 são menos firmes, mas ainda assim com uma estrutura aceitável para uma possível bala de goma. Foram realizados ensaios reológicos com varredura de temperatura (dados mostrados na seção 5.5.3) no gel com concentração de pectina de 4 g/100 g, com temperatura de gelificação de 60 °C, pois foi o gel escolhido para se prosseguir as análises de caracterização. A temperatura de gelificação encontrada nesta análise de varredura corrobora com as análises visuais da Figura 30, ou seja, que realmente houve formação de gel até a temperatura de 40 °C.

Dessa forma, continuou-se testando as formulações com concentração de pectina de 4 e 3,5 %, substituindo-se 20 e 60 % de água da matriz do gel por emulsão, em pH 4,0, e os resultados estão apresentados na Figura 31.

Figura 31 – Aspecto visual dos géis de pectina LMa carregados com emulsão em tampão (pH 4), com substituição de 20 e 60 % da água da matriz do gel por emulsão. Condições do processo: pH 4, concentração de sacarose 30 g/100 g e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, variando a temperatura e a concentração de pectina

Fonte: Própria autoria.

Todas as formulações testadas a 60 °C formaram géis firmes. Entretanto, a 40 e 50 °C não se formaram géis sustentáveis quando se substituiu 60 % da fase aquosa pela emulsão. Em pH 4, diferentemente do pH 3,5, houve possibilidade de produzir uma dispersão-estoque de pectina LMa mais concentrada, devido a menor viscosidade da dispersão neste pH. Assim, foi possível a substituição por até 60 % de emulsão para produção dos géis carregados.

Devido aos resultados alcançados, para a continuação das análises de caracterização do gel, foi escolhida a concentração de 4 g de pectina LMa/100 g de dispersão, a temperatura de 60 °C, devido se ter obtido uma substituição de 60 % de água da matriz do gel por emulsão, ambos preparados em tampão com pH 4,0.

5.5 Caracterização dos géis não-carregados e carregados sem incorporação das vitaminas

Os géis escolhidos para serem caracterizados foram os formulados em tampão citrato em pH 4,0, com concentração de pectina LMa de 4 g/100g, de sacarose de 30 g/100g e de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de 0,1 g/100 g, gelificados a temperatura de 60 °C. Quatro formulações foram analisadas, de acordo com a substituição de água por emulsão: 0 (denominados neste trabalho como géis não-carregados), 20, 40 e 60 %, representadas pelos códigos GNC, GC20, GC40, GC60, respectivamente. Os aspectos visuais destes quatro géis são mostrados na Figura 32.

Figura 32 – Aspecto visual das amostras: (a) gel não-carregado; gel carregado com: (b) 20 %; (c) 40 %; (d) 60 %

Fonte: Própria autoria.

5.5.1 Microestrutura dos géis

As imagens de microscopia confocal foram utilizadas para observar a microestrutura dos géis GNC, GC20, GC40, GC60 e, estão apresentadas na Figura 33 e na Figura 34, respectivamente.

Figura 33 - Imagem de microscopia confocal (ampliação de 40x) do gel não-carregado. A pectina LMa foi corada com FITC (verde) e excitado em 488 nm

Fonte: Própria autoria.

Figura 34 – Imagens de microscopia confocal (ampliação 40x) dos géis carregados com (a) 20; (b) 40; e (c) 60 % de emulsão.

Imagens: (i) A fase oleosa – óleo de linhaça – foi corada com vermelho do Nilo (vermelho) e excitado em 543 nm;
 (ii) os polissacarídeos – goma arábica, inulina e pectina LMa – foram corados com FITC (verde) e excitados em 488 nm;
 (iii) é a combinação das imagens (i) e (ii)

Fonte: Própria autoria.

O gel não-carregado tinha somente como polissacarídeo a pectina LMa. A imagem da Figura 33 mostra, em verde, a pectina LMa homogeneamente distribuída e, ao se ampliar um pedaço desta imagem, pode-se visualizar em preto a água aprisionada na rede tridimensional do gel de pectina.

As imagens dos géis carregados mostraram, também, uma rede de gel homogênea. Na Figura 34 a imagem (i) mostra apenas as gotas de óleo, em vermelho, distribuídas no sistema. Nota-se com o aumento da concentração de óleo nos sistemas as gotas aumentam de tamanho e se aglomeram. Este fato pode estar relacionado a dois fatores: primeiro a metodologia utilizada para corar os polissacarídeos requer que seja preparada uma solução de corante FITC em DMSO e, sabe-se que este reagente é comumente utilizado para quebrar emulsões para fazer quantificações, como, por exemplo, a de curcumina (ANDRADE, 2017); e o segundo fator que pode ter ocorrido é que com o aumento de emulsão no sistema, ao formar o gel, as gotas de óleo que estavam uniformemente distribuídas na emulsão, ficam aprisionadas na rede tridimensional, o que provoca aglomeração de algumas gotas, fato que levou a diminuição da força do gel GC60 (seção 5.5.4).

As imagens (ii) da Figura 34 mostram somente os polissacarídeos corados em verde. Os géis carregados possuem três polissacarídeos em sua composição a pectina LMa, a qual foi gelificada, a inulina e a goma arábica, presentes na emulsão, por esse motivo, não foi possível diferenciá-los na imagem de confocal. As imagens mostram uma rede de gel homogênea para os géis carregados. As gotas de óleo também aparecem na imagem (ii) coradas em verde, assim, pode-se dizer que envolta de toda gotícula de óleo há presença de polissacarídeos que estabilizam a emulsão, como já discutido anteriormente. Não se pode afirmar que apenas a goma arábica está envolta da gota de óleo, ou se é a mistura de inulina e goma arábica que estão juntas recobrando a gota.

Por fim as imagens (iii) da Figura 34 mostram a combinação das imagens (i) e (ii). Para melhor visualização das gotas de óleo, uma parte da imagem do gel GC40 (Figura 34 b.iii) foi ampliada e está apresentada na Figura 35. Nesta imagem, a gota de óleo se apresenta em amarelo (mistura das cores verde e vermelho), visto que ela está recoberta com os polissacarídeos. Observa-se, também que em torno da gota de óleo há uma camada mais espessa em verde (indicadas pelas setas vermelhas), indicando polissacarídeos aglomerados neste local, provavelmente a goma arábica ou a mistura goma arábica e inulina usadas para estabilizar a emulsão. Esta imagem

corroborar com a explicação do mecanismo de estabilização da emulsão por repulsão estérica (seção 5.3.4).

Figura 35 – Imagem da gota do gel GC40 ampliada, retirada da microscopia confocal

Fonte: Própria autoria.

A metodologia utilizada para corar o gel foi somente preparar a solução de FITC em DMSO e misturar no processo de formação do gel. Nenhum dos polissacarídeos foram marcados separadamente antes da produção do gel, fato que impossibilitou a visualização de como cada polissacarídeo está distribuído na rede do gel. Vários estudos utilizam a técnica de marcar o polissacarídeo (*covalent labelling*) com um corante específico, antes de realizar o processo de gelificação (ABHYANKAR; MULVIHILL; AUTY, 2011; AGODA-TANDJAWA et al., 2012; HOU et al., 2015; TROMP et al., 2001). Arltoft, Madsen e Ipsen (2008) analisaram, por microscopia ótica confocal, um sistema com mais de um polissacarídeo, para isso marcou-se os dois polissacarídeos com dois corantes distintos, emitindo-os em faixas de comprimento de onda distintos. A pectina foi corada com conjugado anticorpo JIM5-Alexa Fluor 647 e a carragena foi corada com anticorpo anti-carragena conjugado com Alexa Fluor 488. Dai et al. (2018) utilizou azul do Nilo para corar a emulsão que possui goma arábica em sua composição. Agoda-Tandjawa et al. (2012) marcou a pectina LM de seu sistema com fluoresceinamina.

Assim, devido essa peculiaridade dos polissacarídeos que necessitam serem marcados por técnicas específicas antes de serem utilizados no processo de gelificação ou emulsificação e, também devido este sistema de gel carregado utilizar vários polissacarídeos em sua composição, não foi possível concluir como cada polissacarídeo se distribuiu no gel carregado.

5.5.2 Caracterização reológica dos géis

As propriedades reológicas dos géis carregados foram avaliadas para se compreender melhor a interação entre as gotículas de óleo e a matriz do gel e, portanto, a possível influência da concentração de emulsão na estrutura do gel de pectina.

