

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL
DE SOJA ENRIQUECIDO DE CÁLCIO E VITAMINAS C E D
ATRAVÉS DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS.**

Mariana Miguez Tardelli Garcia



**Dissertação Apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Tecnologia de Processos
Químicos e Bioquímicos para a
Obtenção do Grau de Mestre
em Ciências (M.Sc).**

Orientadora:

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc

Escola de Química

Universidade Federal do Rio de Janeiro

2008

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL
DE SOJA ENRIQUECIDO DE CÁLCIO E VITAMINAS C E D
ATRAVÉS DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS.

Mariana Miguez Tardelli Garcia

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Tecnologia em
Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em
Ciências (M.Sc).

Escola de Química

Universidade Federal do Rio de Janeiro

2008

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL
DE SOJA ENRIQUECIDO DE CÁLCIO E VITAMINAS C E D
ATRAVÉS DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS.

Mariana Miguez Tardelli Garcia

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Tecnologia em
Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em
Ciências (M.Sc).

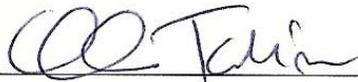
Aprovada por:



Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.
Escola de Química / UFRJ
Orientadora



Carlos Wanderlei Piler de Carvalho, D. Sc.
CTAA / EMBRAPA



Carmen Cecília Tadini
Escola Politécnica / USP



Suely Pereira Freitas, D. Sc.
Escola de Química / UFRJ

FICHA CATALOGRÁFICA

Miguez, Mariana Miguez Tardelli Garcia

Avaliação da estabilidade do extrato hidrossolúvel de soja enriquecido de cálcio e vitaminas c e d através do processamento digital de imagens/ Mariana Miguez Tardelli Garcia – Rio de Janeiro: UFRJ/EQ 2008

xxi, 93. p.: il.

Orientadora: Maria Alice Zarur Coelho

Dissertação (Mestrado em Ciência) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.

1. Extrato Hidrossolúvel de Soja. 2. Emulsão. 3. Processamento Digital de Imagens – Tese. I. Coelho, Maria Alice Zarur, II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos III. Título.

"Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la."
Cícero

Dedico esse trabalho
a minha querida mãe Elizabeth e
ao meu amado marido Marcello

Agradecimentos

Agradeço a Deus sem O qual não conseguiria chegar até aqui, pela força, paciência e fé nele depositada para enfrentar todos os obstáculos os quais tive que enfrentar durante estes dois anos de estudo.

À professora Maria Alice, que mais que orientadora é uma grande amiga, se fazendo sempre presente mesmo quando longe, capaz de ensinar não apenas o conteúdo, mas, sobretudo, como enfrentar e vencer cada obstáculo.

Ao meu marido Marcello, por fazer parte desse sonho. Por todas as horas de dedicação, pelos finais de semana perdidos, pelas leituras e releituras de artigos e da tese. Por acreditar que eu venceria e me dar o incentivo necessário para nunca desistir.

A minha mãe, pelo seu exemplo de dedicação e empenho. Por acreditar e se orgulhar do meu trabalho. Por ter me ensinado a dar valor a tudo àquilo que conquistamos com o nosso esforço e sacrifício.

A minha família Miguez e a minha nova família Tardelli Garcia pela confiança em mim depositada e por terem me apoiado nos momentos difíceis da vida.

Aos meus amigos, pelos seus elogios, broncas, e-mails, telefonemas, scrapps, festas, visitas e por tornarem cada dia melhor.

Aos amigos do laboratório 103, amigos nas horas de alegria e de tristeza, pelos almoços no Projectus, pelos seminários, pelas festas e visitas quando estava doente.

A minha afilhada e madrinha, Priscilla, por ser não apenas mãe da Sophia, mas de todos que algum dia precisaram de sua ajuda. Muito obrigada pelo carinho e pela dedicação.

À Etel, por todos seus momentos “você sabia”, pela sua maneira de tentar organizar tudo, causando uma verdadeira desordem. A querida Roberta, sempre presente na minha jornada na UFRJ, com um cafezinho fresquinho ou um vinhozinho. À Kelly, minha companheira de emulsões, com quem dividi não apenas o microscópio, mas minhas dúvidas e tarefas.

À Ariana pela companhia nos congressos, ao André pelas assistências 24h via MSN. A Tati e a Ana Iraidy, pelas ajudas em estatística e pela companhia nas disciplinas.

Ao Bernardo por ter se tornado um grande amigo, pelo aluno de IC compartilhado. Enfim, a todos, Diego, Rafael, Carlos André, Gizele, Ana Claudia, Ana Paula, Michelle, Nattascha, Fernanda e Vanessa, que fazem desse ambiente de trabalho, nossa segunda casa.

Ao meu aluno de iniciação científica, Luciano Dyballa, por suas alterações no programa de tratamento de imagens.

Cabe ainda agradecer à Professora Verônica Calado e principalmente a sua técnica Rosana Gouvêa Mauricio pelas análises reológicas.

A Ecobras pelas amostras fornecidas, em especial à Thiana Esteves, engenheira de alimentos da Ecobras, por sempre estar a minha disposição, tendo se tornado uma grande amiga.

Ao CNPq pela bolsa durante 18 meses de mestrado e a FAPERJ pela bolsa nota 10 nos últimos 6 meses.

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL
DE SOJA ENRIQUECIDO DE CÁLCIO E VITAMINAS C E D
ATRAVÉS DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS.

Resumo da Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação de
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de
Mestre em Ciências (M.Sc)

Mariana Miguez Tardelli Garcia

Orientadora: Maria Alice Zarur Coelho

O extrato hidrossolúvel de soja, EHS é um produto de elevado valor nutricional, com alto conteúdo protéico. Entretanto, o conteúdo de cálcio é baixo, sendo requerida sua adição, a fim de melhorar o valor nutricional do produto. O enriquecimento do EHS com cálcio tem sido uma tarefa difícil, pois os sais desse mineral podem promover coagulação das proteínas da leguminosa, desestabilizando a emulsão. A análise da estabilidade da emulsão é uma ferramenta de grande importância no desenvolvimento de novos produtos. Primeiramente determinou-se a estabilidade das emulsões de EHS de quatro marcas comerciais, através da quantificação do tamanho das micelas. A série de imagens obtidas em microscopia ótica das emulsões foi tratada e analisada

empregando-se operações morfológicas para remoção de ruídos e binarização das imagens com posterior quantificação do número de micelas e da área de cada micela. A rotina computacional já desenvolvida em *Matlab* (v.6.1) foi utilizada nesta etapa de caracterização do mecanismo de perda de estabilidade. Posterior a isso, uma amostra de EHS orgânico, foi enriquecida com cálcio e vitaminas C e D segundo um planejamento experimental 2^{3*} . A análise da perda da estabilidade seguiu os mesmos critérios da análise preliminar, tendo sido feita também a análise reológica dos EHS estudados. O enriquecimento do EHS mostrou ser um processo viável, uma vez que a perda na estabilidade foi pequena em relação ao EHS não enriquecido, tendo sido o enriquecimento recomendado com 15% de Cálcio, 15% de vitamina C e 30% de vitamina D.

EVALUATION OF STABILITY OF SOYMILK ENRICHED WITH CALCIUM AND VITAMINS C AND D BY DIGITAL IMAGE ANALYSIS.

Abstract of the *M. Sc.* Dissertation presented to the graduate program on the Chemical and Biochemical Technology, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro – Brazil

Mariana Miguez Tardelli Garcia

Advisor: Maria Alice Zarur Coelho

Soy milk is a product of high nutritional value and high protein content. However, the calcium content - important for the maintenance of bone mineral - is low, and its addition is requested, in order to improve the nutritional value of the product. The soy milk enriched with calcium has been a difficult task because the mineral salts can promote clotting of proteins, destabilizing the emulsion. In response to this difficulty examining the stability mechanism of the emulsion is a tool of great importance in developing new products. The stability of EHS emulsion of four trademarks was determined by quantifying the size distribution of the micelles. The size analysis of the micelles was conducted by using the technique of digital image processing. Series of images obtained by optical microscopy of the emulsions were treated and analyzed by using morphological operations for removal of noise and image binarization with subsequent quantification of the micelles number and their area. The computational routine developed in Matlab

(V.6.1) was used in this stage to characterize loss of stability. Subsequently, a sample of organic EHS was enriched with calcium and vitamins C and D in a 2^3 factorial design. The analysis of stability loss followed the same criteria used in the preliminary experiments and EHS rheological analysis was also made.

The enrichment of EHS proved to be a viable process, since stability loss was small compared with EHS not enriched, and the ideal enrichment was 15% of calcium, 15% of vitamin C and 30% of vitamin D.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	xiii
Nomenclatura	xx
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2.....	4
2. JUSTIFICATIVA	4
CAPÍTULO 3.....	7
3. OBJETIVOS.....	7
CAPÍTULO 4.....	8
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1 A Soja	8
4.2 Alimentos Funcionais.....	10
4.3 Produtos Orgânicos e o Meio Ambiente.	11
4. 3.1 Mercado de produtos de soja e orgânicos	12
4.4 Intolerância à lactose	12
4.4 Extrato Hidrossolúvel de Soja enriquecido com Cálcio e Vitaminas	13
4.4.1 Extrato Hidrossolúvel de Soja – “Leite” de Soja	13
4.4.2 Cálcio	15
4.4.3 Vitaminas	17
4.4.3.1 Vitamina D.....	18
4.4.3.2 Vitamina C.....	19
4.5 Emulsão	20
4.6.1 Estabilidade das emulsões	22
4.7 Medida do Tamanho das Partículas em Emulsão	25
4.7.1 Microscopia Óptica.....	27
4.7.2 Análise de Imagem Digital.....	28
4.8 Análise Reológica	30

4.8.1 Parâmetros Viscoelásticos	32
4.8.2 Reômetros.....	35
CAPÍTULO 5.....	38
CAPÍTULO 5.....	38
5. METODOLOGIA	38
5.1 Estudos Preliminares	38
5.1.2 Materiais.....	38
5.2 EHS orgânico com e sem enriquecimento.....	41
5.2.1 Matéria Prima	41
5.2.3 Enriquecimento e formulação do EHS.	44
5.3 Métodos	48
5.3.1. Análises de estabilidade de emulsões por ADI	48
5.3.1.1 Captura de Imagem.....	48
5.3.1.2 Calibração	49
5.3.1.3 Desenvolvimento do <i>Software</i> para a Medição do Tamanho da Partícula	49
5.3.2 Determinação das propriedades viscoelásticas	50
CAPÍTULO 6.....	51
6. RESULTADOS	51
6.1 Tratamento das Imagens Digitais.	51
6.2 Distribuição do Tamanho das Micelas	51
6.3 Análises Preliminares: Amostras Comerciais	53
6.3.1. EHS não enriquecido	53
6.3.2. EHS Enriquecido em cálcio.....	55
6.3.3. EHS Enriquecido em vitaminas.....	56
6.3.4. EHS Enriquecido em cálcio e vitaminas.....	58
6.3.5 Conclusões Preliminares.....	60
6.4 Resultados com EHS Orgânico Ecobras	61
6.4.2 - 1º Lote.....	65
6.4.3 - 2º Lote.....	69
6.4.4 - 3º Lote.....	72

6.4.5 - 4º Lote.....	76
6.4.6 Conclusão Geral.....	80
6.5 Reologia.....	81
6.5.1 Influência da Taxa de Deformação na Viscosidade	81
6.5.2 Viscoelasticidade.....	82
CAPÍTULO 7.....	84
7.1. CONCLUSÕES.....	84
7.2. SUGESTÕES.....	86
CAPÍTULO 8.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 Composição química média da soja em grão	9
Tabela 2- Composição química do extrato hidrossolúvel de soja e do leite de vaca integral ambos em pó.....	15
Tabela 3 - Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Cálcio, Vitamina D e C	16
Tabela 4 - Fatores que afetam a biodisponibilidade do cálcio	17
Tabela 5 Informações nutricionais das amostras comerciais.....	40
Tabela 6 – Valor Nutricional – Ecosoy	41
Tabela 7 - Fatores e níveis avaliados no planejamento experimental 2^{3*}	45
Tabela 8 Experimentos necessários para realização do planejamento experimental 2^{3*} (Statistica 6.0).....	46
Tabela 9 – Lotes de Análise.....	47
Tabela 10. Análise da dispersão (sigma) e do tamanho médio das micelas das amostras comerciais avaliadas	55
Tabela 11 – Equações de ajuste da variação do d^3 com o tempo para cada Lote de EHS.....	63
Tabela 12 - Valores de $d_{médio}$ e do desvio para o EHS enriquecido e puro	63
Tabela 13– Equações de ajuste da variação do d^3 com o tempo para o Lote 1.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema heterogêneo de dispersão de um líquido imiscível	21
Figura 2 - Cinética de separação de fases.....	23
Figura 3. Tensão de cisalhamento <i>versus</i> taxa de cisalhamento.....	32
Figura 4. Reômetro de cilindros concêntricos.....	37
Figura 5 - (a) SOY Original – Olvebra, (b) Naturis - Soja Original, Batavo – Batávia S.A, (c) Ades Original – Unilever Bestfoods Brasil Ltda e (d) Solllys Original – Nestlé.....	39
Figura 6- Ecosoy: Extrato de soja, Ecobras (ingredientes: soja orgânica e água, não contém glúten).....	41
Figura 7 Diagrama de blocos da produção do EHS enriquecido em cálcio e vitaminas C e D.....	43
Figura 8 (a) Moedor de soja para a produção do extrato de soja aquoso; (b) Prensa hidráulica para separação do extrato de soja aquoso hidrossolúvel e do resíduo (okara); (c) Homogeneizador de alta pressão.	44
Figura 9 - Ensaio 3 inicial (A ₃ -1) e final (A ₃ -6)	47
Figura 10 - Equipamento para aquisição de imagem: Microscópio óptico <i>Nikon</i> , modelo <i>Eclipse E200</i> , acoplado a câmera de vídeo digital, <i>EvolutionVF cooled color</i>	48
Figura 11 – Reômetro de cilindros concêntricos, do tipo rotacional (<i>Rheometric Scientific</i>).....	50
Figura 12 Tratamento das imagens obtidas por microscopia.....	52

Figura 13 Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 1 (EHS Puro)	a 4
°C (a) e a 25°C (b)	54
Figura 14 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 2, enriquecida em cálcio-	
a 4 °C (a) e a 25°C (b).....	56
Figura 15 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 3 a 10°C (a) e a 25°C	
(b).....	57
Figura 16 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 4 a 4°C (a) e a 25°C	
(b).....	59
Figura 17 - Variação do d^3 em função do tempo: (a) Lote 1 e 4, (b) Lote 2 e 3.....	62
Figura 18 - Distribuição do tamanho de micelas: 2º Lote - (a) EHS puro; (b) EHS enriquecido com 15% cálcio, 15% de vitamina C e 15% vitamina D	64
Figura 19 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 1 e 5, Lote 1	65
Figura 20 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 5.....	66
Figura 21 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 9 e 15, Lote 1	67
Figura 22 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 9	68
Figura 23 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 15.....	68
Figura 24 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 3 e 7, Lote 2	69
Figura 25 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 12.....	71
Figura 26 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 16.....	71
Figura 27 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 2 e 6, Lote 3	73
Figura 28 - Variação do d^3 com o tempo: Ensaios 9 e Branco, Lote 3.....	74
Figura 29 Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 13	75
Figura 30 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 17.....	75
Figura 31 Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 13 e 17, Lote 3	76

Figura 32 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 4	77
Figura 33 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 8	77
Figura 34 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 10	78
Figura 35 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 11	79
Figura 36 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 14.....	79
Figura 37 - Análise dos efeitos normalizados	81
Figura 38- Viscosidade das amostras <i>versus</i> taxa de deformação.....	82
Figura 39 – Influência da deformação na estabilidade da amostra enriquecida em 15% de cálcio e vitaminas C e D (a) e da amostra pura (b).....	83

Nomenclatura

\bar{a}_0^3 → raio médio inicial da partícula

\bar{a}^3 → raio médio da partícula no tempo t

ΔA → Tamanho da interface óleo/água

C → solubilidade da fase dispersa no meio contínuo

D → coeficiente de difusão da fase dispersa no meio contínuo

e → constante $\cong 2,718$;

G^* → resistência total de um material a uma deformação aplicada

G' → Módulo de armazenamento ou de rigidez dinâmica

G'' → Módulo de elasticidade ou de perda

ΔG → Energia livre de Gibbs

k → Consistência do fluido

K → Constante de coalescência

n → índice de comportamento

R → Constante dos gases reais

ΔS → Entropia

t → Tempo

T → Temperatura

V_m → volume molar da substância dispersa

γ → Tensão interfacial

γ_{\max} → taxa de cisalhamento máxima

δ → ângulo de fase

$\mu \rightarrow$ constante \cong média aritmética;

$\pi \rightarrow$ constante $\cong 3,1416$;

$\sigma \rightarrow$ constante \cong desvio padrão

$\tau \rightarrow$ tensão

$\tau_0 \rightarrow$ tensão inicial

$\tau_{\max} \rightarrow$ tensão máxima

$\omega \rightarrow$ velocidade angular

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o estado nutricional das populações que vivem em países desenvolvidos é afetado por hábitos inadequados como o consumo excessivo de gorduras, elevada ingestão de açúcares e diminuição considerável do consumo de amido, fibras, vitaminas e sais minerais, que podem ser causadores da elevada incidência de doenças crônico-degenerativas nesses países (DE ANGELIS, 2002).