No caso das análises reológicas, é importante salientar que as amostras foram gelificadas no próprio reômetro. Para isso, o reômetro foi aquecido antes das suspensões serem acomodadas nele e foi esperado um tempo de 20 min para que ela gelificasse, contabilizado no próprio equipamento, para que depois ele iniciasse as varreduras de tensão e frequência. O aspecto visual do gel, após decorrida análise, está apresentada na Figura 36 comprovando sua gelificação e sua homogeneidade após acomodação da geometria na amostra.

Figura 36 – Aspecto visual do gel, após decorrida as análises reológicas

Fonte: Própria autoria.

A primeira caracterização realizada nos géis foram os ensaios de varredura de deformação, para poder definir a RVL, realizada a 25 °C, e as curvas de cada amostra estão apresentadas na Figura 37. Esta análise foi realizada em duplicata.

Figura 37 – Rampas de tensão dos géis não-carregados (GNC) e dos géis carregados em 20 % (GC20), 40 % (GC40) e 60 % (GC60) de emulsão, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento

Fonte: Própria autoria.

A partir das rampas de tensão obtidas, foi possível escolher uma tensão pertencente à RVL, comum a todas as amostras, a qual foi de 8 Pa, para ser posteriormente aplicada na varredura de frequência. Os módulos de armazenamento e de perda em função da frequência angular das quatro amostras foram analisados e os resultados podem ser vistos na Figura 38.

Figura 38 - Curvas de varredura de frequência dos géis não-carregados (GNC) e dos géis carregados com 20 % (GC20), 40 % (GC40) e 60 % (GC60) de emulsão, a 25 °C. G' é o módulo de armazenamento (símbolos fechados) e G'' é o módulo de perda (símbolos abertos)

Fonte: Própria autoria.

Estas análises foram realizadas em triplicata, mas apenas uma curva de cada amostra foi plotada devido à reprodutibilidade dos resultados. As triplicatas de cada amostra estão apresentadas no APÊNDICE A. A varredura de frequência confirmou o comportamento de gel das amostras ($G' > G''$). Pode-se averiguar que o gel não-carregado possui o módulo elástico (G') menor que os géis carregados, indicando uma estrutura de rede polimérica tridimensional mais fraca que os géis carregados. Dentre os géis carregados, o que possuiu uma rede mais forte (maior G') foi o com substituição de 40 % de emulsão. Estas averiguações também foram feitas através de uma compressão “manual”, nos testes iniciais, ao se escolher tal formulação, e foi perceptível até mesmo pelo tato a diferença entre o gel não-carregado e carregado e, também entre o gel carregado com 40 % e 60 %.

Segundo Sala et al. (2007) se há interação entre as partículas lipídicas e a matriz do gel, as partículas são denominadas de ativas (aumentam ou diminuem o módulo elástico) e, se não há interação, elas são inativas (diminuem o módulo elástico). Neste contexto, pode-se dizer que devido ao aumento da força dos géis as gotículas de óleo se mostraram ativas. Entretanto, quando houve substituição de 60 % de emulsão o gel enfraqueceu em relação ao gel GC40.

A maior força do gel carregado em comparação com o gel não-carregado indica um efeito de reforço que a gotícula de óleo confere ao material. Entretanto, o aumento da fração volumétrica de óleo no sistema pode resultar no efeito de *crowding*, ou seja, as gotículas de óleo começam se aglomerar, atrapalhando a formação do gel. Supõe-se também que o aumento de partículas no sistema pode ter um efeito de separação de fases (não observada nas imagens de confocal, devido não se ter corado os polissacarídeos separadamente) que fez com que o gel enfraquecesse. Esta separação de fases pode ser proveniente de dois componentes do sistema: da maior fração volumétrica de óleo; ou da maior quantidade de inulina no sistema que pode ter se aglomerado, visto que este polissacarídeo também forma gel.

5.5.3 Avaliação da temperatura de gelificação

As curvas de varredura de temperatura obtidas para os géis de pectina LMa não-carregados estão apresentadas na Figura 39. Através destas curvas pode-se averiguar o ponto em que G' e G'' se cruzam. Este ponto de cruzamento indica a temperatura de gelificação do gel de pectina que foi de aproximadamente $37,2 \pm 1,2$ °C. Este fato corrobora com os testes iniciais de gelificação, os quais mostraram que

em temperaturas maiores que 40 °C foi possível formar um gel sustentável, visto que a temperatura de gelificação da pectina LMa, nas condições testadas, foi por volta de 37 °C.

Figura 39 - Comportamento de G' e G'' no resfriamento de 60 a 20 °C, da dispersão de pectina LMa 4 g/100 g, sacarose 30 g/100 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/100 g, pH 4. À rampa de resfriamento foram aplicadas tensão de 8 Pa e frequência de 1 Hz, constantes

Fonte: Própria autoria.

Não foi possível analisar os géis carregados, pois ao serem retirados do banho-maria a 60 °C, eles gelificam rapidamente, sendo que, ao ser colocado no reômetro, mesmo com a geometria aquecida, formava-se uma camada gelificada na parte da amostra em contato com o ar e, ao iniciar a varredura, G' já era maior que G'' . Entretanto, foi possível obter pelo menos uma curva do gel carregado com 20 % de emulsão, obtendo uma temperatura de gelificação de aproximadamente 47 °C (Figura 40). Assim, foi possível comprovar que os géis carregados possuem uma temperatura de gelificação maior que os géis não-carregados, como já verificado visualmente (Figura 31) nos testes iniciais de produção do gel. A formação deste tipo de gel ocorre no processo de resfriamento, então, quanto maior é a temperatura de gelificação, menos energia foi necessária para o gel se formar. A emulsão pode ter contribuído com a estruturação do gel. Esse fato pode ter ocorrido devido a presença de inulina na emulsão e, sabe-se que este polissacarídeo possui propriedades gelificantes, que

pode ter contribuído para a gelificação mais rápida dos géis carregados em relação ao gel não-carregado.

Figura 40 - Comportamento de G' e G'' no resfriamento de 60 a 20 °C, do gel não-carregado (GNC) e do gel carregado (GC20). À rampa de resfriamento foram aplicadas tensão de 8 Pa e frequência de 1 Hz, constantes

Fonte: Própria autoria.

5.5.4 Caracterização mecânica dos géis

Além dos testes reológicos de pequena deformação, os testes de grande deformação são também importantes para a caracterização mecânica do gel. Os ensaios de compressão uniaxial permitem a caracterização dos géis não-carregados e dos géis carregados quanto a sua homogeneidade, elasticidade e sensibilidade a ruptura. Além disso, permitem a avaliação dos efeitos da incorporação das emulsões em diferentes proporções, nas propriedades de grande deformação. A Figura 41 mostra o gel não-carregado e o gel carregado com 40 % de emulsão sendo comprimidos.

Figura 41 – (a) Gel de pectina LMa não-carregado (GNC); (b) Gel de pectina LMa carregado (GC40) durante o ensaio de compressão uniaxial

Fonte: Própria autoria.

Os resultados dos testes de compressão uniaxial para as formulações de géis não-carregados (GNC) e carregados de emulsão (GC20, GC40, GC60) estão apresentados na Figura 42.

Figura 42 – Resultados dos ensaios de compressão uniaxial: (a) deformação de ruptura; (b) tensão de ruptura; (c) módulo de elasticidade de géis não-carregados (GNC) e géis carregados com 20 (GC20), 40 (GC40) e 60 % (GC60) de emulsão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula são estatisticamente iguais ($p < 0,05$). (a) (b) (c)

Fonte: Própria autoria.

Os dados mostraram que o a amostra GC40 apresentou maior módulo de elasticidade (E), maior tensão de ruptura (σ_{rup}) e maior deformação de ruptura (ε_{rup}), quando comparado com o GNC. As amostras GC20 e GC60 apresentaram maior E e σ_{rup} , mas não apresentaram diferença significativa no valor de ε_{rup} , em relação ao GNC.

Diversos estudos também classificam as partículas como ativas ou inativas pelos dados de compressão uniaxial. A redução de E e de σ_{rup} e uma aumento ou diminuição de ε_{rup} no gel carregado em comparação ao gel não-carregado são efeitos de partículas inativas, enquanto que o aumento de σ_{rup} , a redução de ε_{rup} e o aumento ou diminuição de E no gel carregado em relação ao gel não-carregado são características da incorporação de partículas ativas (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015).

Os resultados encontrados não se encaixaram no padrão discutido anteriormente. O gel GC40 teve aumento dos valores de todos os parâmetros analisados, comparado com o gel GNC. Os aumentos de E e de σ_{rup} são associados à adição de partículas ativas, como ocorreu para todos os géis carregados. Entretanto, espera-se uma diminuição da ε_{rup} , que teve um leve aumento para o gel GC40 e que permaneceu estatisticamente inalterado para os géis GC20 e GC60.