Paralelamente a este fenômeno, observa-se um acelerado desenvolvimento de alimentos que apresentam, além de características nutricionais adequadas, componentes que exercem funções biológicas com o intuito de prevenir doenças e promover a saúde: os alimentos com propriedades funcionais (ROBERFROID, 1999).

Segundo o Institute of Medicine's Food and Nutrition Board (IOM/FNB, 1994), entende-se por alimento funcional o produto alimentício que fornece benefício específico à saúde, além dos tradicionais nutrientes nele contidos, isto é, alimentos que contêm níveis significativos de componentes biologicamente ativos, os quais promovem benefício ao indivíduo, além de simplesmente nutrir o organismo. Entre os alimentos funcionais mais estudados destacam-se a soja, o tomate, o peixe, a linhaça, as crucíferas (brócolis, couve de bruxelas, repolho), o alho e a cebola, as frutas cítricas, o chá verde, a uva/vinho tinto, a aveia, entre outros.

A soja e seus derivados têm sido utilizados há séculos nos países orientais como alimento básico da dieta daquelas populações, além de

ingredientes para produtos industrializados no ocidente (DELIZA, 2002). Pesquisas revelaram que a incidência e a mortalidade causadas pelo câncer de mama em mulheres ocidentais têm sido consideravelmente mais elevadas que na Ásia, onde a soja tem importante papel na dieta (YAZICI, 2006). Estudos epidemiológicos demonstraram que, além do câncer de mama e doenças cardiovasculares, a osteoporose, o câncer de próstata e os sintomas da menopausa são raros nas sociedades asiáticas (NEVEN, 1998), demonstrando, assim, que a soja tem papel preventivo e terapêutico na saúde do indivíduo.

Desse modo, a soja e seus derivados têm recebido atenção dos pesquisadores, principalmente devido à quantidade e à qualidade de sua proteína, sendo considerada, dentre os vegetais, a melhor substituta de produtos de origem animal. Além disso, a soja é importante fonte de outros compostos, como fibras, oligossacarídeos com potencial prebiótico, como rafinose e estaquiose, vitaminas e minerais.

O interesse e a busca do consumidor por alimentos mais saudáveis propiciam um rápido crescimento do segmento da indústria de alimentos que visa contribuir para o alcance de uma dieta de melhor qualidade (KATZ, 2000). Os indivíduos estão mais preocupados com as conseqüências que o estilo de vida e os hábitos alimentares têm na sua saúde e bem-estar. A escolha e o consumo inadequados de alimentos e dietas restritas podem afetar o estado nutricional do indivíduo em qualquer período de sua vida. Assim, oportunidades existem para que a indústria de alimentos desenvolva produtos que alcancem

os requerimentos nutricionais de grupos populacionais específicos, tais como: crianças, adolescentes, mulheres, esportistas, idosos, etc.

Atualmente, esse mercado de produtos ditos “naturais/saudáveis” é o segmento da indústria de alimentos que vem crescendo mais rapidamente, sempre associado aos produtos que variam desde o modo de preparo rápido ao pronto para consumo (*ready-to-eat*), comparado àqueles que requerem maior tempo para sua preparação. Devido à imagem negativa do uso de remédios e incertezas associadas à eficiência dos suplementos, a procura por alimentos funcionais tem se tornado bastante popular (RIAZ, 1999).

CAPÍTULO 2

2. JUSTIFICATIVA

Para muitas pessoas o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) – “leite” de soja – pode substituir o leite de vaca devido à intolerância ao leite bovino. Segundo o Instituto Nacional de Doenças Digestivas, Renais e Diabetes (EUA), cerca de 75% da população mundial é sensível à lactose. A substituição do leite de vaca pelo EHS seria nutricionalmente perfeita, quando se referisse apenas à quantidade de proteína, porém ao considerarmos a quantidade dos micronutrientes, como por exemplo o cálcio (15mg/100mL), o “leite” de soja não se torna adequado substituto para o leite bovino, cujo conteúdo de cálcio é de 123mg/100mL de leite (HEANEY, 2000).

O consumo adequado de cálcio durante a vida é um pré-requisito para a saúde dos ossos. O cálcio é necessário para o desenvolvimento ósseo durante o crescimento e para a manutenção da integridade do esqueleto durante toda a vida adulta. Um dos mais determinantes fatores do risco de osteoporose pós-menopausa é a quantidade de massa esquelética adquirida durante a infância e adolescência. A deficiência de cálcio pode acarretar, além da perda da massa óssea, problemas como câibras e irritabilidade por ser um mineral necessário na transmissão nervosa e na regulação dos batimentos cardíacos (KRAUSE, 1991).

Além disso, um parâmetro de suma importância a ser analisado é a biodisponibilidade de um mineral, que consiste na capacidade de estar biologicamente disponível para ser absorvido pelo organismo humano. Diversos fatores afetam a biodisponibilidade do cálcio tais como: constituintes

da dieta, fatores intestinais e tratamentos térmicos aplicados aos produtos já fortificados (BRINK, 1992, COZZOLINO, 1997 e MOSQUIN, 1996). Um dos critérios para fortificação de produtos alimentícios é que o mineral usado resulte numa boa biodisponibilidade do elemento para o consumidor (SLIGHTOWLER, 1996). Quanto maior a solubilidade de um sal de cálcio, maior a sua biodisponibilidade.

A solubilidade de sais orgânicos é muito maior do que a dos sais inorgânicos. O lactato de cálcio é um sal orgânico solúvel e que não precipita com o calor (MOSQUIN, 1996). A biodisponibilidade do cálcio nos vegetais pode ser afetada pelo seu conteúdo de fitatos e oxalatos, que são inibidores na absorção do cálcio. Em geral, a absorção de cálcio é inversamente proporcional ao conteúdo de ácido oxálico nos alimentos (XU, 1994).

Para obter o máximo dos alimentos ricos em cálcio é necessária a ingestão de vitamina D e C. Elas ajudam o organismo a absorver o cálcio dos alimentos, depositá-lo nos ossos e dentes.

A vitamina D ajuda na absorção de cálcio e fósforo no intestino, crescimento e reparação dos ossos e é encontrada, por exemplo, no leite integral, ovos, manteiga, peixes gordurosos, entre outros. Já a vitamina C atua no crescimento ósseo e do tecido conjuntivo, cura das feridas, no funcionamento dos vasos sanguíneos, é um excelente antioxidante e é encontrada em frutas cítricas, tomates, batatas e verduras.

O enriquecimento do “leite” de soja com cálcio tem sido uma tarefa difícil, pois os sais desse mineral podem promover a coagulação das proteínas da leguminosa, desestabilizando a emulsão. Em resposta a esta dificuldade, a

análise da estabilidade da emulsão é uma ferramenta de grande importância no desenvolvimento de novos produtos.

CAPÍTULO 3

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade do “leite” de soja adicionado de cálcio e vitamina C e D, por meio de técnicas de processamento digital de imagens e seu comportamento reológico. Todo o estudo foi feito de forma comparativa com uma amostra não enriquecida de minerais e vitaminas.

CAPÍTULO 4

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A Soja

A soja chegou ao Ocidente no final do século XV e início do XVI. Porém, nos quatro séculos seguintes permaneceu sem muita utilização. Somente a partir de 1900 a cultura expandiu-se e ocupou posição de destaque, considerando-se recente sua introdução na cultura Ocidental.

Nas últimas décadas, houve forte propagação do cultivo de soja no Brasil, que se tornou o segundo produtor mundial dessa leguminosa sendo superado apenas pelos Estados Unidos da América (DUTRA DE OLIVEIRA et al., 1996).

A soja é considerada um alimento de alto valor nutritivo e de grande importância na alimentação humana (Tabela 1), constituindo excelente fonte de energia e proteína, além de razoável fonte de vitaminas e minerais (DUTRA de OLIVEIRA, 1981). É rica em magnésio, fósforo, ferro, cobre e zinco (MORAIS e SILVA, 1996). Quando ainda verde, apresenta alto conteúdo de niacina e de ácido ascórbico. Quando madura, torna-se ótima fonte das vitaminas E e K e boa fonte de tiamina, riboflavina e ácido fólico (MORAIS e SILVA, 1996).

Tabela 1 Composição química média da soja em grão

Energia	417	Kcal
umidade	11	
Protéina	38	g/100g
Lipídios	19	
Carboidratos		
Açúcares	23	
Fibras	4	g/100g
Cinzas	5	
Minerais		
Ca	240	
P	580	
Fe	9,4	mg/100g
Na	1	
K	1900	
Mg	220	
Zn	3200	μg/100g
Cu	980	
Vitaminas		
A	12	μg/100g
E	1,8	
B1	0,83	mg/100g
B2	0,3	
Niacina	2,2	
Fibra Alimentar*		
Solúveis H ₂ O	1,8	
Não Solúveis H ₂ O	15,3	g/100g
Totais	17,1	

* A fibra alimentar é constituída pelo teor das fibras propriamente ditas e pelo teor dos carboidratos insolúveis
 Fonte: KAWAGA, 1995

A proteína da soja apresenta bom perfil de aminoácidos, sendo considerados limitantes apenas os sulfurados (FRANCO, 1996). Apesar da sua composição quase completa, a soja apresenta fatores que limitam sua utilização. Proteínas inibidoras da tripsina aumentam a necessidade de minerais (em parte devido à ação quelante do fitato) e vitaminas. Além disso,

contém estaquiose e rafinose que são oligossacarídeos não-metabolizados pelo homem.

Diversos estudos têm sido realizados para identificar as potencialidades dessa leguminosa, principalmente devido à quantidade e à qualidade de sua proteína, sendo considerada, dentre os vegetais, o melhor substituto de produtos de origem animal. Além disso, a soja é importante fonte de outros compostos, como fibras, oligossacarídeos com potencial prebiótico como rafinose e estaquiose, vitaminas e minerais (FUCHS *et al.*, 2005). Em particular, os componentes flavonóides da soja têm sido os mais estudados por apresentarem atividade diurética; reversão da perda óssea induzida por deficiência hormonal; redução do risco de doenças cardiovasculares em mulheres pós-menopausa; redução do LDL-colesterol plasmático, com incremento da HDL; possuem mecanismos envolvendo efeitos antioxidantes, antiproliferativo, antimigratórios em células do músculo liso, efeitos protetores na formação de trombose e manutenção de reatividade vascular normal; preventivo do câncer de cólon e de mamas; efeitos hipocolesterolêmicos e efeitos hormonais (DE ANGELIS, 2005).

4.2 Alimentos Funcionais

A possibilidade do uso de alimentos na redução de risco de doenças crônico-degenerativas tem sido assunto constante em eventos na área da nutrição e alimentação. Esta motivação tem sido justificada por: (i) reconhecimento da relação saúde-nutrição-doença, (ii) pesquisas clínicas e levantamentos epidemiológicos, (iii) evolução de conceitos relativos às

recomendações nutricionais, (iv) fenômenos socioeconômicos e epidemiológicos e ainda (v) perspectivas industriais. Assim, alimento funcional pode ser descrito como “alimento semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir comprovados efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução dos riscos de doenças crônico-degenerativas. Além das suas funções nutricionais “básicas”, o ingrediente funcional” seria o composto responsável pela ação biológica contida no alimento (LAJOLO, 2005).

4.3 Produtos Orgânicos e o Meio Ambiente.

Por definição do *Codex Alimentarius* (FAO,1999), “a Agricultura Orgânica é um sistema de produção holística, que promove e melhora a saúde do ecossistema agrícola ao fomentar a biodiversidade, os ciclos biológicos e a atividade biológica do solo”. Privilegia o uso de boas práticas de gestão da exploração agrícola, em lugar dos recursos de produção externos, tendo em conta que os sistemas de produção devem ser adaptados às condições regionais. Isto é seguido, sempre que possível, através do uso de métodos culturais, biológicos e mecânicos em detrimento da utilização de materiais sintéticos.

Além da proteção à saúde do consumidor e do produtor pelo não uso de agrotóxicos e pesticidas, os alimentos orgânicos apresentam importante papel na preservação do meio ambiente. A produção orgânica conserva a fertilidade dos solos evitando a erosão causada pelo uso inadequado de práticas agrícolas convencionais; preserva as fontes de água da contaminação por

nitrogênio, presente nos agrotóxicos; protege a biodiversidade pelo incentivo de culturas mistas e fortalecimento do ecossistema; e reduz o Aquecimento Global, pois o solo tratado com substâncias químicas libera uma quantidade enorme de gás carbônico, gás metano e óxido nitroso.

4. 3.1 Mercado de produtos de soja e orgânicos

Em pesquisa realizada pela *ACNielsen*, em 2004, foram indicadas entre as principais tendências que tem impulsionado o crescimento das categorias de “Alimentos & Bebidas”, o enfoque contínuo na saúde e a necessidade de praticidade. Dentre as categorias de alimentos e bebidas, as “Bebidas à Base de Soja” apresentaram o mais rápido crescimento, atingindo uma taxa global de 31% e evidenciando o crescente interesse por produtos de soja.

Quanto aos alimentos orgânicos, pesquisa recentemente divulgada (WILLER e YUSSEFI, 2006) indica que há cerca de 31 milhões de hectares sob cultivo orgânico no mundo, sendo o Brasil um dos principais produtores com a 6ª maior área: 887,6 mil ha – em 2000 esta área era de apenas 100 mil ha. O mercado mundial movimenta cerca de US\$ 30 bilhões/ano e no Brasil cerca de US\$ 250 milhões/ano, com potencial de crescimento anual médio de 25 % (SALOMÃO, 2006).

4.4 Intolerância à lactose

A intolerância à lactose é uma afecção da mucosa intestinal que incapacita de digestão da lactose devido à deficiência de uma enzima denominada lactase (β -D-galactosidase). Os carboidratos constituem a

principal fonte calórica para os seres humanos sendo responsáveis por cerca de 50% do total de calorias ingeridas em uma dieta regular. A intolerância a esses elementos, considerados importantes no metabolismo, repercute em alterações nutricionais decisivas, trazendo, como conseqüência, alterações no desenvolvimento físico dos indivíduos. As desordens funcionais gastrintestinais podem ser definidas como uma combinação variável de sintomas não bem explicados por anormalidades estruturais ou bioquímicas.

De acordo com Sevá-Pereira (1981), a deficiência de lactase ocorre em 58 milhões de brasileiros maiores de 15 anos. Em decorrência disso, 37 milhões de pessoas apresentariam intolerância ao leite e estariam sujeitas a sintomas desagradáveis ao tomar um copo de leite (PEREIRA FILHO, 2004).

4.4 Extrato Hidrossolúvel de Soja enriquecido com Cálcio e Vitaminas

4.4.1 Extrato Hidrossolúvel de Soja – “Leite” de Soja

O extrato hidrossolúvel de soja (“leite” de soja), um dos produtos da soja mais conhecidos, ainda é pouco consumido no Brasil. Os principais fatores limitantes ao consumo envolvem o sabor característico e a adstringência, já que em termos de aparência e valor protéico compara-se ao leite de vaca (MORAIS e SILVA, 1996).

Um quilo de soja fornece cerca de seis a nove litros de “leite” de soja, restando aproximadamente 700 g de resíduo com alto teor proteico. Sua composição química varia em função da matéria-prima utilizada e do processamento empregado. O “leite” de soja (Tabela 2) constitui boa fonte de vitamina B, mas contém somente 29,3% de cálcio em relação ao leite de vaca.

Apresenta proteína de alto valor nutricional, sendo deficiente apenas em relação aos aminoácidos sulfurados (metionina e cistina) (DUTRA DE OLIVEIRA et al., 1981).

Como o “leite” de soja não contém lactose e colesterol, é ideal para portadores de intolerância à lactose ou indivíduos com indicação de ingestão de colesterol reduzida. Constitui boa fonte proteica, podendo ser utilizado na prevenção e correção da desnutrição infantil (DUTRA DE OLIVEIRA, et al., 1996). O produto industrializado pode ser encontrado no Brasil na forma original (sem aromatização), aromatizado com diferentes sabores e, ainda adoçado com sacarose ou edulcorantes, como a sucralose.

Tabela 2- Composição química do extrato hidrossolúvel de soja e do leite de vaca integral ambos em pó

Composição (por 100g)	Extrato de Soja	Leite Bovino
Calorias (Kcal)	459	497
Carboidratos (g)	28,5	39,2
Proteínas (g)	35,7	25,4
Lipídios (g)	26,2	26,9
Ác. Graxos saturados (g)	3,3	16
Ác. Graxos monoinsaturados (g)	6,4	7,1
Ác. Graxos polinsaturados (g)	12,9	0,5
Fibra Alimentar (g)	7,3	NA
Colesterol (mg)	NA	85
Cálcio (mg)	359	890
Ferro (mg)	7	0,5
Fósforo (mg)	647	1242
Magnésio (mg)	216	77
Manganês (mg)	2,68	Tr
Sódio (mg)	8,3	323
Potássio (mg)	1607	1132
Cobre (mg)	1,19	0,11
Zinco (mg)	5,8	2,7
Retinol (mcg)	NA	361
Tiamina (mg)	Tr	0,24
Riboflavina (mg)	0,11	1,03
Piridoxina (mg)	0,35	Tr
Niacina (mg)	0,4*	0,7*
Vitamina C (mg)	9,2	6

Fonte: TACO - UNICAMP, 2006 NA - Não Aplicável Tr . Traço * Fonte: FRANCO, 2003

4.4.2 Cálcio

O cálcio é um mineral essencial para a formação e a manutenção de ossos e dentes, mas essas não são as únicas partes do corpo que precisam

dele. O coração para bater, os músculos para contraírem e relaxarem, o sangue para coagular e os nervos para transmitirem mensagens, também necessitam dele.

O corpo não pode fabricar seu próprio cálcio, daí a necessidade de ingerir uma quantidade diária adequada deste mineral, em todas as etapas da vida (Tabela 3).

Tabela 3 - Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Cálcio, Vitamina D e C

Nutriente	Cálcio (mg)	Vitamina D (µg)	Vitamina C (mg)
Lactente (0-6 meses)	300	5	25
Lactente (7-11 meses)	400	5	30
Crianças (1-3 anos)	500	5	30
Crianças (4-6 anos)	600	5	30
Crianças (7-10 anos)	700	5	35
Adulto	1000	5	45
Gestante	1200	5	55
Lactante	1000	5	70

Fonte: Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005

O leite e os produtos lácteos são os alimentos mais ricos em cálcio na dieta humana. Um copo de leite (240 mL) contém cerca de 295 mg de cálcio, enquanto o mesmo copo (240 mL) de suco de laranja contém apenas 28 mg do mineral. Além de estar presente em grande quantidade no leite e seus derivados, o cálcio destes alimentos possui alta biodisponibilidade, ou seja, é

mais facilmente absorvido pelo organismo. Na Tabela 3 são apresentados alguns fatores que afetam esta biodisponibilidade.

Tabela 4 - Fatores que afetam a biodisponibilidade do cálcio

Positivamente	Negativamente
Vitamina D	Proteínas (0,8-1g/Kg/dia)
Ácido Cítrico	Sódio
Flora intestinal (pH ácido)	Fósforo
Potássio, magnésio, zinco,	Ácido fítico e ácido oxálico
Manganês e cobre	Vitamina A

Fonte: <http://www.svb.org.br/depmeioambiente/pdfs/Leite.pdf>

4.4.3 Vitaminas

A palavra vitamina é derivada da combinação das palavras: *vital amina*. As vitaminas são moléculas orgânicas que funcionam principalmente como catalisadores para as reações dentro do corpo. Os catalisadores são substâncias que permitem que uma reação química ocorra usando menos energia e menos tempo do que precisaria em condições normais. Se estiverem em falta, como no caso de deficiência vitamínica, as funções normais do corpo podem falhar, deixando a pessoa suscetível a doenças.

As vitaminas são exigidas pelo corpo em quantidades mínimas (centésimos de grama, em muitos casos). Obtemos as vitaminas de três fontes:

- alimentos
- bebidas

- nosso próprio corpo - a vitamina K vem de uma bactéria do nosso intestino e a D é produzida com a ajuda de radiação ultravioleta sobre a pele (GORDON, 2000).

As vitaminas podem ser lipossolúveis ou hidrossolúveis. As lipossolúveis podem ser lembradas através do mnemônico ADEK (para as vitaminas A, D, E e K). Essas vitaminas são armazenadas com as reservas de gordura do corpo e dentro do fígado. As vitaminas hidrossolúveis incluem a vitamina C e as do complexo B. Se ingeridas em excesso são eliminadas pela urina, sendo ambas armazenadas no fígado.

É interessante observar que a maioria dos animais produz sua própria vitamina C. Os homens, os primatas (macacos, chimpanzés, etc.) e os porquinhos-da-índia perderam essa habilidade.

O estudo do enriquecimento de EHS com vitamina D e C faz-se necessário afim, de assegurar que o cálcio traga benefício a saúde, aumentando sua biodisponibilidade.

4.4.3.1 Vitamina D

A vitamina D é uma denominação genérica para os diversos compostos que possuem a propriedade de prevenir e curar o raquitismo – os mais importantes são o calciferol (ergosterol ou vitamina D2) e o colecalciferol (vitamina D3). Ela é importante no processo de absorção de cálcio e fósforo no intestino, mineralização, crescimento e reparo dos ossos.

Nos seres humanos, a vitamina D₃ é formada na pele pela ação dos raios ultravioletas da luz solar sobre um elemento (7-deidrocolesterol) presente na epiderme.

A ação da vitamina D é necessária para que ocorra uma adequada absorção intestinal de cálcio. Como este nutriente também está disponível a partir da ação da luz solar nos tecidos subcutâneos, a quantidade necessária a partir de fontes dietéticas depende de fatores não dietéticos, tais como fatores geográficos e tempo passado fora de casa. Segundo Buzinaro *et al.*(2006) a absorção intestinal de cálcio pode ser dividida em duas partes: uma ativa saturável, a qual é mediada pela vitamina D e envolve a proteína ligante de cálcio (Ca-Bp), e uma passiva, que pode corresponder à difusão simples ou facilitada (carreador-mediada).

Provavelmente todo o intestino é capaz de absorver cálcio. Contudo, sob condições normais, acredita-se que apenas o intestino delgado participe nesta absorção.

4.4.3.2 Vitamina C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é provavelmente uma das mais comentadas, apesar de ser a menos entendida das vitaminas. A vitamina C é, de fato, um nutriente (ou micronutriente) importante, indispensável para a vida humana.

A vitamina C é a vitamina antiescorbútica. Embora o escorbuto tenha sido descrito pela primeira vez durante as Cruzadas, a inter-relação específica

entre escorbuto, frutas cítricas e ácido ascórbico não foi estabelecida até o século XX.

O ácido ascórbico é absorvido a partir do intestino delgado para o sangue por um mecanismo ativo e, provavelmente, também por difusão. Passa rapidamente para dentro dos tecidos adrenais, do rim, do fígado e do baço. As quantidades excessivas são excretadas na urina.

Sua habilidade de perder e captar hidrogênio lhe garante um papel essencial no metabolismo. O ácido ascórbico está envolvido na síntese do colágeno, no desenvolvimento do tecido conjuntivo, no processo de cicatrização e recuperação após queimaduras e ferimentos, na resistência a infecções, na absorção do ferro, entre outras funções. É importante na resposta imune e em reações alérgicas. (Emedix, 2008)

Além disso, o ácido ascórbico aumenta a absorção do cálcio. De acordo com Buzinaro *et al* (2006), a adição de 25 mg desta vitamina (que corresponde a 65 mg de suco de laranja) a uma dieta contendo 336 mg de Ca melhora a absorção do elemento de 50 para 100 mg/dia.

4.5 Emulsão

Uma emulsão é um sistema instável do ponto de vista termodinâmico, i.e. qualquer sistema que num dado momento apresente uma energia potencial superior ao seu estado de energia inicial tem sempre tendência a retomar esse estado inicial (PRISTA e MORGADO, 1995; TREVINO *et al.*, 1993).

Quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato, a tendência natural é a sua separação completa, a menos que seja aplicada uma força

mecânica para dispersar um líquido no outro na forma de partículas finitas. Chamam-se emulsões a este tipo de sistemas (Figura 1).

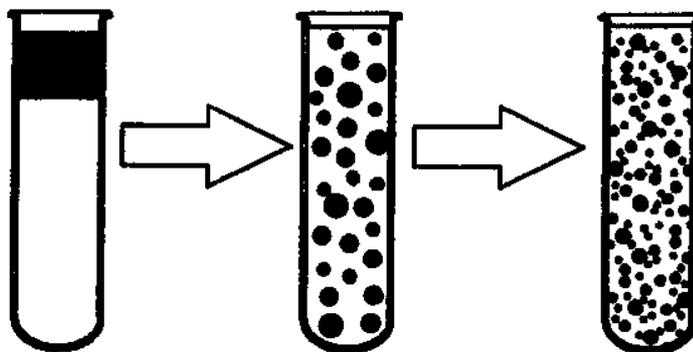


Figura 1 - Sistema heterogêneo de dispersão de um líquido imiscível

Quando a força mecânica é removida, os dois líquidos puros tendem a separar-se, podendo esta separação demorar intervalos variáveis de tempo, desde poucos segundos a vários anos. A fase dispersa denomina-se por fase interna e a fase contínua por fase externa. O tamanho da partícula interna pode variar e o sistema é termodinamicamente instável à medida que a fase interna tende constantemente a aglomerar-se e separar-se como uma segunda fase. Para retardar esta separação natural de fases são utilizados agentes emulsionantes (LYSSANT, 1974). Os agentes emulsionantes são moléculas que apresentam dois tipos de comportamentos opostos, hidrofílico/hidrofóbico ou lipofílico/lipofóbico na mesma molécula. Esta característica é responsável pela aglomeração destas moléculas na superfície de contato entre as duas fases, formando uma associação preferencial organizada das cadeias, a que se dá o nome de micelas, as quais são responsáveis pela diminuição da energia de Gibbs do sistema (PRISTA e MORGADO, 1995).

4.6.1 Estabilidade das emulsões

O termo estabilidade refere-se à habilidade da emulsão de resistir a modificações em suas propriedades ao longo do tempo: quanto mais estável, mais lentas serão as mudanças. A perda de estabilidade pode ocorrer por diferentes processos físicos e químicos. A instabilidade física é resultante de alterações na distribuição espacial ou na organização estrutural das moléculas, tais como floculação, coalescência e inversão de fase. Já a instabilidade química resulta em alteração na estrutura química da molécula por oxidação e hidrólise (McCLEMENTES, 1999).

Sendo a degradação física de emulsões um processo espontâneo, ocorre subsequente uma diminuição da energia livre de Gibbs (Figura 2). Para uma dada temperatura T e tensão interfacial γ , tal fato é devido à redução, quer do tamanho da interface óleo/água (A) quer da entropia (S) de acordo com a equação (1):

$$\Delta G = \gamma\Delta A - T\Delta S \quad [1]$$

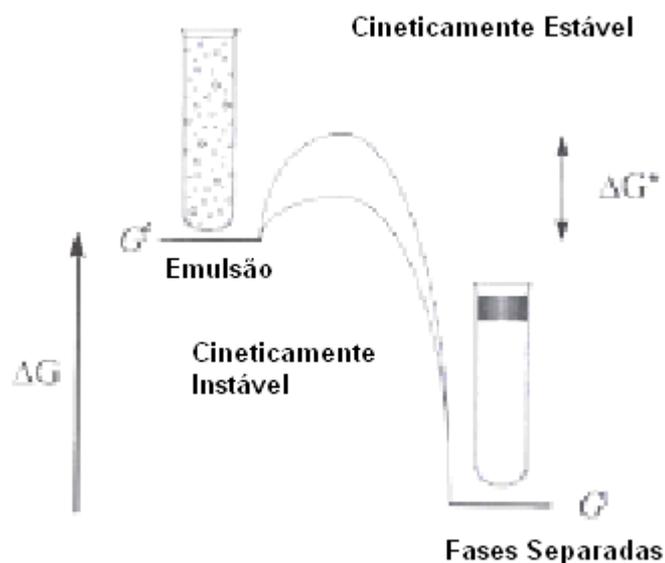


Figura 2 - Cinética de separação de fases.

A perda de estabilidade por parte das emulsões resulta de dois fenômenos principais: floculação seguida de coalescência; e difusão molecular ou processo de *Ostwald ripening* (FREIRE, 2005).

A floculação pode ser evitada por simples agitação da emulsão, enquanto que a coalescência e a difusão molecular tratam-se de processos irreversíveis.

A coalescência é o processo pelo qual ocorre a formação de uma micela de maior tamanho a partir de duas micelas menores. Este processo requer que duas micelas entrem em contato, com subsequente ruptura do filme líquido que as rodeia. A degradação da emulsão por coalescência é caracterizada por um aumento exponencial do volume da partícula com o tempo (equação 2), segundo a teoria de van den Tempel:

$$\bar{a}^3 = \bar{a}_0^3 \exp(Kt) \quad [2]$$

onde \bar{a}_0 é o raio médio inicial da partícula, \bar{a} é o raio médio da partícula no tempo t , e K é a constante de coalescência.

A perda da emulsão por difusão molecular, também conhecida como “*Ostwald ripening*”, é devido ao gradual crescimento das micelas da emulsão. Esta é uma consequência direta do efeito *Kelvin*, que indica que a solubilidade de uma partícula é inversamente proporcional ao seu raio, significando que as moléculas individuais tendem a sair de partículas menores para maiores. Assim, o crescimento da partícula é conseguido sem contato físico das partículas menores. *Lifshits* e *Slyozov* (1961) estudaram este fenômeno e estabeleceram que o tamanho da partícula varia linearmente com o tempo, aumentando com a solubilidade e difusividade da fase descontínua na fase contínua, segundo a equação (3):

$$\frac{d(\bar{a}^3)}{dt} = \frac{8CD\gamma V}{9kT} \quad [3]$$

onde \bar{a}_0^3 designa o raio da partícula, t o tempo, C e D são respectivamente a solubilidade e o coeficiente de difusão da fase dispersa no meio contínuo, V é o volume molar da substância dispersa, γ , a tensão interfacial entre as fases contínua e descontínua, k a constante de coalescência e T a temperatura absoluta. De acordo com a equação anterior, um aumento no volume da partícula é proporcional à solubilidade, ao coeficiente de difusão e à tensão interfacial da fase dispersa na fase contínua. Conseqüentemente, as emulsões que seguem o mecanismo de *Ostwald ripening* podem ser estabilizadas diminuindo pelo menos um destes três fatores.

Para se determinar estes mecanismos de perda de estabilidade é necessário determinar o tamanho das micelas ao longo do tempo. Um dos métodos empregados nesta análise baseia-se no processamento digital das imagens microscópicas das emulsões adquiridas ao longo do tempo.

4.7 Medida do Tamanho das Partículas em Emulsão

Existem diversos métodos de medição do tamanho das partículas numa emulsão, tendo como o objetivo principal determinar a concentração de partículas ou o tamanho das mesmas. Por vezes, o tamanho da partícula pode ser estimado por apenas um método de medição. Desta forma, a escolha do método de medição depende da natureza da amostra e das características mais importantes na distribuição e homogeneidade do tamanho das partículas. Todos os métodos de medição apresentam tanto vantagens como limitações, que devem ser consideradas e ponderadas antes da escolha do instrumento ou aparelho de medição do tamanho da partícula (CPSINTRUMENTS, 2006).

Os métodos de medição do tamanho da partícula podem ser divididos em três classes principais: (1) Métodos globais; (2) Métodos de contagem; (3) Métodos de separação.

Os métodos globais recolhem informação variada de todas as partículas de diferentes tamanhos existentes numa amostra, fornecendo uma distribuição estatística do tamanho das partículas referentes à população total. Este tipo de método engloba técnicas como Dispersão de Luz - Laser de Pequeno Ângulo, Espectroscopia de Correlação de Fóton e Espectroscopia de Dispersão Inversa.

Os métodos de contagem determinam a distribuição das partículas na amostra por acumulação de partículas individuais de tamanhos semelhantes. As partículas são classificadas e colocadas em “recipientes” por ordem de tamanho. A exatidão e resolução destes métodos dependem de quão exato o tamanho de uma partícula consegue ser determinado durante o curto espaço de tempo de contagem. Alguns dos equipamentos usados para a contagem são o Contador de Eletrozona, o Contador de Luz, o Contador de Tempo de Vão e o Microscópio (Óptico ou Eletrônico) (CPSINTRUMENTS, 2006).

Os métodos de separação requerem uma força exterior capaz de separar fisicamente as partículas por ordem de tamanho. Como partículas de diferente tamanho se encontram *a priori* fisicamente separadas, a caracterização exata de partículas individuais (métodos globais) e de distribuição estatística de uma população (métodos de contagem) têm um peso reduzido e/ou quase irrelevante comparado aos métodos de separação. Nestes métodos, a obtenção de resultados exatos e a elevada resolução dependem de como as partículas reagem à aplicação da força externa e de quão completamente as partículas são separadas por ordem de tamanho. Algumas das técnicas de separação mais comuns incluem o uso de Peneiras, Sedimentação por Gravitação, Centrífuga de Disco, Fracionamento Capilar Hidrodinâmico, Sedimentação Fracionada entre outros. (CPSINTRUMENTS, 2006).