O efeito de diminuição da ε_{rup} depende de diversos fatores relacionados à agregação e distribuição das gotas no gel. O processo de ruptura em um gel inicia-se em regiões mais fracas da rede, que podem ser advindas de estruturas heterogêneas ou de gotículas da emulsão dentro do gel, que atuam como núcleos que concentram a tensão e podem aumentar a fricção entre os componentes do sistema (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015). Nas imagens de confocal (Figura 34) é possível notar que as partículas de óleo a amostra GC20 estão uniformemente distribuídas na rede de gel e conforme aumenta-se a quantidade de emulsão e, consequentemente óleo, no sistema, as partículas começam a se agregar. Este fato pode estar relacionado com a temperatura de aquecimento do gel, que é de 60 °C, superior a utilizada na metodologia utilizada para o preparo da emulsão, fato que pode provocar a agregação das gotículas de óleo.

Outro aspecto importante verificado é o comportamento somente entre os géis carregados. A adição de partículas no gel aumentou o valor de σ_{rup} até 40 % de

substituição (GC40) e depois este parâmetro diminui no GC60, assim como ocorreu com ε_{rup} e E sofreu uma leve redução (sem diferença estatística).

Tendo em vista todos estes fatores e, levando em consideração os resultados das análises de confocal e de reologia, pode-se sugerir que as gotículas de óleo de linhaça agiram como partículas ativas nos géis carregados. Entretanto nas amostras GC20 e GC40 as gotículas de óleo não atuaram como pontos de concentração de tensão, enquanto que na amostra GC60 as partículas atuaram como pontos de fratura, devido a distribuição heterogênea, agregação das partículas, forma e tamanho da gota, aspectos estes que afetam as propriedades de textura dos géis.

Através dos resultados obtidos observa-se uma concentração ótima de 40 % de emulsão que foi acrescida no gel (GC40), tornando-o mais firme e adequado para aplicações em que esta estrutura seja requerida, como por exemplo, uma “bala de goma”. Sendo assim, esta foi a formulação escolhida para ser adicionada as vitaminas e aplicados os testes de estabilidade físico-química.

5.6 Incorporação das vitaminas D₃ e B₁₂ nos géis de pectina – avaliação físico-química

5.6.1 Aspecto visual

Após ser escolhida a formulação de gel carregado mais adequada para o gel contendo as vitaminas, as mesmas foram adicionadas, totalizando 6 tratamentos (conforme listados na Tabela 4). As denominações destas formulações neste trabalho são: GNC (T1), GNCB (T2), GC40D (T3), GC40B (T4), GC40D (T5), GC40BD (T6) e, o aspecto visual destes géis está apresentado na Figura 43.

Figura 43 - Aspecto visual dos géis preparados para análise de estabilidade. Tratamento: (a) GNC; (b) GNCB; (c) GC40; (d) GC40B; (e) GC40D; (f) GC40BD

Fonte: Própria autoria.

A pectina produz géis transparentes com coloração creme (GNC Figura 43 a). A vitamina B₁₂ possui uma coloração vermelha, por isso conferiu aos géis que continham ela em sua composição esta cor vermelho/rosa (GNCB, GC40B e GC40BD, Figura 43 b, d e e, respectivamente). A vitamina D₃ não possui cor e a emulsão possui uma cor creme leitosa, conferindo ao gel carregado a coloração creme (GC40 e GC40D, Figura 43 c e e).

5.6.2 Atividade de água e umidade

Durante o armazenamento os géis foram estocados dentro de sacos plásticos (Wyda zip, 18 x 23 cm) (Figura 44), para evitar a perda de umidade para o ambiente,

fato que ocorreu visivelmente durante alguns testes, devido à diminuição da massa do gel, por perder água para o ambiente. Entretanto, ao acondicioná-los dentro destes sacos, os géis apresentaram exsudado. Foi necessário acondicionar os géis sob refrigeração devido a sua alta atividade de água e ao ambiente externo não controlado que, no verão, estava quente e úmido, para não haver crescimento microbiano. Assim, para a análise de estabilidade, foram avaliados os parâmetros de umidade (Tabela 10) e atividade de água (Tabela 11) ao longo do tempo de armazenamento, sob refrigeração.

Figura 44 – Aspecto visual das embalagens em que foram armazenados os géis

Fonte: Própria autoria.

Tabela 10 – Valores de umidade (%) para cada tratamento ao longo do período de armazenamento

Amostra	Tempo de armazenagem (dias)				Sign.
	0	10	20	30	
GNC	56,5	53,6	57,1	49,1	-
GC40	52,0	40,6	46,8	43,3	-
GC40D	44,5 ± 2,5 ^{ab}	45,8 ± 1,8 ^b	45,6 ± 3,8 ^b	41,1 ± 3,8 ^b	n.s.
GC40B	41,7 ± 7,4 ^{ab}	45,1 ± 2,5 ^b	42,1 ± 3,0 ^b	38,3 ± 2,9 ^b	n.s.
GC40BD	38,8 ± 5,5 ^b	42,8 ± 3,5 ^b	42,7 ± 3,6 ^b	36,0 ± 4,0 ^b	n.s.
GNCB	54,2 ± 2,4 ^a	55,4 ± 0,7 ^a	56,2 ± 0,9 ^a	53,2 ± 1,0 ^a	n.s.
Sign.	*	*	*	*	

^{a-b} – médias seguidas com a mesma letra minúscula na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

Sign. = Significância: * significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$), n.s.: não significativo, Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 – Valores de atividade de água para cada tratamento ao longo do período de armazenamento

Amostra	Tempo de armazenagem (dias)				Sign.
	0	10	20	30	
GNC	0,975	0,970	0,977	0,976	-
GC40	0,956	0,968	0,974	0,966	-
GC40D	0,963±0,003 ^{Bab}	0,971±0,002 ^A	0,975±0,002 ^A	0,973±0,001 ^{Aab}	*
GC40B	0,957±0,006 ^{Bb}	0,9707±0,0006 ^A	0,973±0,003 ^A	0,968±0,005 ^{ABb}	*
GC40BD	0,962±0,003 ^{Bb}	0,971±0,002 ^A	0,972±0,002 ^A	0,969±0,002 ^{Aab}	*
GNCB	0,972±0,002 ^a	0,972±0,002	0,977±0,002	0,977±0,003 ^a	n.s.
Sign.	*	n.s.	n.s.	*	

^{a-b} – médias seguidas com a mesma letra minúscula na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

^{A-B} – médias seguidas com a mesma letra maiúscula na mesma linha não se diferenciam ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Tukey.

Sign. = Significância: * significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$), n.s.: não significativo, Fonte: Própria autoria

Os géis, durante o período de armazenamento, não apresentaram diferença significativa nos valores de umidade. Entretanto, entre eles, os géis não-carregados contendo somente vitamina B₁₂ (GNCB) apresentaram maior valor de umidade em comparação com os géis carregados com vitaminas. Este fato é explicado, pois é o gel que tem menor quantidade de sólidos em sua composição.

A atividade de água de todos os géis foi alta, em torno de 0,97, e, apesar de estaticamente ter havido diferença nos valores, ao nível de 5% de significância, o desvio-padrão foi muito baixo, ao longo do tempo de armazenamento. Piccone, Rastelli e Pittia (2011) elaboraram sistemas modelos de balas baseados em metodologias usadas em produtos comerciais e utilizou pectina em um desses sistemas. Em seus resultados para a bala de pectina foram encontrados valores de atividade de água de 0,595, umidade de 19,47% e módulo de elasticidade de $7,6 \pm 0,3$ Pa. Estes valores são muito inferiores se comparados aos géis obtidos neste trabalho, devido principalmente a metodologia aplicada. Para se fazer a bala, após a gelificação o produto final deve passar por um processo de secagem, diminuindo assim os valores de atividade de água e umidade, para posteriormente serem embalados.

5.6.3 Estabilidade das vitaminas B₁₂ e D₃ ao longo do período de estocagem

A estabilidade das vitaminas B₁₂ e D₃ durante o período de armazenamento das amostras sob refrigeração está apresentada na Figura 45. Teoricamente, adicionou-se 5,5 mg de vitamina B₁₂ em 100 g de gel e 3,3 mg de vitamina D₃ em 100 g de gel.

A vitamina B₁₂ se mostrou estável durante todo o período avaliado, para as amostras GC40BD e GNCB, sem apresentar diferença significativa. Entretanto para a amostra GC40B houve diferença significativa entre o primeiro dia de análise e o último, com a concentração decaindo neste período. Porém ao se comparar o mesmo período para amostras diferentes, não há diferença significativa na quantificação da referida vitamina. Uma possível explicação para essa diferença é o fato de que a quantidade de vitamina é pequena (grandeza em mg) em relação a quantidade total de amostra, (grandeza em g) e a vitamina pode não ter ficado homoganeamente distribuída no meio. Importante ressaltar que foi utilizada a mesma amostra ao longo do período analisado e ela foi dividida igualmente nos quatro tempos analisados. Assim, apesar da análise apresentar valores minimamente superiores à quantidade teórica, provavelmente devido a quantidade volumétrica da solução estoque de B₁₂ adicionada, observa-se que esta diferença foi relativamente homogênea em todas as amostras, se somar a concentração total (5,8 a 6,0 mg/100 g de gel) quantificada em cada sistema durante todo período. A referida vitamina é estável em meios com pH 4,0 e o sistema em que ela estava inserida não continha nenhum agente que possibilitou sua degradação.

Figura 45 - Perfil temporal de: (a) concentração de vitamina B₁₂ nos géis não-carregados (GNCB) e carregados (GC40B e GC40BD); (b) concentração de vitamina D₃ nos géis carregados (GC40BD e GC40D). Valores teóricos adicionado: B₁₂ 5,5 mg/100 g; D₃ 3,3 mg/100 g. Médias seguidas com a mesma letra maiúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para a mesma amostra ao longo do período de estocagem. Médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, para amostras diferentes no mesmo dia de avaliação

Fonte: Própria autoria.

Os valores de vitamina D₃ encontrados foram inferiores ao teórico. Esta análise, apesar de ter um protocolo bem estabelecido, apresentou-se grandes desvios, provavelmente devido a quantidade e distribuição de vitamina presente no gel carregado. Como já foi dito anteriormente absorvidade molar (ϵ) da vitamina D₃ é de 18200 no comprimento de onda de 265 nm (NAPOLI; KOSZEWSKI; HORST, 1986). Segundo a lei de Beer ($A = \epsilon bc$) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002), a absorvidade molar é um coeficiente de proporcionalidade entre a absorbância e o produto bc , onde “ b ” é o caminho óptico da cubeta utilizada (0,1 cm) e “ c ” é a concentração (mol/L). Na concentração utilizada (3,3 mg de D₃/ 100 g de gel) a absorbância lida foi abaixo de 0,1, não sendo um resultado confiável, por isso seria necessário aumentar a quantidade de vitamina na emulsão para se conseguir quantificá-la no gel carregado. Entretanto, devido aos resultados obtidos na quantificação da D₃ na emulsão, a qual foi devidamente encapsulada não apresentando perdas ao longo do período estocado, pode-se supor que no gel carregado esta vitamina também não foi perdida.

Outro fato a ser observado é que a amostra GC40BD, a qual continha as duas vitaminas B₁₂ e D₃, apresentou maiores valores de concentração de D₃, este fato ocorreu devido ao espectro da vitamina B₁₂ também absorver em 264 nm (início da sua cauda) e não foi feita uma curva padrão com a vitamina B₁₂ adicionada junto ao branco.

5.6.4 Parâmetros colorimétricos instrumentais

O comportamento dos parâmetros colorimétricos permitiu avaliar a estabilidade da vitamina B₁₂ e D₃, ao longo do tempo de armazenamento, visto que a vitamina B₁₂ possui coloração vermelha (laudo – ANEXO A) e a D₃ é incolor quando solubilizada (laudo – ANEXO A), ambas podem sofrer alteração na coloração ao se degradar. Os parâmetros colorimétricos, obtidos ao longo de 30 dias de armazenamento, dos géis com vitaminas são mostrados na Figura 46.

Figura 46 – Avaliação colorimétrica dos parâmetros: (a) L; (b) a; (c) b; (d) Croma (C*ab); ângulo de hue (hab); e diferença total de cor (TCD), durante o período de estocagem dos géis com vitaminas. Médias seguidas com a mesma letra minúscula não se diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), para a mesma amostra ao longo do período de estocagem

Fonte: Própria autoria.

A luminosidade das amostras do gel GNCB, foi menor que a dos outros géis, devido ser um gel transparente, por não conter a emulsão, enquanto que os demais géis são opacos. O parâmetro a^* positivo, indica a cor vermelha, que foi maior no GNCB, devido a transparência do gel de pectina, que não diminuiu a coloração vermelha da vitamina B₁₂, enquanto que nos géis GC40B e GC40BD foram menores, pois a vitamina B₁₂ se mistura com a emulsão opaca, ficando com coloração vermelha menos intensa (rosada). O gel GC40D não possui coloração vermelha, por isso o parâmetro a^* foi quase nulo, enquanto que o parâmetro b^* positivo, que indica a cor amarela foi mais presente nesta amostra em relação as demais, mas não foi um valor elevado, pois a amostra tem uma coloração creme, advinda da emulsão. Todos estes parâmetros tiveram pouca, ou nenhuma, variação ao longo do tempo de estocagem.

Os valores de croma indicam o brilho da cor, assim, no caso do gel GNCB que é transparente ele é maior, enquanto que nos géis opacos e sem cor (GC40D) ele é menor. Os géis GNCB apresentaram altos desvios-padrão, devido sua transparência, mesmo se tomando o cuidado de realizar a análise com folhas sulfites brancas de fundo e no mesmo ambiente com a mesma iluminação.

Os géis GC40BD, que apresentam as duas vitaminas em sua composição, foram os únicos que apresentaram diferença significativa em todos os parâmetros ao longo do tempo de armazenamento, entretanto não houve um padrão de diminuição ou aumento dos valores ao longo do tempo de estocagem e, também, o desvio-padrão foi baixo.

Os valores de ângulo de Hue se mantiveram estáveis ao longo do tempo de estocagem. Para os géis GC40B, GC40BD e GNCB os valores de ângulo de Hue se mantiveram na faixa de 20°, correspondente a cor vermelha no diagrama CIELAB (Figura 47) e está associada a vitamina B₁₂. Já os géis GC40D estes valores foram em torno de 95°, que representa a cor amarelo e, está associada à emulsão, principalmente advinda da cor da goma arábica e do óleo, já que a inulina é branca.

Por fim, os valores de TCD ficaram na faixa de 3-8 e apresentaram alto desvio-padrão para todas as amostras. Os géis GC40B E GC40D apresentaram maior diferença de cor no dia 30, entretanto estatisticamente somente a amostra GC40B apresentou diferença do dia 10 em relação ao dia 30.

O comportamento relativamente estável dos parâmetros colorimétricos concorda com aqueles obtidos para a quantificação de vitamina B₁₂ (os quais também permaneceram estáveis ao longo do estudo de estabilidade. Além de poderem

contribuir para a hipótese de que a vitamina D₃ não ter se degradado ao longo do tempo nos géis carregados. Neste sentido, os parâmetros colorimétricos podem ser ferramentas úteis para indicar a perda ou não de bioativos encapsulados.

Figura 47 – Diagrama CIELAB com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de Hue

Fonte: ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R.M. Qualidade de fruto de aceroleira Cv Olivier em dois estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 541-545, 2011. Número especial.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste Mestrado, foi possível inferir que a produção de emulsões utilizando uma mistura de polissacarídeos naturais como estabilizantes se mostrou efetiva. O modo pelo qual os polissacarídeos são hidratados e misturados interferiu na estabilidade das emulsões. O método adotado produziu emulsões que permaneceram estáveis ao longo de 30 dias de estocagem. A variação do pH da fase aquosa, dentro dos limites testados, não influenciou na estabilidade das emulsões.

A emulsão de óleo de linhaça tem um composto que interfere na leitura da absorbância em 265 nm, presente na inulina e no óleo de linhaça, o que dificulta a quantificação da vitamina D₃. Entretanto, este bioativo foi devidamente encapsulado na emulsão e não apresentou perdas significativas ao longo do período de 30 dias sob armazenamento.

A pectina LMa foi capaz de produzir géis a temperaturas baixas em relação as outras pectinas (LM e HM), com uma concentração relativamente baixa de sacarose (30 %) e utilizando 0,1 % de CaCl₂.2H₂O, sem que estes precipitem. A concentração mínima de 4 % de pectina foi necessária para produzir géis firmes na temperatura de 60 °C.

A substituição de água pelas emulsões na hidratação dos géis de pectina foi conseguida até um limite crítico de 60 % para a temperatura de 60° C, e possibilitou a obtenção de géis carregados firmes. Os géis carregados de emulsão apresentaram uma rede polimérica mais forte do que os géis não-carregados, confirmando que as partículas se encontravam ativas nos géis carregados.