O método de medição de tamanho de partícula que apresenta um maior grau de exatidão e maior capacidade de resolução é a Dispersão de Luz - Laser de Pequeno Ângulo (LALLS). Esta técnica apresenta a desvantagem de

possuir um elevado custo pelo que muitas vezes se recorre a métodos alternativos, sendo os mais comuns a Sedimentação Centrífuga (CPS) e a Microscopia. A Centrífuga de Disco apresenta elevada precisão e analisa um vasto intervalo de tamanho das micelas, sendo a sua principal desvantagem o fraco poder de resolução. Por outro lado, o microscópio óptico apresenta-se como uma técnica de fácil utilização e elevada resolução, embora possua o inconveniente de apresentar um alto desvio.

4.7.1 Microscopia Óptica

A técnica de microscopia é bastante fácil de utilizar, não necessitando o operador de um exaustivo treino prévio. A caracterização e classificação visual de uma distribuição de partículas com diferentes tamanhos por microscopia faz-se com recurso a uma escala de calibração. O microscópio é “calibrado” por observação de partículas de diferentes tamanhos padrão. Com o intuito de melhorar o sistema de visualização *in situ*, existem sistemas de contagem óptica automática (com recurso a câmara de vídeo ou de fotografia digital e computador).

O microscópio óptico além de fornecer o tamanho da partícula, fornece ainda informações acerca da morfologia, estrutura cristalina (se as partículas são unidades individuais ou sistemas agregados) e quantos compostos diferentes se encontram na amostra. A maior desvantagem desta técnica é o fato de o tamanho mínimo observável depender ou do aparelho ou do operador. Recorrendo à microscopia de campo escuro, partículas de 0,2 μm e maiores são visíveis como estruturas discretas, partículas de tamanho inferior a

0,2 μm em diâmetro não são visíveis, e tornam a iluminação de campo escuro mais difusa. Outras desvantagens desta técnica de contagem são: o número de partículas analisado é normalmente inferior ao analisado por outros métodos e ainda os possíveis erros de observação (por vezes, diversas partículas podem estar agregadas de tal forma que não se consegue diferenciar se trata-se de uma partícula individual ou de um conjunto de partículas) (CPSINTRUMENTS, 2006).

4.7.2 Análise de Imagem Digital

A análise de imagem é uma ferramenta indispensável para os utilizadores do microscópio que necessitam de obter informação quantitativa exata a partir das suas amostras. A análise de imagem é um complemento bem estabelecido das técnicas de microscopia óptica, de grande aplicabilidade em ciência biológicas, uma vez que permite uma classificação e quantificação rotineira, não subjetiva e automática de células individuais (VECHT-LIFSHITZ, 1992). A análise de imagem pode ser direcionada e aplicada na quantificação de micelas numa emulsão, desde que o tamanho destas seja visível e mensurável com a resolução microscópica disponível.

O termo análise de imagem, normalmente utilizado, engloba não somente a análise de imagem propriamente dita, como também os processos prévios de captura e tratamento de imagem, que são de primordial importância. A análise de imagem possibilita o melhoramento de imagens, bem como a identificação e isolamento automático de um objeto particular, sendo uma técnica expedita que permite a obtenção de informação morfológica e de

quantificação. A análise computacional possui vantagens relativamente ao operador humano em termos de memória, medição quantitativa e execução de tarefas repetitivas. No entanto, está em desvantagem no que respeita à interpretação da imagem e capacidade de resposta a fenômenos inesperados (FERREIRA, 1998).

O processamento de imagens pode ser subdividido em cinco estágios: visualização, melhoria, segmentação, morfologia matemática e medições (WILKINSON, 1998).

A visualização consiste na formação da imagem, ou seja, na sua captura. A qualidade dos processamentos posteriores depende da qualidade do sensor, das condições de iluminação, digitalização, resolução, etc. A etapa de melhoria da imagem consiste no pré-processamento, onde se assume que a imagem é constituída por duas partes, uma informativa e outra de variações que podem ser suprimidas. Esta etapa envolve operações de eliminação de ruídos, subtração do *background*, emprego de filtros visando melhorias na qualidade da imagem através de alterações em contraste, equalização, suavização, etc.

O objetivo das técnicas de segmentação de imagens é classificar os *pixels* de uma figura de forma significativa, permitindo a identificação de regiões semanticamente distintas. A forma mais simples de segmentação, que é freqüentemente encontrada em imagens microscópicas, identifica *pixels* como sendo parte de um objeto (*foreground*) ou como fundo da imagem (*background*). A qualidade e a interpretação das medidas de diferentes partes

de uma imagem dependem de forma crítica da habilidade do método de segmentação em associar cada *pixel* a uma classe apropriada.

A modelação morfológica ou morfologia matemática caracteriza-se pela manipulação de elementos estruturais de diversas formas e tamanhos sobre uma imagem plana. As relações entre a imagem e os elementos estruturais transladados são estudadas e esta técnica baseia-se na utilização de filtros lineares na vizinhança do objeto. As operações morfológicas são não lineares e usualmente são seqüenciais, sendo a seqüência de operações escolhida de forma a obter medidas quantitativas da imagem (ROERDINK, 1998).

Por fim, a quantificação ou interpretação dos dados permite extrair propriedades definidas como área, volume, tamanho, diâmetro, curvatura, número de objetos, etc., em termos de medidas reais, visando à aplicação direta nos sistemas de interesse.

4.8 Análise Reológica

Outra propriedade muito importante é a consistência dos produtos alimentícios. Alterações na viscosidade provocam alterações nas propriedades organolépticas, sendo fundamental o estudo das propriedades reológicas do fluido.

Um fluido é uma substância que sofre contínua deformação quando submetido a uma força de cisalhamento. A resistência oferecida por um fluido real a tal deformação é chamada de consistência. Para gases e para líquidos Newtonianos, se a pressão e a temperatura estão fixas, a consistência é constante e é chamada de viscosidade. Em fluidos não-Newtonianos, a

viscosidade é denominada viscosidade aparente, pois depende da taxa de deformação.

O conhecimento e o controle da viscosidade constituem preocupações das indústrias de transformação: química, alimentos, cosméticos e fármacos. A relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação é geralmente expressa pelo fluido de Bingham (equação 4), (STEFFE, 1996):

$$\tau - \tau_o = k(\dot{\gamma})^n \quad [4]$$

A lei de potência é comumente usada para descrever o comportamento de fluidos não Newtonianos onde τ_o representa a tensão inicial para promover o escoamento, k indica a consistência do fluido e n é o índice de comportamento.

A Figura 3 representa o comportamento de diferentes fluidos. Quando $0 < n < 1$, a viscosidade diminui quando a taxa de deformação aumenta, caracterizando um fluido pseudoplástico; se $n > 1$, a viscosidade aumenta quando a taxa de deformação aumenta, caracterizando um fluido dilatante.

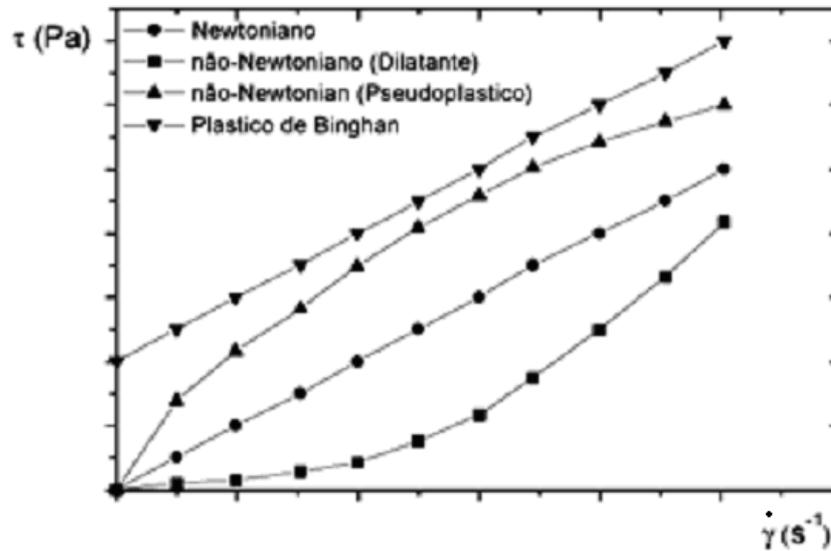


Figura 3. Tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento

4.8.1 Parâmetros Viscoelásticos

Os parâmetros viscoelásticos são avaliados através de testes oscilatórios. Com a finalidade de facilitar a interpretação destes testes, faz-se necessário recorrer à teoria dos modelos de mola e amortecedor e suas combinações descritos nos modelos de sólidos de Kelvin - Voigt e do fluido de Maxwell. Entretanto, as amostras viscoelásticas reais são mais complexas do que estes modelos (MACHADO, 2002). É comum, por similaridade, introduzir a definição de módulo complexo G^* (eq. 5):

$$G^* = \frac{\tau_{m\acute{a}x}}{\gamma_{m\acute{a}x}} \quad [5]$$

onde G^* representa a resistência total de um material a uma deformação aplicada, e $\tau_{m\acute{a}x}$ e $\gamma_{m\acute{a}x}$ são a tensão e taxa de cisalhamento máximas, respectivamente.

Considerando a teoria dos números complexos e as suas definições, podemos descrever as componentes viscosa e elástica através de uma única expressão, uma vez que o número complexo é definido por um vetor que contém uma parte real e outra imaginária. Por isso, o módulo complexo, G^* , pode ser definido de outra forma, por uma equação contendo uma parte real e outra imaginária que engloba as suas componentes viscosa e elástica (equação 6):

$$G^* = G' + iG'' \quad [6]$$

Na equação 6 aparecem dois novos parâmetros viscoelásticos importantes: o módulo de armazenamento ou de rigidez dinâmica, G' , que indica a parcela equivalente de energia proveniente da tensão aplicada, que é temporariamente armazenada durante o teste, mas que pode ser recuperada posteriormente; e o segundo membro da equação, definido por módulo de cisalhamento ou de perda, G'' , que indica a parcela de energia que foi utilizada para iniciar o escoamento e transferida irreversivelmente para a forma de calor.

Quando uma substância é puramente viscosa, seu ângulo de mudança de fase é 90° e, conseqüentemente, seu módulo de armazenamento é zero ($G' = 0$) e o módulo complexo é igual ao módulo de perda, ou seja $G^* = G''$. Por outro lado, se a substância é puramente elástica, o ângulo de fase é 0° , seu módulo de perda é zero ($G'' = 0$), conseqüentemente, o módulo complexo é igual ao módulo de armazenamento, ou seja $G^* = G'$.

Outro parâmetro importante na investigação do comportamento viscoelástico de um material é o ângulo de fase (δ), também denominado de ângulo de perda, que aparece nas equações senoidais da deformação elástica.

Os ângulos de mudança de fase dos materiais viscoelásticos se situam entre $0 < \delta < 90^\circ$, por questões de simplicidade, seu resultado pode ser registrado sob a forma da tangente do ângulo de perda, $\tan(\delta)$, também chamada de fricção interna ou amortecimento, que é a razão entre a energia dissipada e a energia potencial armazenada por ciclo, cuja definição matemática é dada na equação 7.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}. \quad [7]$$

Para materiais viscoelásticos reais, o módulo complexo (G^*) e a tangente do ângulo de fase ($\tan \delta$), dependem da frequência empregada, f , ou da velocidade angular, w . A velocidade angular está relacionada com a frequência ($w = 2\pi f$). Os resultados experimentais de G^* e δ , em um intervalo de frequência, fornecerão curvas reológicas que permitem avaliar a viscoelasticidade do material. Um declínio na curva de ângulo de perda *versus* a frequência (ou velocidade angular), dentro do intervalo $0 < \delta < 90^\circ$ sugere um decréscimo da viscosidade e um aumento correspondente no comportamento elástico do líquido testado. Em geral, o método de correlação, usado nos reômetros computadorizados para a obtenção de sinais harmônicos, determina os valores de G^* e $\tan \delta$, como dados de saída, quando são fornecidos os valores da deformação máxima ($\gamma_{m\acute{a}x}$) e do produto $w.t$ (ou frequência, ou velocidade angular), como dados de entrada. A partir daí, esses valores podem ser transformados nas componentes viscosas e elásticas da amostra.

4.8.2 Reômetros

Para se determinar os parâmetros reológicos, convém aplicar tensões ou deformações variáveis ao invés de tensões ou deformações constantes que conduzem a um estado permanente de cisalhamento, como é o caso dos viscosímetros (MACHADO, 2002).

Os equipamentos mais completos, cujos projetos permitem tanto investigar o comportamento reológico sob condição de fluxo pleno, quanto determinar o comportamento viscoelástico de certo fluido, são denominados de Reômetros. Os projetos dos reômetros seguem, basicamente, os mesmos princípios dos viscosímetros rotativos; entretanto, algumas diferenças mecânicas são introduzidas para permitir o movimento oscilatório e o controle da tensão ou da taxa de cisalhamento. (McCLEMENTS, 1999)

Em um reômetro, em modo de tensão controlada, a tensão de cisalhamento se comporta como função senoidal do tempo (Eq.8):

$$\tau = \tau_{\text{máx}} \cdot \text{sen}(\omega t) \quad [8]$$

onde τ é a tensão cisalhante, $\tau_{\text{máx}}$ é a tensão cisalhante máxima e ω é a velocidade angular.

Neste caso, o reômetro mede a deformação dependente do tempo resultante. Testes que utilizam tensões oscilatórias são também denominados de testes dinâmicos.

Os testes dinâmicos efetuados nos reômetros geram dados sobre viscosidade e elasticidade relacionados com seus tempos de resposta. Estes relacionam a velocidade angular ou freqüência imposta com a tensão ou

deformação oscilatória resultante. Realizar um teste dinâmico com um reômetro rotativo significa, por exemplo, que a parte giratória do sensor, cilíndrico, cônico ou placa, não está girando continuamente em uma direção, mas movimenta-se alternativamente, descrevendo uma função senoidal com o tempo, alcançando pequenos ângulos de deflexão (θ), para a esquerda e para direita. A amostra, posicionada no espaço livre do reômetro, é então forçada a se deformar segundo uma função senoidal provocando tensões que também seguem uma lei senoidal cuja amplitude está relacionada com a natureza do material (Machado, 2002).

4.8.2.1 Reômetro rotacional de cilindro concêntrico

O reômetro de cilindro concêntrico é um instrumento que opera em uma faixa de taxa de cisalhamento moderada, fazendo deste uma boa escolha para coleta de dados utilizados em muitos cálculos de engenharia (STEFFE, 1996). Estes reômetros mantêm uma velocidade de rotação constante a certa taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento é obtida através da medida do torque no cilindro. Estes equipamentos são projetados para causar um cisalhamento no fluido localizado entre dois cilindros concêntricos, sendo que um gira e outro permanece estacionário permitindo-se obter curvas reológicas.

A Figura 4 apresenta um reômetro de cilindros concêntricos .

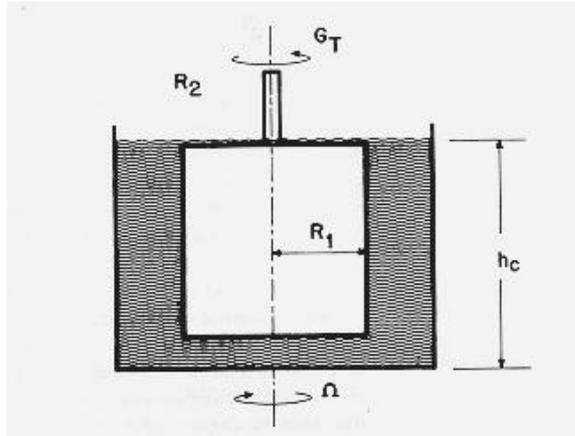


Figura 4. Reômetro de cilindros concêntricos.

$$\tau = \frac{M}{2\pi h R_{cil}^2}$$

Onde:

M = torque necessário para manter a velocidade angular (N.m)

h = altura do cilindro (m)

R_{cil} = raio do cilindro (m)

CAPÍTULO 5

5. METODOLOGIA

5.1 Estudos Preliminares

As formulações avaliadas foram escolhidas de forma a comparar o desempenho de uma amostra não enriquecida com outras enriquecidas com cálcio e/ou vitaminas. As amostras de bebida de soja foram conservadas em duas temperaturas, ambiente (25°C) e de geladeira (4°C), sendo as análises conduzidas de forma periódica até que ultrapassassem o prazo de validade. As amostras foram sempre recolhidas do mesmo frasco, tendo sido manipuladas sempre assepticamente.

5.1.2 Materiais

As análises preliminares foram realizadas com quatro diferentes marcas de bebidas de soja comerciais como mostra a Figura 5 (a – d) e as respectivas formulações foram comparadas como segue na Tabela 4. As formulações disponíveis no mercado não permitem comparações apenas com a mesma marca.

Amostra 1:
Bebida de soja
não enriquecida



(a)

Ingredientes: água, extrato de soja, extrato de malte, aroma de leite condensado, sal refinado e espessante goma xantana. Formulado com soja não transgênica.

Amostra 2:
Bebida de soja
enriquecida em
Cálcio



(b)

Ingredientes: água, extrato de soja, açúcar, fosfato tricálcio, amido modificado, sal, espessantes celulose microcristalina, carragena e carboximetilcelulose, aromas idênticos aos naturais de leite e baunilha e estabilizante citrato de sódio. Não contém glúten.

Amostra 3:
Bebida de soja
enriquecida em
vitaminas
C e D



(c)

Ingredientes: extrato de soja, água, açúcar, sal, vitaminas (A, B6, Ácido Fólico, B12, C, D, E), espessante goma carragena, estabilizante lecitina de soja. Não contém glúten.

Amostra 4:
Bebida de soja
enriquecido em
cálcio e em
vitaminas
C e D



(d)

Ingredientes: água, açúcar orgânico, proteína isolada de soja, óleo de girassol, fosfato tricálcio, Vitaminas (A, C, D, E), sal, estabilizantes celulose microcristalina, carragena, carboximetilcelulose sódica e citrato de sódio, emulsificante lecitina de soja, aromatizante, espessante goma xantana e carragena, antiespumante polimetilsiloxano. Não contém glúten.

Figura 5 - (a) SOY Original – Olvebra, (b) Naturis - Soja Original, Batavo – Batávia S.A, (c) Ades Original – Unilever Bestfoods Brasil Ltda e (d) Sollys Original – Nestlé

Tabela 5 Informações nutricionais das amostras comerciais

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL					
PORÇÃO DE 200 ML (1 COPO)					
	QUANTIDADE POR PORÇÃO				% VD*
	Amostra1	Amostra2	Amostra3	Amostra4	
VALOR ENERGÉTICO	82Kcal = 344 KJ	97Kcal = 407 KJ	78 Kcal = 328 KJ	89 Kcal = 374 KJ	4 - 5%
CARBOIDRATOS DOS QUAIS:	9,6 g	11 g	6,8 g	11 g	2 - 4%
AÇÚCARES TOTAIS	9,6 g	2 g	6 g	11 g	**
LACTOSE	0 g	0 g	0 g	0 g	**
PROTEÍNAS	5,2 g	5,2 g	5 g	5,2 g	7 %
GORDURAS TOTAIS, DAS QUAIS:	2,4 g	3,6 g	3,4 g	2,7 g	5 – 7%
GORDURAS SATURADAS	0,4 g	0,6 g	0,5 g	0,3 g	1 – 3 %
GORDURAS TRANS	0 g	0g	0 g	0g	**
GORDURAS MONOINSATURADAS	1,4 g	0,9 g	0,8 g	0,7 g	**
GORDURAS POLINSATURADOS	0,6 g	2,1 g	1,8 g	1,6 g	**
COLESTEROL	0 mg	0 mg	0 mg	0 mg	**
FIBRA ALIMENTAR	0 g	0 g	0,6 g	0,9 g	0 - 4 %
SÓDIO	12 mg	90 mg	121 mg	190 mg	1 – 8 %
CÁLCIO		240 mg		265 mg	24-27%
VITAMINA C			6,8 mg	8,4 mg	15-19%
VITAMINA E			1,5 mg	1,9mg αTE	15-19%
VITAMINA B6			0,20 mg		15%
VITAMINA A			90 µg	113µg RE	15-19%
ÁCIDO FÓLICO			60 µg		15%
VITAMINA D			0,75 µg	0,94 µg	15-19%
VITAMINA B12			0,36 µg		
* % Valores diários com base em uma dieta de 2000 Kcal ou 8400KJ – Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas					
** VD NÃO ESPECIFICADOS					

Fonte: Olvebra, Batávia S.A., Unilever Bestfoods Brasil Ltda e Nestlé

5.2 EHS orgânico com e sem enriquecimento

5.2.1 Matéria Prima

A matéria-prima escolhida foi o extrato de soja da Ecobras (Figura 6), por ser um produto acessível na forma *in natura*, i.e. sem aditivos como conservantes, o que permite avaliar as influências do cálcio e das vitaminas adicionadas sem interferências (Tabela 5) Possui alto valor nutritivo, 0% colesterol e 0% lactose. Além disso, é um produto orgânico.



Figura 6- Ecosoy: Extrato de soja, Ecobras (ingredientes: soja orgânica e água, não contém glúten).

Tabela 6 – Valor Nutricional – Ecosoy

Valor Nutricional médio por 100 mL	
Energia (Ki)	165,0
Proteína (g)	3,2
Gordura (g)	2,0
Carboidrato (g)	3,6
Colesterol	0,0
Lactose	0,0
Cálcio (mg)	15,0
Ferro (mg)	1,2
Sódio (mg)	48,0
Potássio (mg)	74,0

5.2.2. Produção do EHS na indústria

O EHS foi produzido na Ecobras e enriquecido após dois dias no Laboratório de Enzimologia da Escola de Química/UFRJ. As etapas de produção do EHS estão descritas no diagrama de blocos da Figura 7. Foi utilizado um lote diferente para cada grupo de análise cujas datas de fabricação foram respectivamente; 10/03/2008, 31/03/2008, 28/04/2008 e 26/05/2008.

Na Figura 8 é possível visualizarmos três importantes equipamentos utilizados no processo de fabricação do EHS onde ocorrem as etapas de maceração por 12 h a 12°C, cozimento por 10 min a 90°C e homogenização a 200 kg/cm².

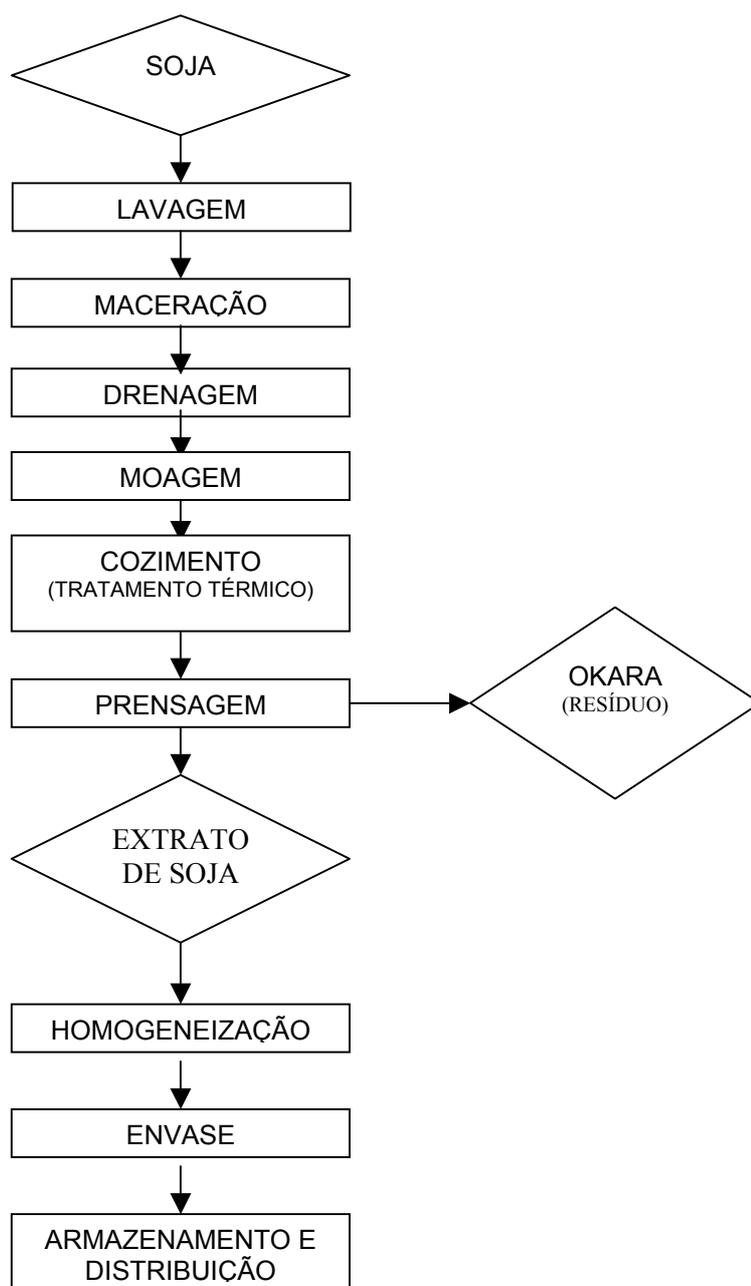


Figura 7 Diagrama de blocos da produção do EHS enriquecido em cálcio e vitaminas C e D



(a)

(b)



(c)

Figura 8 (a) Moedor de soja para a produção do extrato de soja aquoso; (b) Prensa hidráulica para separação do extrato de soja aquoso hidrossolúvel e do resíduo (okara); (c) Homogeneizador de alta pressão.

5.2.3 Enriquecimento e formulação do EHS.

A seleção do sal de cálcio utilizado baseou-se em estudo de enriquecimento realizado por Case *et al.* (2005). A quantidade de cálcio e vitaminas a ser adicionada foi baseada na Legislação Brasileira, Portarias nº 27

e 31 de 13 de janeiro de 1998, que determinam que vitaminas e minerais devem prover no mínimo 15% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) em cada 100 mL dos produtos líquidos para serem classificados como alimentos enriquecidos de cálcio e vitaminas (Case, 1995).

Diferentes quantidades de cálcio e vitaminas C e D foram adicionados ao EHS e as amostras submetidas à análise de estabilidade da emulsão formada em função do tempo de estocagem e validade, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 , incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no pontos central, totalizando 17 ensaios (Tabelas 6 e 7).

Tabela 7 - Fatores e níveis avaliados no planejamento experimental 2^{3*}

Nível (g/L)	Cálcio	Vitamina C	Vitamina D
- α	0 mg /100mL (0%)*	0 mg /100mL (0%)	0 μ g /100mL (0%)
- 1	48 mg /100mL (6%)	1,4 mg /100mL (6%)	0,15 μ g /100mL (6%)
0	120 mg /100mL (15%)	3,4 mg /100mL (15%)	0,38 μ g /100mL (15%)
+ 1	192 mg /100mL (21%)	5,4 mg /100mL (21%)	0,61 μ g / 100mL (21%)
+ α	240 mg /100mL (30%)	6,8 mg /100mL (30%)	0,76 μ g /100mL (30%)

* Valores de IDR

Tabela 8 Experimentos necessários para realização do planejamento experimental 2^{3*} (Statistica 6.0)

Nº Ensaio	Cálcio	Vitamina C	Vitamina D
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1,66443	0	0
10	1,66443	0	0
11	0	-1,66443	0
12	0	1,66443	0
13	0	0	-1,66443
14	0	0	1,66443
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

5.2.3.1 Preparo de soluções de vitaminas.

Para o enriquecimento com vitamina C e D, devido a concentração das mesmas ser muito pequena, foram preparadas amostras concentradas, onde 3,8 mg de Ergocalciferol (Vitamina D) foram solubilizados em 1000 mL de solução salina e 340 mg de Ácido Ascórbico (Vitamina C) foram solubilizados em 100 mL de solução salina.

5.2.3.2 Preparo dos Ensaio

Foram preparados 250 mL de cada ensaio segundo a Tabela 7 e separados em 6 diferentes frascos, para que cada frasco fosse aberto apenas no dia da análise evitando com isso a contaminação dos mesmos, conforme apresentado na Figura 9.



Figura 9 - Ensaio 3 inicial (A₃-1) e final (A₃-6)

Os ensaios foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de análise, de acordo com a Tabela 8. Cada análise durou 12 dias.

Tabela 9 – Lotes de Análise

Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Branco 1	Branco 2	Branco 3	Branco 4
Ensaio 1	Ensaio 3	Ensaio 2	Ensaio 4
Ensaio 5	Ensaio 7	Ensaio 6	Ensaio 8
Ensaio 9	Ensaio 12	Ensaio 13	Ensaio 10
Ensaio 15	Ensaio 16	Ensaio 17	Ensaio 11
			Ensaio 14

5.3 Métodos

5.3.1. Análises de estabilidade de emulsões por ADI

5.3.1.1 Captura de Imagem

O tamanho das micelas foi determinado através da observação de lâminas em um microscópio óptico (aumento de 1000 vezes), *Nikon*, modelo *Eclipse 200* com uma câmara acoplada de vídeo digital, *EvolutionVF cooleed color*, marca *MediaCybernetics* (Figura 10). As imagens foram obtidas com o auxílio do programa *Qcapture 2.73.0*, marca *Quantitative Imaging Corporation*® e posteriormente tratadas, sendo efetuadas a contagem e a medição do tamanho das micelas com *software* desenvolvido em *MatLab*® 6.1 (The Mathworks Inc, 1997). O programa, desenvolvido por FREIRE (2003) e adaptado para o sistema estudo aqui analisado, lê a imagem como um vetor a três dimensões (RGB), ou seja, uma matriz onde cada elemento desta corresponde a um único *pixel* da imagem.

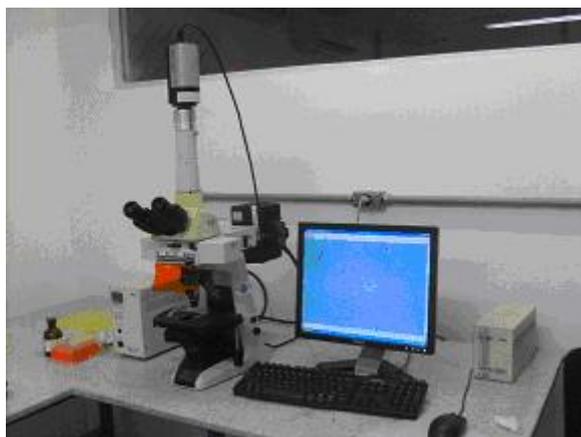


Figura 10 - Equipamento para aquisição de imagem: Microscópio óptico *Nikon*, modelo *Eclipse E200*, acoplado a câmara de vídeo digital, *EvolutionVF cooleed color*

5.3.1.2 Calibração

Para transformar os *pixels* em micrômetros utilizou-se a imagem de um micrômetro obtida nas mesmas condições de ampliação daquelas empregadas para as imagens estudo, e a referida conversão de pixels em μm foi realizada no software *Image-Pro Plus* (1993).

5.3.1.3 Desenvolvimento do *Software* para a Medição do Tamanho da Partícula

O programa desenvolvido para determinar o diâmetro das micelas das emulsões avaliadas neste trabalho está dividido em três componentes principais: a binarização das imagens obtidas, a quantificação das micelas e o cálculo de parâmetros estatísticos (FREIRE, 2003).

A binarização consiste na conversão da imagem colorida (RGB) obtida para uma imagem a preto e branco, com o seu subsequente tratamento de forma a eliminar possíveis ruídos. Esta parte é efetuada de forma a transformar uma matriz de três dimensões em uma matriz de duas dimensões composta simplesmente por elementos 0's (*pixels off*) e 1's (*pixels on*), para o seu posterior tratamento e quantificação dos objetos em causa. A segunda componente do programa efetua a quantificação das micelas, apresentando resultados como diâmetro e área de cada micela. Por último existe uma componente que reúne os dados de um determinado número de imagens já quantificadas anteriormente e fornece como resultado final o número de objetos

analisados, o desvio padrão das medidas de diâmetro, o diâmetro médio final e ainda o histograma da distribuição de tamanhos das micelas.

5.3.2 Determinação das propriedades viscoelásticas

A influência da velocidade de rotação (1 a 100 rad/s) e do esforço aplicado (0 a 100%) na estabilidade do EHS foi determinada por meio da análise de testes oscilatórios em um reômetro de cilindros concêntricos, do tipo rotacional, marca ARES-TA® (*Advanced Rheometric Expansion System, Rheometric Scientific*), acoplado a um banho termostaticado e com software Orchestrator™® (Figura 11), onde:



Geometria = Couette

Diâmetro do cilindro ext. = 34,0 mm

Diâmetro do cilindro int. = 32,0 mm

Altura = 33 mm

Temperatura de análise = 10 °C

Frequência = 0,29 Hz

Figura 11 – Reômetro de cilindros concêntricos, do tipo rotacional (*Rheometric Scientific*)

Foram determinados o módulo elástico, G' , que indica a parcela equivalente de energia que é temporariamente armazenada durante o teste e o módulo de perda viscosa, G'' , que indica a parcela de energia que é utilizada para iniciar o escoamento e é dissipada irreversivelmente na forma de calor. Esta metodologia seguiu os perfis utilizados por LORENZI *et al* (1995) que estudou o comportamento dinâmico de iogurtes integrais e desnatados.

CAPÍTULO 6

6. RESULTADOS

6.1 Tratamento das Imagens Digitais.

O tratamento de imagem é a parte vital de todo o processo, pois é a partir desta etapa que se vão obter todos os dados mensuráveis. Apresenta-se na Figura 12 um exemplo da seqüência de imagens obtidas no tratamento das imagens, partindo da imagem original até a última imagem tratada usada na quantificação.