A partir do estudo de estabilidade da vitamina B₁₂ foi possível averiguar que não houve perda significativa ao longo do período de 30 dias de estocagem, também não houve mudanças significativas na cor, umidade e atividade de água das amostras.

Por fim, o desenvolvimento deste trabalho de Mestrado mostrou que é possível obter géis carregados de emulsão encapsulando de modo satisfatório bioativos lipofílicos (vitamina D₃) e hidrofílicos (vitamina B₁₂) utilizando-se apenas ingredientes de origem vegetal e naturais, com apelo ao público vegetariano e vegano e, ainda, com possíveis propriedades benéficas a saúde para serem incorporadas a produtos alimentícios.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação, os seguintes estudos são sugeridos para trabalhos futuros:

- Adequação da metodologia utilizada para microscopia confocal, para se obter maiores informações sobre a disposição dos polissacarídeos na rede de gel. Para tal, sugere-se marcar covalentemente a goma arábica com azul do Nilo, antes de ser utilizada no processo de emulsificação e, a pectina LMa com fluoresceinamina, antes do processo de gelificação;
- Realização de estudos de digestibilidade *in-vitro*, biodisponibilidade e bioacessibilidade das vitaminas incorporadas nos géis carregados;
- Mudar a matriz gelificante por outros polissacarídeos naturais;
- Secar os géis para formar um produto mais próximo com o de uma bala comercial, adicionar sabor e realizar análises sensoriais.
- Melhoria da formulação

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A. et al. Stability of vitamin D₃ encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food Chemistry**, London, v. 143, p. 379-383, 2014.
- ABHYANKAR, A. R. et al. Techniques for localisation of konjac glucomannan in model milk protein-polysaccharide mixed systems: Physicochemical and microscopic investigations. **Food Chemistry**, London, v. 129, p. 1362-1368, 2011.
- ABHYANKAR, A. R.; MULVIHILL, D. M.; AUTY, M. A. E. Combined microscopic and dynamic rheological methods for studying the structural breakdown properties of whey protein gels and emulsion filled gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 275-282, 2011.
- 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**, Chicago, v. 1, n. 2, p. 127-136, 2014.
- ACKLAND, M. L.; BALL, M. J. Zinc intake and status in Australian vegetarians. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 83, p. 27-33, 2000.
- ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R.M. Qualidade de fruto de aceroleira Cv Olivier em dois estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 541-545, 2011. Número especial.
- AGODA-TANDJAWA, G. et al. Rheological behaviour and microstructure of microfibrillated cellulose suspensions/low-methoxyl pectin mixed systems. Effect of calcium ions. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, p. 1045-1057, 2012.
- AJAZUDDIN, A. et al. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. **Journal Controlled Release**, Amsterdam, v. 171, p. 122-132, 2013.
- ALMOUAZEN, E. et al. Nano-encapsulation of vitamin D₃ active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 30, p. 1137-1146, 2013.
- ALVAREZ-SABATEL, S.; MARAÑÓN, I. M.; ARBOLEYA, J.-C. Impact of high pressure homogenisation (HPH) on inulin gelling properties, stability and development during storage. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 44, p. 333-344, 2015.
- ANDERSSON, H. B.; ELLEGÅRD, L. H.; BOSAEUS, I. G. Nondigestibility characteristics of inulin and oligofructose in humans. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 129, p. 1428S-1430S, 1999.
- ANDRADE, I. M. G. de. **Produção, caracterização e avaliação da digestibilidade in vitro de géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas**. 2017. 193 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 5. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011.

ARLTTOFT, D.; MADSEN, F.; IPSEN, R. Screening of probes for specific localisation of polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, p. 1062-1071, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SUPERMERCADO - ABRAS. **Demanda por produtos vegetarianos ainda é maior do que a oferta no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.abrasnet.com.br/clipping.php?area=1&clipping=51257>>. Acesso em: 15 out. 2016.

AXELOS, M. A. V.; THIBAUT, J. F. Influence of the substituents of the carboxyl groups and of the rhamnose content on the solution properties and flexibility of pectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 13, p. 77-82, 1991.

BAINES, D.; SEAL, R. **Natural food additives, ingredients and flavourings**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2012.

BALL, G. F. M. **Bioavailability and analysis of vitamins in foods**. London: Chapman & Hall, 1998.

BALL, G. F. M. **Vitamins in foods**: analysis, bioavailability, and stability. Boca Raton: CRC Press, 2005.

BARRAL, D.; BARROS, A. C.; ARAÚJO, R. P. C. Vitamina D: uma abordagem molecular. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 7, p. 309-315, 2007.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 3, p. 75-130.

BERNARD, M. A.; NAKONEZNY, P. A.; KASHNER, T. M. The effect of vitamin B₁₂ deficiency on older veterans and its relationship to health. **Journal of the American Geriatrics Society**, Malden, v. 46, p. 1199-1203, 1998.

BOECKNER, L. S.; SCHNEPF, M. I.; TUNGLAND, B. C. Inulin: a review of nutritional and health implications. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 43, p. 1-63, 2000.

BOLAND, A. B. et al. Influence of gelatine, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems. **Food Chemistry**, London, v. 86, p. 401-411, 2004.

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

BROUNS, F. et al. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 66, p. 591-599, 2012.

CAMPELO P. H. et al. Use of prebiotic carbohydrate as wall material on lime essential oil microparticles. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 34, n. 6, p. 535-544, 2017.

- CANTORNA, M. T.; HUMPAL-WINTER, J.; DELUCA, H. F. In vivo upregulation of interleukin-4 is one mechanism underlying the immunoregulatory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 377, p. 135-138, 2000.
- CAPEL, F. et al. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 20, p. 901-907, 2006.
- CASTEL, V.; RUBIOLO, A. C.; CARRARA, C. R. Brea gum as wall material in the microencapsulation of corn oil by spray drying: Effect of inulin addition. **Food Research International**, Barking, v. 103, p. 76-83, 2018.
- CHAN, S. Y. Pectin as a rheology modifier: origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 161, p. 118-139, 2017.
- CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D. J. Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 66, p. 457-463, 2001.
- CHANG, Y.-Y. et al. Effect of gums on the rheological characteristics and microstructure of acid-induced SPI-gum mixed gels. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 108, p. 183-191, 2014.
- CHAROEN, R. et al. Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: whey protein, gum arabic, and modified starch. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 76, p. E165-E172, 2011.
- CHEN, J. et al. Pectin modifications: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 55, p. 1684-1698, 2014.
- CHIORANDO, M. Veganism skyrockets by 600% in America to 6% of population. **Plant based news**, 26 jun. 2017. Ethics. Disponível em: <<https://www.plantbasednews.org/post/veganism-skyrockets-by-600-in-america-over-3-years-to-6-of-population>>. Acesso em: 14 de jun. de 2018.
- CHUNG, C. et al. Oil-filled hydrogel particles for reduced-fat food applications: Fabrication, characterization, and properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 20, p. 324-334, 2013.
- CHUNG, C.; DEGNER, B.; MCCLEMENTS, D. J. Controlled biopolymer phase separation in complex food matrices containing fat droplets, starch granules, and hydrocolloids. **Food Research International**, Barking, v. 54, p. 829-836, 2013.
- COUCEIRO, P.; SLYWITCH, E.; LENZ, F. Padrão alimentar da dieta vegetariana. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 6, p. 365-73, 2008.
- CUI, S. W.; WANG, Q. Understanding the physical properties of food polysaccharides. In: CUI, S. W. **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- DAI, L. et al. Characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/gum Arabic complex colloidal nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 74, p. 239-248, 2018.

DE LAVERGNE, M. D. et al. Dynamic texture perception and oral processing of semi-solid food gels: Part 1: a comparison between QDA, progressive profiling and TDS. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 43, p. 207-217, 2015.

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

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

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, p. 25-39, 2003.

DOKIĆ, L.; KRSTONOŠIĆ, V.; NIKOLIĆ, I. Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 29, p. 185-192, 2012.

DORIS, C. Plant-based eating evolves. **Food Technology**, Chicago, n. 1, p. 27-37, 2017.

DOUBLIER, J. L.; CUVELIER, G. Gums and hydrocolloids: functional aspects. In: ELIASSON, A.-C. **Carbohydrates in food**. New York: Basel, Marcel Dekker, 1996. p. 283-318.

ELLENBOGEN, L; COOPER, B. A. Vitamin B₁₂. In: MACHLIN, L. J. (Ed.). **Handbook of vitamins**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1991.

ESTEVINHO, B. N. et al. Soluble vitamins (vitamin B₁₂ and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. **Powder Technology**, Lausanne, v. 289, p. 71-78, 2016.