A determinação da distribuição de tamanhos das micelas foi realizada a cada 2 dias durante a validade do produto - isto é, duas semanas - possibilitando assim avaliar o processo de perda de estabilidade das emulsões.

6.2 Distribuição do Tamanho das Micelas

A distribuição de tamanho das amostras apresentou um comportamento gaussiano (equação 10). Os resultados foram normalizados de 0 (valor mínimo) a 1 (valor máximo) e os parâmetros obtidos com auxílio do software *Origin 7.1*

$$f(x) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{\left[-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2} \right]}, -\infty < x < +\infty \quad [10]$$

onde:

π : constante $\cong 3,1416$;

μ = média aritmética;

σ = desvio padrão;

x = variável (tamanho da micela).

Imagem Original

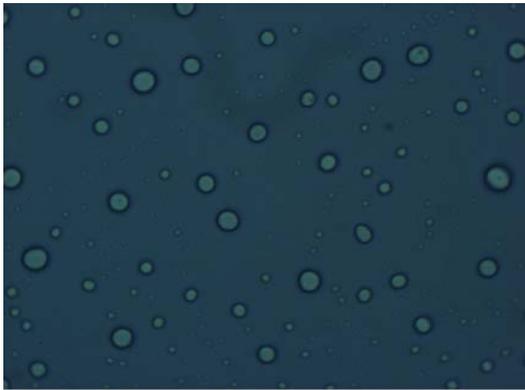


Imagem em tons de Cinza

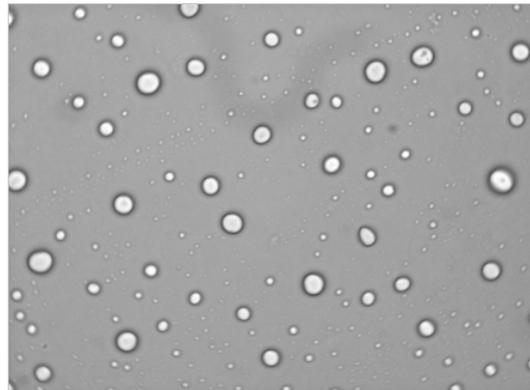
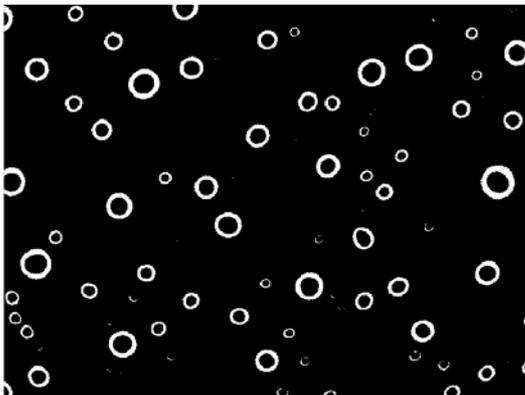
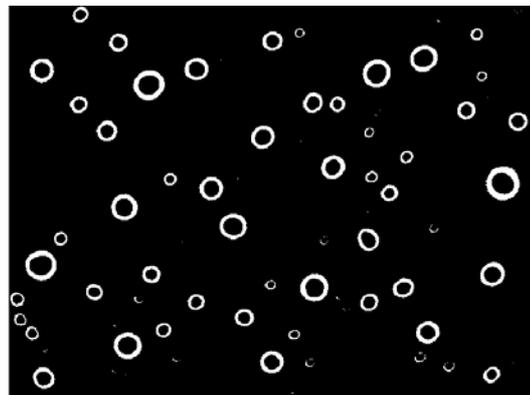


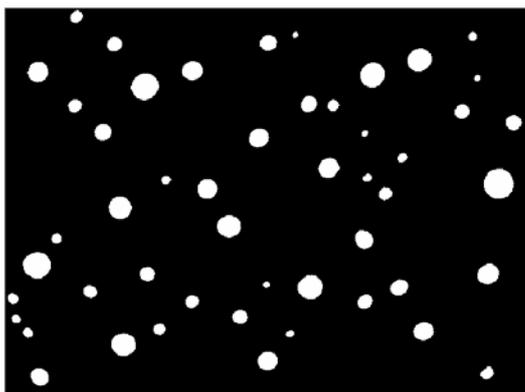
Imagem Binarizada



Eliminação de Bordas



Preenchimento das micelas e erosão



Reconstrução

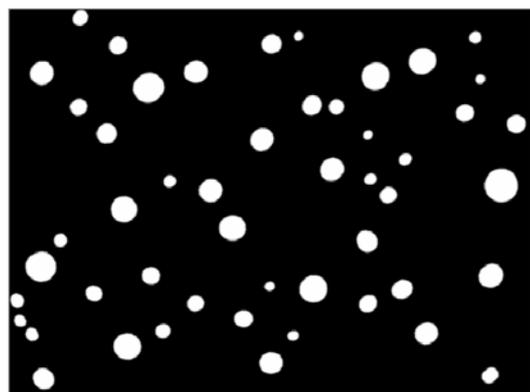


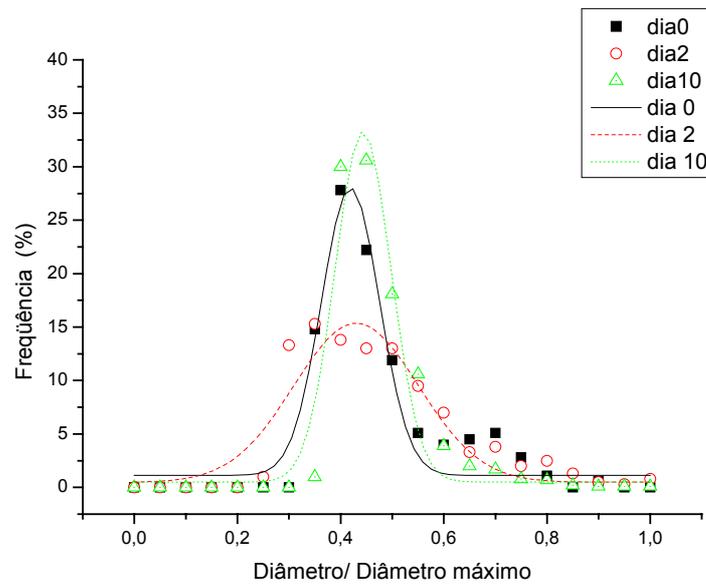
Figura 12 Tratamento das imagens obtidas por microscopia

6.3 Análises Preliminares: Amostras Comerciais

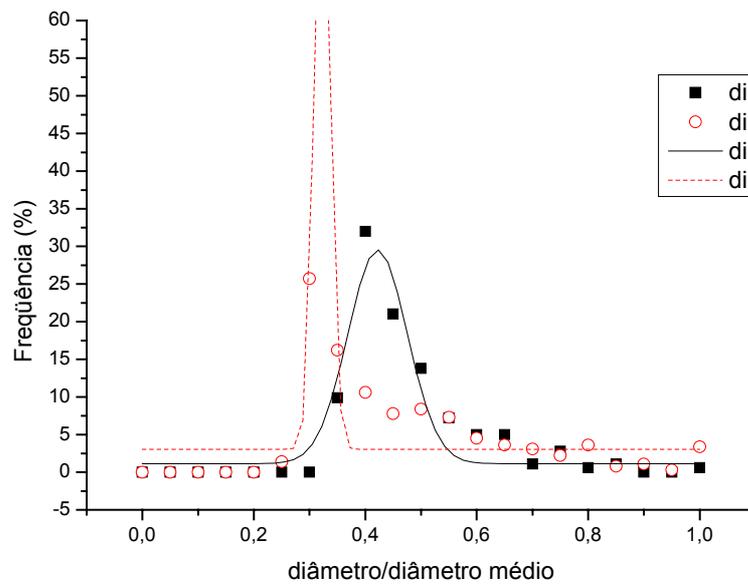
A perda de estabilidade das emulsões pode resultar de dois fenômenos principais: coalescência ou difusão molecular (processo de Ostwald ripening), sendo a degradação da emulsão por coalescência caracterizada por um aumento exponencial do volume da partícula com o tempo (teoria de van den Tempel) enquanto que no fenômeno de difusão molecular ocorre o crescimento linear do tamanho das micelas da emulsão (McClemente, 1999).

6.3.1. EHS não enriquecido

A Figura 13 apresenta a distribuição de tamanhos das micelas da amostra 1 (EHS Puro) nas temperaturas avaliadas de 4°C e 25°C. Conforme pode ser observado na Figura 13b, a amostra mantida a 25°C apresentou uma redução no tamanho de suas micelas denotando uma modificação da estrutura da emulsão. Convém lembrar que o EHS da amostra 1 possui um tempo de vida de prateleira inferior as outras amostras de EHS comerciais estudadas por ser um produto sem a adição de aditivos. Contudo, a 4°C a amostra mostrou-se bastante estável durante o prazo de validade, i.e. 15 dias. (Figura 13a).



(a)



(b)

Figura 13 Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 1 (EHS Puro) a 4 °C (a) e a 25°C (b)

6.3.2. EHS Enriquecido em cálcio

A Tabela 10 apresenta os valores obtidos para os parâmetros das gaussianas determinadas ao longo do tempo de análise para todas as amostras comerciais. Pelos valores dos diâmetros médios iniciais, pode-se verificar que a amostra enriquecida em cálcio (amostra 2) apresentou o menor diâmetro médio normalizado entre todas as amostras avaliadas e que, quando mantida a 4°C, manteve-se estável com o diâmetro médio normalizado praticamente constante ($0,35 < d_{\text{médio}} < 0,36$). Já a 25°C, este diâmetro aumenta de 0,35 para 0,42 de acordo com o teste t ($p < 0,05$), demonstrando que a perda de estabilidade pode ser mais um processo mais pronunciado em temperaturas mais elevadas quando na presença de cálcio (amostras 2 e 4) (Figura 14).

Tabela 10. Análise da dispersão (sigma) e do tamanho médio das micelas das amostras comerciais avaliadas

Inicial			Final		T = 4°C		T=25°C	
Amostra	sigma	média	Amostra	sigma	média	sigma	média	
1	0,11	0,42	1	0,11	0,44	0,03	0,32	
2	0,07	0,35	2	0,12	0,36	0,27	0,42	
3	0,26	0,41	3	0,26	0,44	0,10	0,42	
4	0,32	0,41	4	0,33	0,44	0,18	0,47	

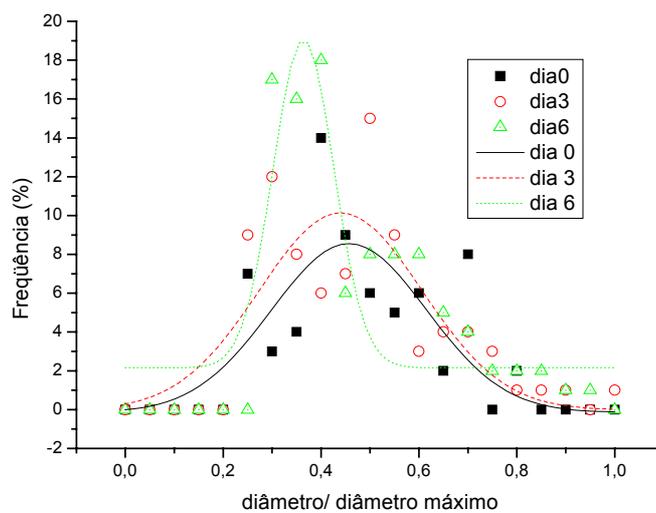
Amostra 1 – EHS não enriquecido

Amostra 2 – EHS enriquecido em Cálcio

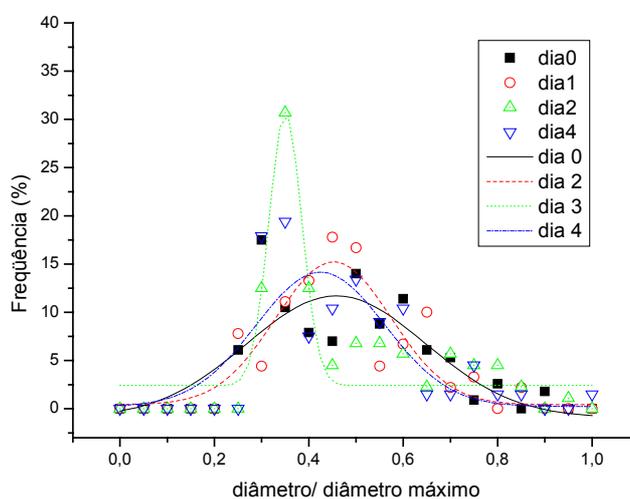
Amostra 3 – EHS enriquecido em Vitamina C e D

Amostra 4 – EHS enriquecido em cálcio e vitaminas C e D

A Figura 14 apresenta o ajuste das gaussianas para a distribuição de tamanhos das micelas da amostra 2 (EHS enriquecido em cálcio) nas temperaturas avaliadas de 4°C e 25°C e nos diferentes intervalos de tempo da análise.



(a)



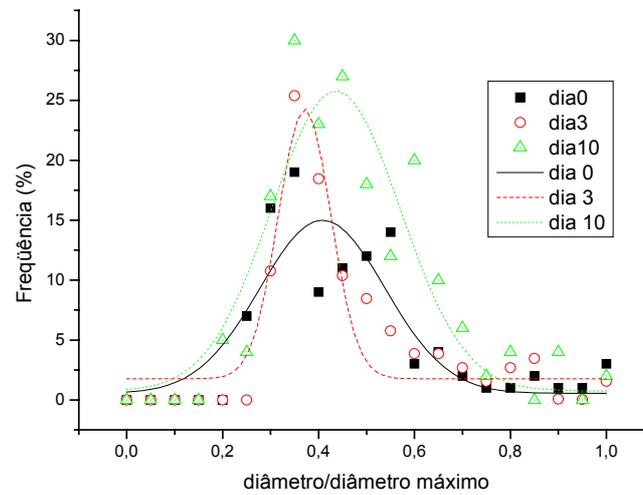
(b)

Figura 14 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 2, enriquecida em cálcio- a 4 °C (a) e a 25°C (b)

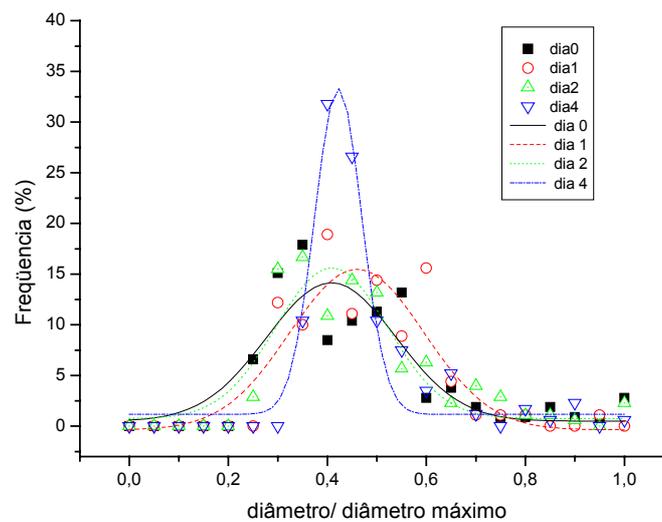
6.3.3. EHS Enriquecido em vitaminas

Através da Figura 15, pode-se perceber que adição de vitaminas apresenta alterações similares àquelas do leite sem enriquecimento (vide Figura 13), incluindo pequena variabilidade no diâmetro médio das micelas com o tempo de análise, como apresentado na Tabela 10. Este fato indica que

possivelmente a adição destas *per se* não levaria a um severo processo de desestabilização do EHS.