FERNANDES, R. V. B. et al. Cashew gum and inulin: new alternative for ginger essential oil microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 153, p. 133-142, 2016.

FERNANDES, R. V. B. et al. Proposing novel encapsulating matrices for spray-dried ginger essential oil from the whey protein isolate-inulin/maltodextrin blends. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 10, n. 1, p. 115-130, 2017.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.101, p. 524-532, 2014.

FRAEYE, I. et al. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, p. 401-409, 2010.

GAO, Y. et al. Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays. **Food Chemistry**, London, v. 110, p. 769-776, 2008.

GEREMIAS-ANDRADE, I. M. et al. Rheology of emulsion-filled gels applied to the development of food materials. **Gels**, Basel, v. 2, p. 22-40, 2016.

- GILSENAN, P. M.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 41, p. 339-349, 2000.
- GLIBOWSKI, P. Effect of thermal and mechanical factors on rheological properties of high performance inulin gels and spreads. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 99, p. 106-113, 2010.
- GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 146, p. 276-290, 2010.
- GREGORY III, J. F. Vitaminas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 7, p. 345-408.
- GUGGISBERG D.; RISSE, M. C.; HADORN, R. Determination of vitamin B₁₂ in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column. **Meat Science**, Barking, v. 90, p. 279-283, 2012.
- GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, Cambridge, v. 12, p. 2826-2841, 2016.
- GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 128-130, p. 227-248, 2006.
- HERRMANN, W.; GEISEL, J. Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B-12 status. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 326, p. 47-59, 2002.
- HEUDI, O. et al. Determination of vitamin B₁₂ in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1101, p. 63-68, 2006.
- HOLM, K.; HERMANSSON, A.-M.; WENDIN, K. Sweetness and texture perception in mixed pectin gels with 30% sugar and a designed rheology. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 42, p. 788-795, 2009.
- HOU, J. J. et al. Edible double-network gels based on soy protein and sugar beet pectin with hierarchical microstructure. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 50, p. 94-101, 2015.
- HUANG, Y. C.; LIN, W. J.; CHENG, C. H. Nutrient intakes and iron status of healthy young vegetarians and nonvegetarians. **Nutritional Research**, Amsterdam, v. 19, p. 663-674, 1999.
- HUH, C.; MASON, S. G. A rigorous theory of ring tensiometry. **Colloid & Polymer Science**, Darmstad, v. 253, p. 566-580, 1975.
- HUNTER, R. J. **Zeta potencial in colloid science**. 2nd ed. London: Academic Press, 1981.
- IDRIS, O. H. M.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, p. 379-388, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA - IBOPE. 14% da população se declara vegetariana. 21 maio 2018. **IBOPE Inteligência**. Notícias e Pesquisas. Disponível em: <<http://www.ibopeinteligencia.com/noticias-e-pesquisas/14-da-populacao-se-declara-vegetariana/>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA - IBOPE. Dia mundial do vegetarianismo: 8% da população brasileira afirma ser adepta do estilo. 01 out. 2012. **IBOPE Inteligência**. Notícias e Pesquisas. Disponível em: <<http://www.ibopeinteligencia.com/noticias-e-pesquisas/dia-mundial-do-vegetarianismo-8-da-populacao-brasileira-afirma-ser-adepta-do-estilo/>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

IZYDORCZYK, M.; CUI, S. W.; WANG, Q. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications In: CUI, S. W. (Ed.). **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

JAIN, L. J.; JAIN, S.; JAIN, N. **Fundamentals of biochemistry**. rev. ed. New Delhi: S. Chand, 2005.

JAYME, M. L.; DUSTAN, D. E.; GEE, M. L. Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, p. 459-465, 1999.

JENKINS, D. J. A. et al. Decrease in postprandial insulin and glucose concentrations by guar and pectin. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 86, p. 20-23, 1977.

JOHNSTON, P. K. Implicações nutricionais de dietas vegetarianas In: SHILS, M. E, et al. **Modern nutrition in health and disease**. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.

KARIMI, R. et al. Application of inulin incheese as prebiotic: fat replacer and texturizer: a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 119, p. 85-100, 2015.

KASTNER, H. et al. Structure formation in sugar containing pectin gels- influence of tartaric acid content (pH) and cooling rate on the gelation of high-methoxylated pectin. **Food Chemistry**, London, v. 144, p. 44-49, 2014.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 27, p. 703-714, 2002.

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, p. 295-302, 2001.

KOEBNICK, C. et al. Long-term ovo-lacto vegetarian diet impairs vitamin B-12 status in pregnant women. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 134, p. 3319-3326, 2004.

KUMAR, S. S.; CHOUHAN, R. S.; THAKUR, M. S. Trends in analysis of vitamin B₁₂. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 398, p. 139-149, 2010.

LASSEN, A. D. et al. A comparison of the retention of vitamins B₁, B₂ and B₆, and cooking yield in pork loin with conventional and enhanced meal-service systems. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 215, p. 194-199, 2002.

LEITZMANN, C. Vegetarian diets: what are the advantages? In: ELMADFA, I. (Ed.). **Diet diversification and health promotion**. Basel: Karger, 2005. p. 147-15. (Forum Nutr Basel, v. 57).

LI, Q. et al. Preparation and characterization of nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as carriers for sustained release of vitamin D₃. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 59, p. 1962-1967, 2011.

LÖFGREN, C.; GUILLOTI, S.; HERMANSSON, A.-M. Microstructure and kinetic rheological behavior of amidated and nonamidated 1m pectin gels. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 7, p. 114-121, 2006.

LÖFGREN, C.; HERMANSSON, A.-M. Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, p. 480-486, 2007.

LÖFGREN, C.; WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A.-M. Microstructure and rheological behavior of pure and mixed pectin gels. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 3, p. 1144-1153, 2002.

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.

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

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

LUPI, F. R. et al. Rheological investigation of pectin-based emulsion gels for pharmaceutical and cosmetic uses. **Rheologica Acta**, Darmstadt, v. 54, p. 41-52, 2015.

MARLEY, E. C.; MACKAY, E.; YOUNG, G. Characterization of vitamin B₁₂ immunoaffinity columns and method development for determination of vitamin B₁₂ in a range of foods, juices and pharmaceutical products using immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with UV detection. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 26, p. 282-288, 2009.

MATALANIS, A. et al. Fabrication and characterization of filled hydrogel particles based on sequential segregative and aggregative biopolymer phase separation. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 689-701, 2010.

MATALANIS, A.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. **Food Chemistry**, London, v. 132, p. 766-772, 2012.

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

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 1, p. 241–69, 2010.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions**: principles, practices, and techniques. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, Cambridge, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. Role of hydrocolloids as food emulsifiers. In: WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. **Gums and stabilizers for the food industry 12**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003.

MCCLEMENTS, D. J.; BAI, L.; CHUNG, C. Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 8, p. 205-36, 2017.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 3, p. 131-178.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, p. R109-R124, 2007.

MCCLEMENTS, D. J.; GUMUS, C. E. Natural emulsifiers - biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 234, p. 3-26, 2016.

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

MCMARTIN, K. E. Vitamin B₁₂. In: DRISKELL, J. A.; WOLINSKY, I. **Sports nutrition: vitamins and trace elements**. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005, p. 111-121.

MEHTA, N. et al. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products: a critical review. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.52, p. 633-647, 2015.

MELINA, V.; DAVIS, B.; HARRISON, V. **A dieta saudável dos vegetais**: o guia completo para uma nova alimentação. Rio de Janeiro: Campus/Elsevier, 1998, 312 p.

MERCADO vegano tem grande demanda e atrai empreendedores. **Pequenas Empresas Grandes Negócios**, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/pme/noticia/2015/08/mercado-vegano-tem-grande-demanda-e-atrai-empreendedores.html>>. Acesso em: 15 out. 2016.

MEYER, D. et al. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 1881-1890, 2011.

MINTEL. Vegan food launches in Australia grew by 92% between 2014 and 2016.

Mintel Press Office, 25 jan. 2017. Food and drink. Disponível em: <<http://www.mintel.com/press-centre/food-and-drink/vegan-food-launches-in-australia-grew-by-92-between-2014-and-2016>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

MUN, S. et al. Control of lipid digestion and nutraceutical bioaccessibility using starch-based filled hydrogels: Influence of starch and surfactant type. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 44, p. 380-389, 2015.

NAPOLI, J. L.; KOSZEWSKI, N. J.; HORST, R. L. Isolation and identification of vitamin D metabolites. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 123, p. 127-140, 1986.

NELSON, E. D. et al. Degradation of vitamin D-3 in a stressed formulation: the identification of esters of vitamin D-3 formed by a transesterification with triglycerides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 43, p. 142-150, 2007.