(a)



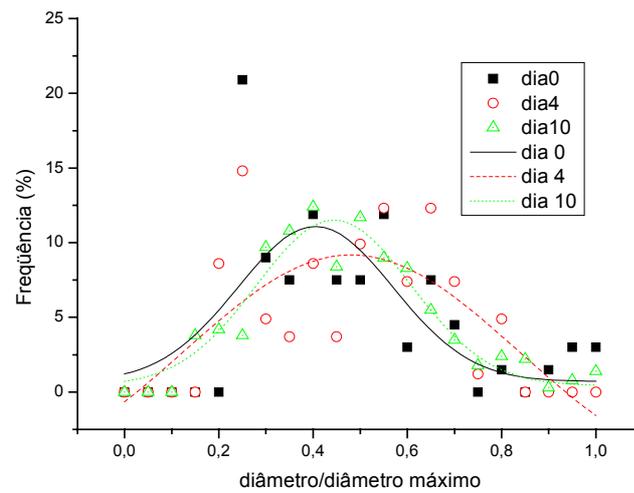
(b)

Figura 15 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 3 a 10°C (a) e a 25°C (b)

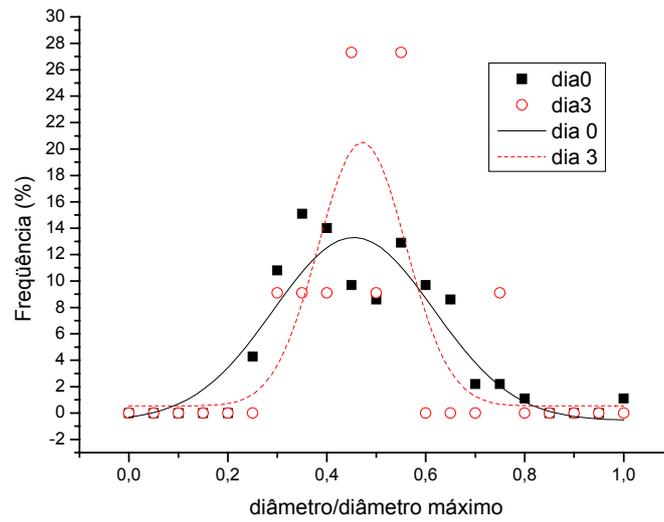
6.3.4. EHS Enriquecido em cálcio e vitaminas

Pela Figura 16 e através dos valores de sigma apresentados na Tabela 9, nota-se que com a adição de cálcio e vitaminas houve um aumento da heterogeneidade de tamanhos das micelas (maior sigma) nas amostras inicialmente avaliadas, heterogeneidade esta que se mantém ao final de 10 dias na amostra conservada a 4°C (Figura 16a). Este efeito parece ser atribuído a adição de vitaminas, já que amostra 3 também apresenta um aumento no valor de sigma no início do processo de análise.

A 4°C, as amostras permaneceram estáveis e o enriquecimento tanto de cálcio quanto de vitaminas não provocou alteração no tamanho das micelas durante o prazo de validade. A 25°C, não se observa tal aumento de heterogeneidade da emulsão, tendo esta inclusive se apresentado mais homogênea (menor sigma), porém com um diâmetro médio ligeiramente superior ao inicialmente determinado.



(a)



(b)

Figura 16 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 4 a 4°C (a) e a 25°C (b).

6.3.5 Conclusões Preliminares

A armazenagem a 4°C leva a uma maior homogeneidade da emulsão ao longo do tempo, não apresentando alterações significativas nos parâmetros da distribuição do tamanho das micelas, fato que indica que esta temperatura é adequada à armazenagem dos produtos por 10 dias.

A adição de cálcio a 25°C, promoveu um aumento no diâmetro médio das micelas, demonstrando que a perda de estabilidade.

A simples adição de vitaminas promoveu uma distribuição inicial mais alargada para o tamanho das micelas da emulsão, o que pode ser encarado como uma maior heterogeneidade do sistema. A adição de vitaminas apresenta alterações similares às daquelas do leite sem enriquecimento a 25°C.

6.4 Resultados com EHS Orgânico Ecobras

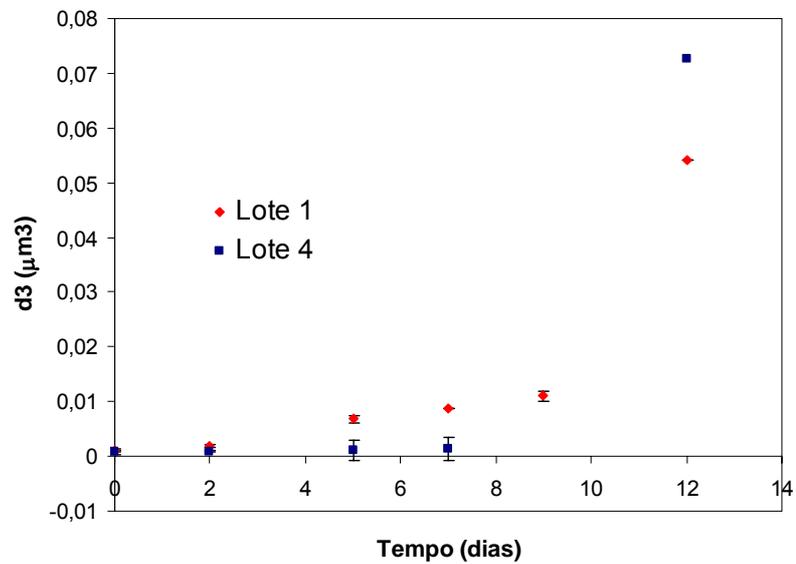
Para melhor avaliarmos os efeitos do enriquecimento na estabilidade do EHS, o extrato utilizado foi um produto orgânico sem a adição de nenhum outro ingrediente (apenas soja e água), estabilizante e/ou conservante.

O EHS orgânico da Ecobras foi enriquecido segundo planejamento experimental proposto tendo sido gerados 17 diferentes ensaios. Estes ensaios foram distribuídos aleatoriamente em 4 lotes distintos. Foi analisada a perda na estabilidade de cada ensaio ao longo do prazo de validade de 15 dias e ainda a perda da estabilidade do EHS puro (Branco).

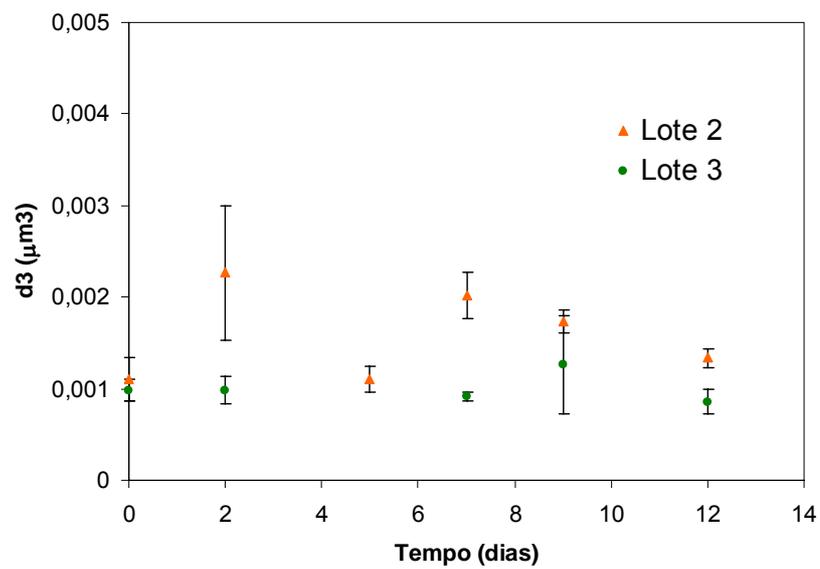
6.4.1. Avaliação dos lotes usados

O lote de EHS influenciou a distribuição do tamanho de micelas, bem como no processo de envelhecimento da emulsão. Na Figura 17 é possível perceber a heterogeneidade do comportamento entre os lotes de fabricação durante o armazenamento, apesar de inicialmente ($t = 0$ dias) os lotes se apresentarem muito similares, com diâmetro médio normalizado de 0,996 e desvio padrão de 0,0036.

Este comportamento heterogêneo durante a armazenagem dificulta a comparação entre os ensaios, já que não foi possível usar um único lote durante todo o estudo. Tal fenômeno pode ser devido ao uso de diferentes lotes de soja com variabilidade do fornecedor, plantio ou forma e tempo de armazenagem do material. É possível que outros compostos da leguminosa sejam mais ou menos extraídos na prensagem dos grãos, afetando o modo como a emulsão formada se comporta durante o armazenamento da mesma.



(a)



(b)

Figura 17 - Variação do d^3 em função do tempo: (a) Lote 1 e 4, (b) Lote 2 e 3.

A perda da estabilidade foi mais acentuada nos Lotes 1 e 4, onde o aumento do volume da micela se deu de forma exponencial ao longo do tempo

de análise (Tabela 10) o que caracteriza o fenômeno de coalescência. Já o volume das micelas dos Lotes 2 e 3 ficou praticamente constante ao longo do tempo avaliado.

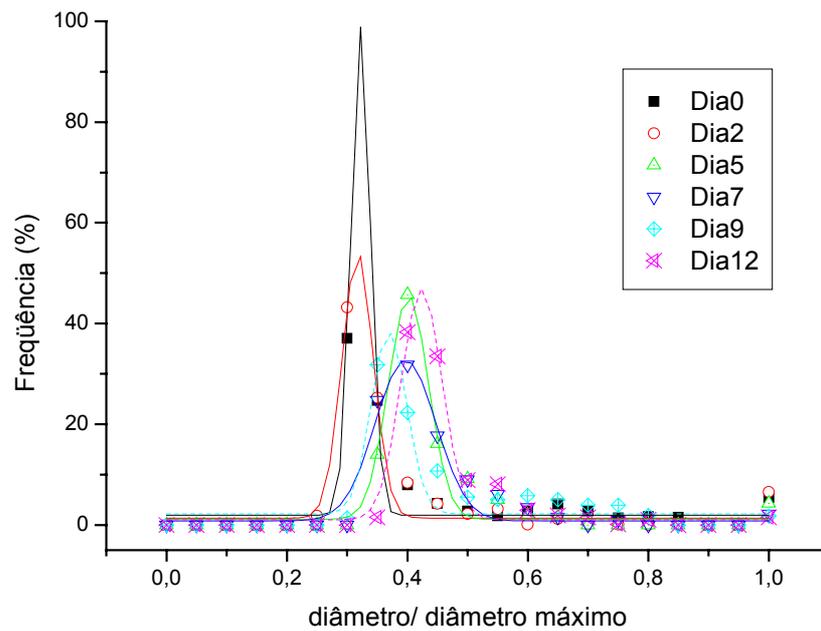
Tabela 11 – Equações de ajuste da variação do d^3 com o tempo para cada Lote de EHS.

Amostra	Fabricação	Validade	Equação	R ²
Lote 1	10/3/2008	25/3/2008	$d^3 = 0,0011 \exp(0,3095t)$	0,9642
Lote 2	31/3/2008	15/4/2008	$d^3 = 2 \cdot 10^{-07}t + 0,0016$	
Lote 3	28/4/2008	13/5/2008	$d^3 = -3 \cdot 10^{-07}t + 0,001$	
Lote 4	26/5/2008	10/6/2008	$d^3 = 0,0004 \exp(0,3539t)$	0,7434

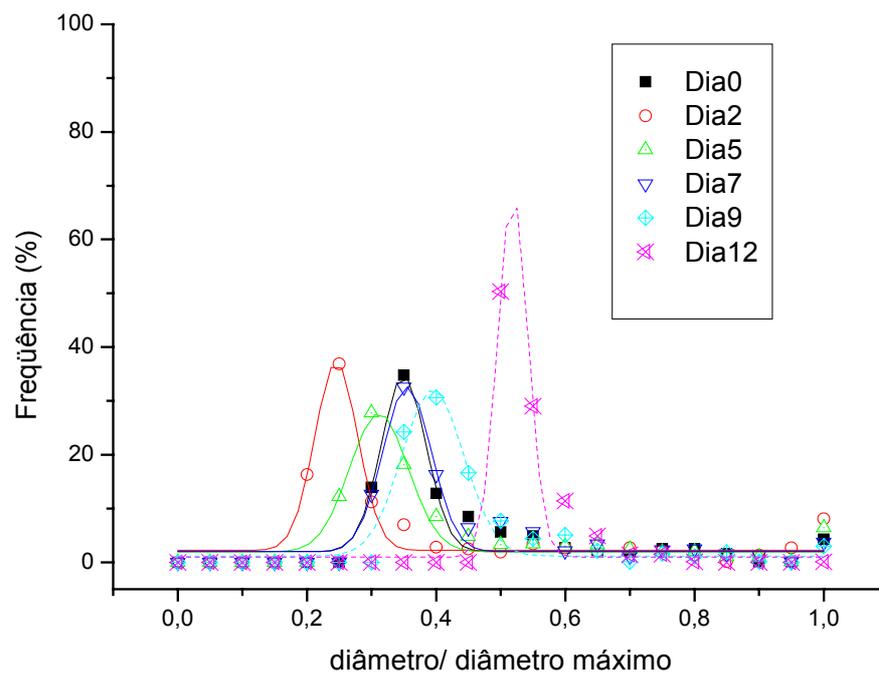
O simples fato de enriquecer o EHS com o cálcio e as vitaminas levou a uma modificação na distribuição de tamanho das micelas no tempo inicial quando comparada ao EHS puro (Figura 18). Também, pode-se verificar na Tabela 11 que as amostras de EHS puro e do enriquecido apresentaram um aumento no tamanho de suas micelas durante o tempo de validade (15 dias).

Tabela 12 - Valores de $d_{\text{médio}}$ e do desvio para o EHS enriquecido e puro

	EHS enriquecido		EHS puro	
	$d_{\text{médio}}$	desvio	$d_{\text{médio}}$	desvio
dia 0	0,35	0,07	0,32	0,03
dia 2	0,25	0,07	0,32	0,05
dia 5	0,31	0,09	0,40	0,07
dia 7	0,36	0,08	0,40	0,10
dia 9	0,40	0,10	0,37	0,06
dia 12	0,52	0,05	0,42	0,07



(a)



(b)

Figura 18 - Distribuição do tamanho de micelas: 2º Lote - (a) EHS puro; (b) EHS enriquecido com 15% cálcio, 15% de vitamina C e 15% vitamina D

O acompanhamento por períodos mais prolongados e o enriquecimento com outras concentrações de cálcio e vitaminas tornam-se, portanto parâmetros fundamentais para avaliar qual o mecanismo de perda da estabilidade destes produtos, EHS enriquecido com cálcio e vitaminas e sem enriquecimento, visando uma formulação adequada à manutenção da vida de prateleira dos mesmos.

6.4.2 - 1º Lote

6.4.2.1 Influência do cálcio em baixas concentrações de vitaminas (6%):

A adição de cálcio levou a um processo de desestabilização do EHS por difusão molecular (aumento linear do valor de d^3 com o tempo de amostragem), conforme apresentado na Figura 19 e na Tabela 12.

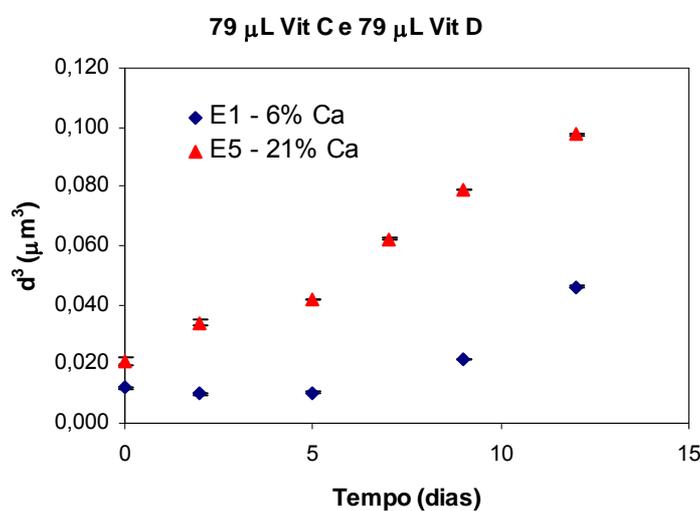


Figura 19 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 1 e 5, Lote 1

Tabela 13– Equações de ajuste da variação do d^3 com o tempo para o Lote 1.

	Equação	R²
Ensaio 1	$d^3 = 0,0027 t + 0,0049$	0,7343
Ensaio 5	$d^3 = 0,0064 t + 0,0183$	0,9772
Ensaio 9	$d^3 = 0,0004 t + 0,0804$	
Ensaio 15	$d^3 = 0,0023 t + 0,0619$	0,9774

No ensaio 5, Figura 20, o EHS enriquecido em 21 % de cálcio apresentou um crescimento em 25% no tamanho das suas micelas. Além disso, apresentou um grande aumento (167%) no valor de sigma ao longo da análise o que indica que as micelas que eram em sua maioria de tamanho uniforme, passaram a apresentar uma grande variância nos seus tamanhos.

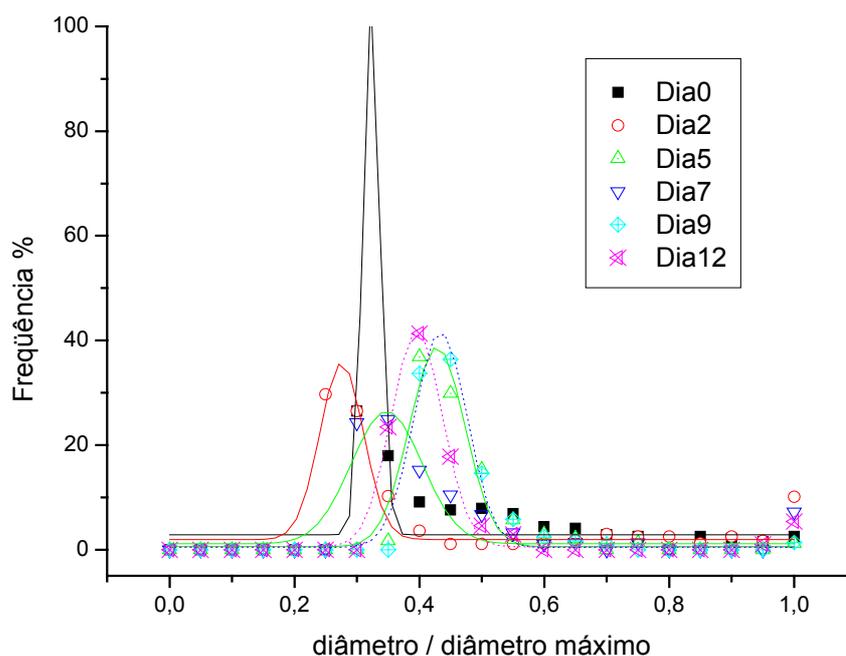


Figura 20 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 5

6.4.1.2 Influência do cálcio em concentrações de vitaminas de 15%:

O mecanismo de perda de estabilidade não se modifica com a alteração na concentração de vitaminas, prevalecendo o fenômeno de difusão molecular, conforme é visto na Tabela 12. Muito provavelmente a perda de estabilidade é ocasionada pela adição de íons cálcio e não pela adição de vitaminas, pela comparação com o ensaio 9, o qual demonstrou ser estável ao longo do tempo de análise.