NORMAN, A. W.; HENRY, H. L. Vitamin D. In: ERDMAN, J. W.; MACDONALD, I. A.; ZEISEL, S. H. **Present knowledge in nutrition**. 10th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012.

OAKENFULL, D.; SCOTT, A. Hydrophobic interaction in the gelation of highmethoxyl pectins. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 49, p. 1093-1098, 1984.

OBERST, L. Why the global rise in vegan and plant-based eating isn't a fad (600% increase in U.S. vegans + other astounding stats). **Food Revolution Network**, 18 jan. 2018. Future of Food. Disponível em: <<https://foodrevolution.org/blog/vegan-statistics-global/>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

OLIVEIRA, E. R. et al. Study of different wall matrix biopolymers on the properties of spray-dried pequi oil and on the stability of bioactive compounds. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 11, n. 3, p. 660-679, 2018.

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

OZTURK, B. et al. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D₃ bioaccessibility. **Food Chemistry**, London, v. 187, p. 499-506, 2015.

OZTURK, B.; MCCLEMENTS, D. J. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. **Current Opinion in Food Science**, Amsterdam, v. 7, p. 1-6, 2016.

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.

PETTIFOR, J. M.; PRENTICE, A. The role of vitamin D in paediatric bone health. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v. 25, p. 573-584, 2011.

PICCIANO, M. F. Vitamin D status and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 50, 2p. 24-25, 2010.

PICCONE, P.; RASTELLI, S. L.; PITTIA, P. Aroma release and sensory perception of fruit candies model systems. **Procedia Food Science**, Amsterdam, v. 1, p. 1509-1515, 2011.

PITTAS, A. G. et al. Systematic review: vitamin D and cardiometabolic outcomes. **Annals Internal Medicine**, Philadelphia, v. 152, p. 307-314, 2010.

PRENTICE, A.; GOLDBERG, G. R.; SCHOENMAKERS, I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 88, p. 500S–506S, 2008.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RANGEL, A. Pequenas empresas de produtos vegetarianos crescem 40 % ao ano. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 04 jul. 2016. Mercado. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2016/07/1787773-pequenas-empresas-de-produtos-vegetarianos-crescem-40-ao-ano.shtml>>. Acesso em: 15 out. 2016.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007.

ROBERFROID, M. B. Caloric value of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 129, p. 1436S-1437S, 1999.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 40, n. 6, p. 461-480, 2000.

ROBERT, C.; BROWN, D. L. Vitamin B₁₂ deficiency. **American Family Physician**, Kansas City, v. 67, p. 979-986, 2003.

SABATÉ, J. (Ed.). **Vegetarian nutrition**. Boca Raton: The CRC Press, 2001. (Modern Nutrition Series).

SALA, G. et al. Effect of droplet-matrix interaction on large deformation properties of emulsion-filled gels. **Journal of Texture Studies**, Dordrecht, v. 38, p. 511-535, 2007.

SATO, A. C. K.; MORAES, K. E. F. P.; CUNHA, R. L. Development of gelled emulsions with improved oxidative and pH stability. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 34, p. 184-192, 2014.

SCOTT, J. M. Folate-vitamin B₁₂ interrelationships in the central nervous system. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 51, p. 219-224, 1992.

SHANTA, N. C.; DECKER, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 77, n. 2, p. 421-424, 1994.

SHARMA, B. R. et al. An overview on pectins. **Times Food Processing Journal**, Rajasthan, p. 44-51, 2006.

SHAW, D. J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. 4th ed. Oxford: Butterworth/Heinemann, 1992.

SILVA, E. K. et al. Ultrasound-assisted formation of annatto seed oil emulsions stabilized by biopolymers. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 47, p. 1-13, 2015a.

SILVA, E. K. et al. Biopolymer-prebiotic carbohydrate blends and their effects on the retention of bioactive compounds and maintenance of antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 144, p. 149–158, 2016.

SILVA, S. C. G. et al. **Linhas de orientação para uma alimentação vegetariana saudável**. Lisboa: Programa Nacional de Alimentação Saudável, 2015b.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA - SVB. **Mercado vegetariano**. SVB. Disponível em: <<http://www.svb.org.br/vegetarianismo1/mercado-vegetariano>>. Acesso em: 15 out. 2016.

SOLA, M. Tendências de consumo: o varejo rumo a 2022. **IBOPE Inteligência**. Notícias e Pesquisas. 12 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ibopeinteligencia.com/noticias-e-pesquisas/tendencias-de-consumo-o-varejo-rumo-a-2022/>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

STABLER, S.P. Vitamin B₁₂ Deficiency. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 368, p. 149-160, 2013.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2nd ed. Michigan: Freeman Press, 1996.

THE PORTUGAL NEWS, Number of vegetarians in Portugal rises by 400 percent in 10 years. **The Portugal News online**, Portugal, 12 out. 2017. News. Disponível em: <<http://theportugalnews.com/news/number-of-vegetarians-in-portugal-rises-by-400-percent-in-10-years/43482>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

THE VEGAN SOCIETY. **There are three and half times as many vegans as there were in 2006, making it the fastest growing lifestyle movement**. 2016. Disponível em: <<https://www.vegansociety.com/whats-new/news/find-out-how-many-vegans-are-great-britain>>. Acesso em: 14 de jun. de 2018.

THIBAUT, J.-F.; RALET, M.-C. Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction. In: VORAGEN, F.; SCHOLS, H.; VISSER, R. **Advances in pectin and pectinase research**. Dordrecht: Springer, 2003. p. 91-105.

TONIAZZO, T. **Dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno: caracterização, estabilidade físico-química e incorporação em iogurte**. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

TROMP, R. H. et al. Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. **Food Research International**, Barking, v. 34, p. 931–938, 2001.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2006.

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Non-digestible oligosaccharides (dietary fibre): their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 3, p. 73-92, 2002.

VAN VLIET, T. Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction. **Colloid and Polymer Science**, Berlin, v. 266, p. 518-524, 1988.

VOGIATZOGLU, A. et al. Dietary sources of vitamin B-12 and their association with plasma vitamin B-12 concentrations in the general population: the Hordaland Homocysteine Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 89, p. 1078-87, 2009.

WALKINSHAW, M. D.; ARNOTT, S. Conformations and interactions of pectins: II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 153, p. 1075-1085, 1981.

WANG, L. et al. Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, p. 8-13, 2016.

WATANABE, F. Vitamin B₁₂ sources and bioavailability. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 232, p. 1266-1274, 2007.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Gum arabic. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 252-273.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, O. Gum arabic: production, safety and physiological effects, physicochemical characterization, functional properties, and food applications. In: CHO, S. S. **Handbook of dietary fiber**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 655-673.

WITCZAK, T.; WITCZAK, M.; ZIOBRO, R. Effect of inulin and pectin on rheological and thermal properties of potato starch paste and gel. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 124, p. 72-79, 2014.

WOUTERS, R. Inulin. In: IMESON, A. **Food stabilisers, thickeners and gelling agents**. Chichester, UK: Blackwell, 2010. p. 180-197.

ZABOT, G. L. et al. Replacing modified starch by inulin as prebiotic encapsulant matrix of lipophilic bioactive compounds. **Food Research International**, Barking, v. 85, p. 26-35, 2016.

ZHANG, Z.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. **Food Research International**, Barking, v. 64, p. 520-526, 2014.

ZIEGLER, E. E.; FILER, L.J. **Present knowledge in nutrition**. 7th ed. Washington, DC: ILSI Press, 1996. p. 191-205.

APÊNDICE A - Gráficos de varredura de frequência dos géis

Neste apêndice estão apresentados a triplicata das curvas de varredura de frequência dos géis caracterizados, géis não-carregado (Figura 48) e géis carregados com 20 % (Figura 49), 40 % (Figura 50) e 60 % (Figura 51) de emulsão.

Figura 48 - Curvas de varredura de frequência dos géis não carregados: 0 %, a 25 °C.

Figura 49 - Curvas de varredura de frequência dos géis substituídos por emulsão em 20 %, a 25 °C.

Figura 50 - Curvas de varredura de frequência dos géis substituídos por emulsão em 40 %, a 25 °C.

Figura 51 - Curvas de varredura de frequência dos géis substituídos por emulsão em 60 %, a 25 °C.

ANEXO A – LAUDOS

Figura 52 – Laudo do óleo de linhaça dourada.

Nossa Missão:
"Produzir produtos com qualidade assegurada, com responsabilidade ambiental, que supere as expectativas dos clientes, investindo sempre em novas tecnologias, desenvolvendo a competência dos colaboradores e praticando uma conduta ética."

LINO OIL - ÓLEO DE LINHAÇA			
Ensaios Físico-Químicos	Unidade	Resultado	
Valor calórico total	Kcal/100g	900 Kcal/3 700 kJ	
Carboidratos	g/100 g	0 g	
Proteínas	g/100 g	<0,1 g	
Gordura Total	g/100 g	100 g	
Gordura Saturada	g/100 g	11,01 g	
Gordura Trans	g/100 g	0,01 g	
Gorduras Monoinsaturadas (Omega - 9)	g/100 g	20,10 g	
Gorduras Poliinsaturadas (Omega - 3)	g/100 g	52,30 g	
Omega - 6	g/100 g	13,70 g	
Fibra Alimentar	g/100 g	<0,3 g	
Sódio	mg/100 g	<3 mg	
Úlio	mg/kg	<0,3 mg/kg	
Umidade e Substâncias Voláteis a 130 °C	g/100 g	<0,1 g	
Resíduo Mineral Fixo	g/100 g	<0,1 g	
Vitamina E	mg/100 g	0,960 mg	
Acidez (% de ácido oleico)	g/100 g	0,773 g	
Índice de acidez	mg KOH/g	1,541 mg	
Índice de Peroxídeos	meq O ₂ /kg	3,993	
Densidade (25°C)	g/cm ³	0,928	
Cor Garden	*	11	
Reação de Krel's (Pesquisa de Ranço)	*	Negativa	
Parâmetro: O lote está de acordo com as normas legais vigentes (Resolução RDC nº 360, de 23/12/03, MS-Anvisa).			
Ensaios Microbiológicos	Unidade	Resultado	Parâmetros
Coliformes termotolerantes	UFC/g	<3	3
Método: Placa Petrifilm 3M. Parâmetro: Res. RDC 12/2001 da Anvisa			
Cliente:	SAMANTHA CRISTINA DE PINHO		Responsável Técnico HELENARA BURMANN CRIQ Nº 05100929
Lote:	42789		
Quantidade:	4 UN/250 ML = 1 L		
Data de Fabricação:	20/11/2017		
Validade:	13/11/2018		
Armazenar em local limpo, seco, fresco e livre de pragas.			

Figura 53 – Laudo da vitamina D₃.**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sigmaaldrich.comOutside USA: surtechserv@sigmaaldrich.com**Certificate of Analysis**Product Name:
Cholecalciferol - ≥98% (HPLC)

Product Number: C9756
 Batch Number: SLBQ4022V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 67-97-0
 MDL Number: MFCD00078131
 Formula: C₂₇H₄₄O
 Formula Weight: 384.64 g/mol
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 21 MAR 2018
 Recommended Retest Date: MAR 2019

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Almost Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/mL, EtOH		
Carbon	82.8 - 88.0 %	84.5 %
Specific Rotation	105 - 112 °	106 °
C = 0.5 in EtOH at 25 deg C		
Purity (HPLC)	≥ 98 %	100 %

Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at SigmaAldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Figura 54 – Laudo da vitamina B₁₂.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Vitamina B ₁₂	Data de Análise:	06-10-2017
Lote Interno:	17122-B010-024141	Lote Fabricante:	C170612A
Data de Fabricação:	11-06-2017	Data de Validade:	10-06-2022
Origem:	China	Procedência:	Hong Kong
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	024141
DCB:	01984	DCI:	CYANOCOBALAMIN
CAS:	68-19-9	Peso Molecular:	1355
Fórmula Molecular:	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Pó cristalino vermelho escuro ou cristais vermelhos escuros	Conforme		EP - 9
Identificação *	UV - A amostra deve apresentar absorção máxima em 278 nm, 361 nm e de 547 nm a 559 nm.	Conforme		
	A razão da absorbância de A ₃₆₁ /A ₅₄₇₋₅₅₉ = 3,15 a 3,45 e	3,26		
	A razão da absorbância de A ₃₆₁ /A ₂₇₈ = 1,70 a 1,90	1,85		EP - 9
Identificação *	CCD - A mancha principal obtida no cromatograma com a solução amostra é similar em posição, cor e tamanho em relação a mancha principal obtida no cromatograma com a solução referência	Conforme		EP - 9
Solubilidade *	Ligeiramente solúvel em água e em etanol 96%; Praticamente insolúvel em acetona	Conforme		EP - 9
Perda Por Dessecação *	<= 12,0 (40 mg / 105°C / à vácuo em 2 horas)	3,72	%	EP - 9
Substâncias Relacionadas(HPLC) *	Impureza total <= 3,0	0,45	%	EP - 9
Solvente Residual (CG) *	Acetona <= 5000	Não detectado	ppm	EP - 9
Teor (base seca) *	96,0 - 102,0	99,09	%	EP - 9
Testes Microbiológicos				
Contagem Total de Bactérias *	<= 1000	< 10	UFC/g	Fabricante
Fungos e Leveduras *	<= 100	< 10	UFC/g	Fabricante
Escherichia coli *	Negativo	Negativo		Fabricante
Teste adicional ~				
Densidade Aparente *	Informativo (sem compactação)	0,50	g/mL	MGFB - V

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ()

Figura 55 – Laudo da pectina LMa.

CP Kelco ApS
 Ved Banen 16
 DK-4623 Lille Skensved
 DENMARK
 tel: +45 56165616 fax: +45 56169446

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Ship to:		Date: February 08, 2017	
Sold to:(If different from Ship to)			
Product Name: GENU® pectin type LM-102 AS-CAB		Manufacturing Date: Jun 24, 2016	
Material Number: 104034		Shelf Life/Best Before Date: Jun 24, 2019	
		Lot: SK62221	
Characteristic	Test Result	Specification	Test Method
Functionality guarantee date	Jun 24, 2018		
LM-SAG, CAB, % SAG	17.4	14.0 - 18.0	0201028
pH of 1% solution	4.2	4.0 - 4.5	0006041
Loss on drying, %	4.0	Not more than 12.0	0006042
<p>The information/data reported on this certificate applies to the lot/batch mentioned. Note that additional digits after the lot/batch number maybe included on the package. This number is for internal use only.</p> <p>Each lot of product complies with product specification, test methods and other characteristics as mentioned in the Product Data Sheet.</p> <p>Functionality guarantee date is the date to which CP Kelco guarantee functionality of the product as specified in the PDS if stored under recommended conditions.</p> <p>If date of use is after functionality date but within Shelf Life/Best Before date the product can still be used but functionality may have changed slightly.</p>			
Signature: HENRIK STAPELFELDT - QC MANAGER		Material was produced in: LILLE SKENSVED, DENMARK	

Figura 56 – Laudo da goma arábica.

129, Chemin de Croisset
CS94151
76723 Rouen Cedex
France
Tel : +33 (0) 2 32 83 18 18
Fax : +33 (0) 2 32 83 19 19

TECHNICAL DATA SHEET		INSTANTGUM BB			
Version : 8		Created on : 14/10/2005		Last update : 01/07/2015	
Content : Acacia gum purified and instantised					
Legal position : E414, Regulations 231/2012/EC and 1333/2008/EC, USP/NF, FCC, Eur.Ph.					
Standard Packaging : Net 25kg paper bags with inner polyethylene liner					
Maximum Storage : 3 years		Storage Condition : Keep closed in cool and dry place			
MATERIAL CHARACTERISTICS					
Physical and chemical data					
Analysis	Description	MINI	MAXI	UNIT	Test Method
Moisture	5h @ 105°C		10	%	USP <921> Method III
Colour @ 25%	Aqueous solution 25% - Lovibond AF900		15	-	-
Total Ashes @ 600°C	8h @ 600°C		4	%	Eur. Ph.
Acid insoluble ashes	Ashes + acid hydrolysis		0,5	%	USP<561>
Acid insoluble matters	Gravimetric determination after acid hydrolysis		0,15	%	-
pH	25% aqueous solution, @ 20°C	4,1	4,8	-	Eur. Ph. 2.2.3
Viscosity 25%	25%, Brookfield LVF 60 rpm @ 20°C	60	110	mPa.s	-
Mesh size powder through 63 µm	Vibro - sieving		15	%	-
Bacteriology					
Analysis	Description	MINI	MAXI	UNIT	Test Method
Total Plate Count	72 h @ 30°C - PCA		1000	cfu/g	ISO 4833
E. coli (test for the presence of)	48 h @ 44°C - EP without indole + Kovacs reagent		abs/5g	-	ISO 7251
Salmonella (presence)	Pre-enrichment, 24 h @ 41°C		abs/25g	-	ISO 6579
Yeasts & Molds	5 days @ 25°C - YGC		100	cfu/g	ISO 7954