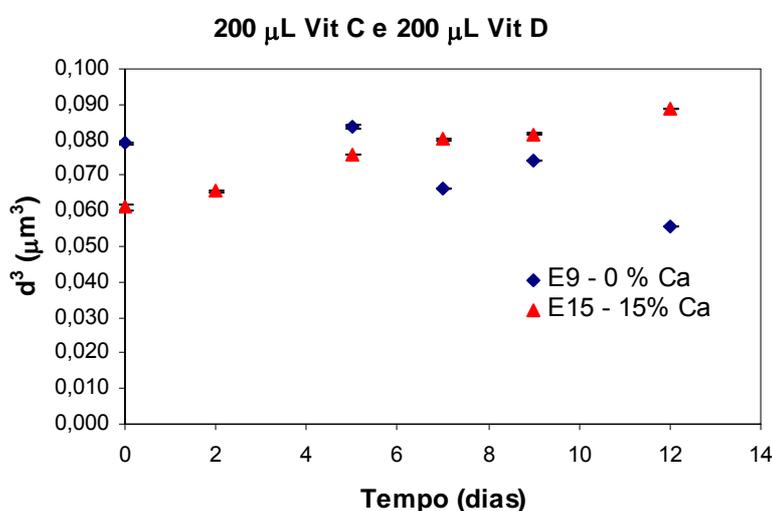


Figura 21 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 9 e 15, Lote 1

O ensaio 9 (Figura 22) sem adição de cálcio permaneceu estável durante a amostragem com uma redução de 20% no valor da dispersão, isto é as micelas com maior homogeneidade de tamanhos. Em contra partida, o ensaio 15 (Figura 23), enriquecido em 15% de cálcio, sofreu um aumento de 10% no tamanho de suas micelas e a dispersão de tamanhos das micelas se manteve constante.

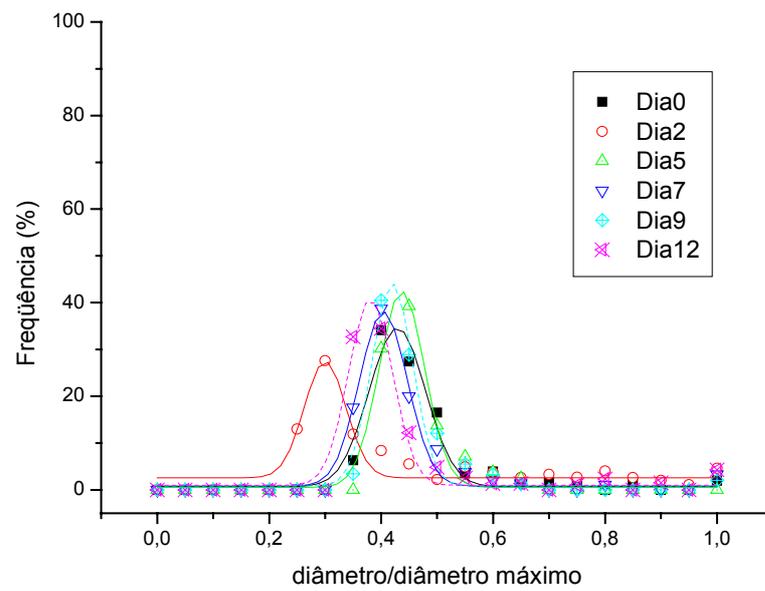


Figura 22 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 9

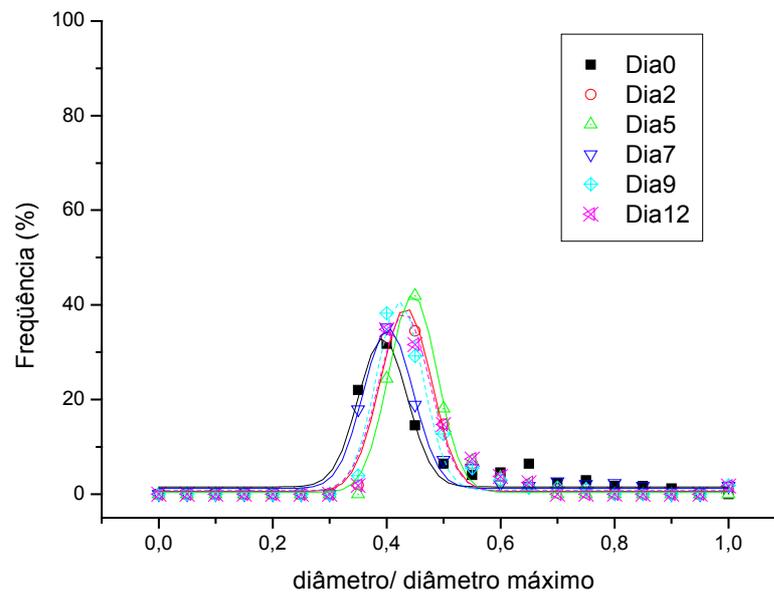


Figura 23 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 15

6.4.3 - 2º Lote

6.4.3.1 Influência do Cálcio (validação dos resultados anteriores):

A adição de cálcio demonstrou ter efeito no diâmetro médio da emulsão no instante zero, concordando com o comportamento observado no lote anterior. A adição de cálcio levou a um processo de desestabilização do EHS quando comparado com a amostra sem cálcio (branco do 2º lote 2) com idêntica observação para o 1º lote analisado.

O perfil de desestabilização pode ser validado com os dados deste lote tanto para a mínima como para a máxima concentração de cálcio adicionadas neste trabalho. Este segue um processo de difusão molecular denotado pelo aumento linear do valor de d^3 com o tempo de amostragem (Figura 24)

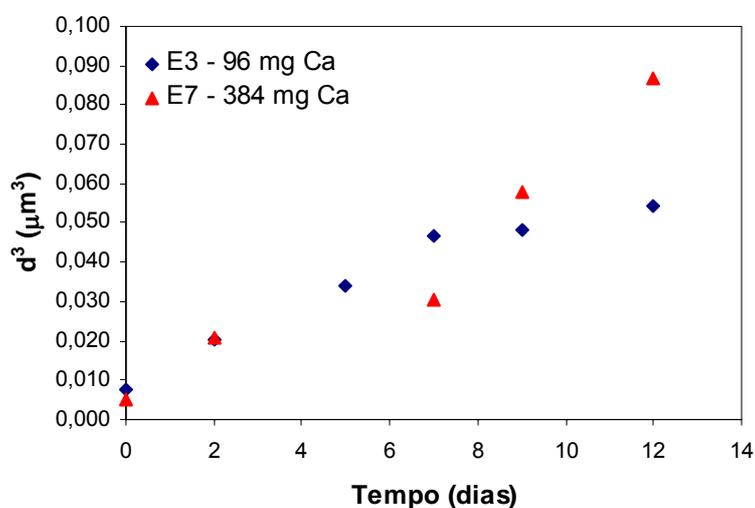


Figura 24 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 3 e 7, Lote 2

6.4.3.2 Influência da concentração de Vitamina C

Os ensaios 12 e 16 deste lote (Figura 25 e 26), foram enriquecidos com a mesma quantidade de cálcio e de vitamina D (15%), já suas concentrações de vitamina C foram respectivamente, 30 e 15%.

Considerando que as influências conferidas pelo cálcio e pela vitamina D são idênticas em ambas as amostras, já que a concentração adicionada destes compostos foi a mesma, é possível observar que o aumento da adição de vitamina C leva a uma aceleração no processo de perda de estabilidade provocado pelo fenômeno de coalescência. Na verdade, em concentrações mais baixas de vitamina C (ensaio 16), durante o tempo de amostragem efetuado, não era possível ainda determinar qual o mecanismo envolvido. (Tabela 13).

Tabela 13 - Equações do aumento do d^3 durante a validade do Lote 2.

	Equação	R²
Ensaio 3	$d^3 = 0,004 t + 0,0121$	0,9422
Ensaio 7	$d^3 = 0,0062 t + 0,0028$	0,909
Ensaio 12	$d^3 = 0,0274 \exp(0,0701 t)$	0,9634
Ensaio 16	$d^3 = 0,0186 \exp(0,1134 t)$ $d^3 = 0,0029 t + 0,0261$	0,9662 0,9715

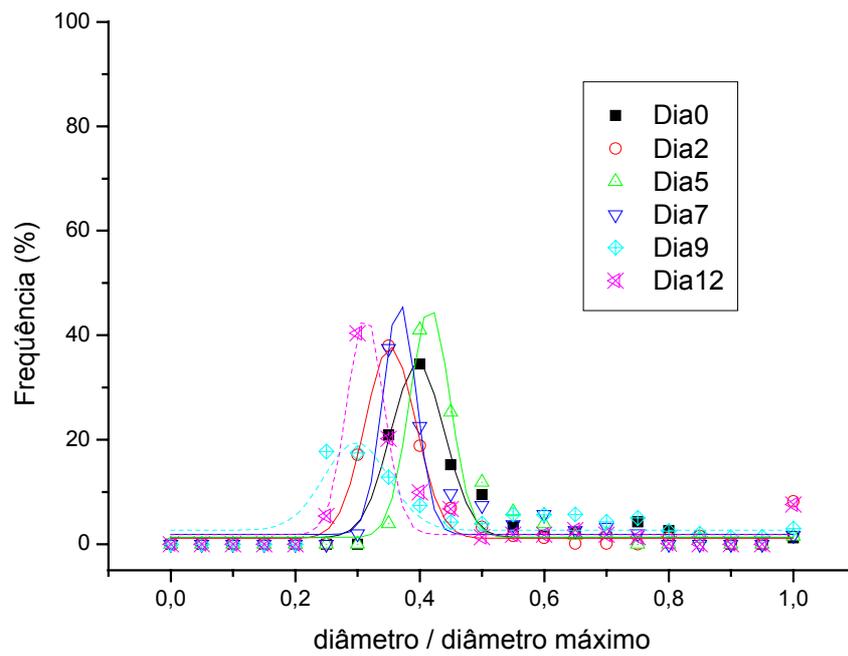


Figura 25 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 12

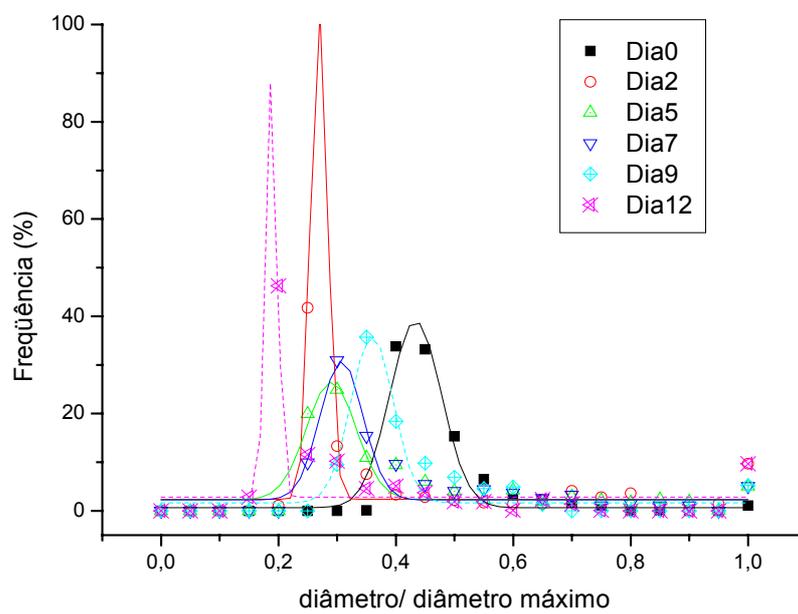


Figura 26 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 16

6.4.4 - 3º Lote

Neste lote, todos os ensaios apresentaram um aumento linear no tamanho de suas micelas ao longo do prazo de validade (Tabela 14)

Tabela 14 - Equações do ajuste da variação de d^3 com o tempo para o lote 3.

	Equação	R^2
Ensaio 2	$d^3 = 0,0036 t + 0,0055$	0,9341
Ensaio 6	$d^3 = 0,0027 t + 0,0018$	0,8828
Ensaio 13	$d^3 = 0,0007 t + 0,0012$	0,9614
Ensaio 17	$d^3 = 0,0003 t + 0,0003$	0,7893

6.4.4.1 Influência do Cálcio:

Os ensaios 2 e 6 se diferem apenas na concentração de cálcio sendo respectivamente de 6 e 21%. A simples adição de cálcio levou a um ligeiro aumento (36%) no diâmetro médio da emulsão no instante zero, fato já observado no 1º lote analisado.

A adição de cálcio levou a um processo de desestabilização do EHS quando comparado com a amostra sem cálcio (branco do respectivo lote), sendo o perfil de desestabilização idêntico tanto a mínima como para a máxima concentração de cálcio adicionadas neste trabalho: segue um processo de difusão molecular denotado pelo aumento linear do valor de d^3 com o tempo de amostragem (Figura 27 e Tabela 14).

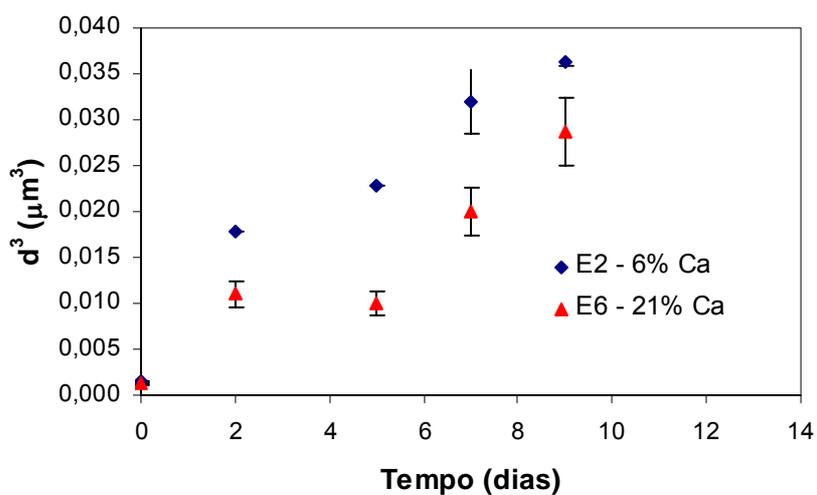


Figura 27 - Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 2 e 6, Lote 3

6.4.4.2 Influência da adição de ambas as vitaminas (C e D)

Neste lote o ensaio 9 foi enriquecido apenas com 15% de cada vitamina, não tendo sido enriquecido em cálcio. Aparentemente a adição de vitaminas não muda o padrão de perda de estabilidade, mas modifica o tamanho médio das micelas (Figura 28).

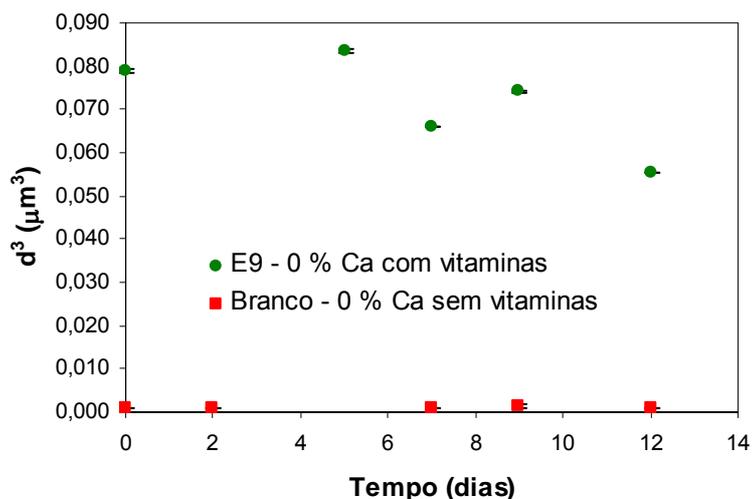


Figura 28 - Variação do d^3 com o tempo: Ensaios 9 e Branco, Lote 3

6.4.4.3 Influencia da Vitamina D:

Nos ensaios 13 e 17 (Figura 29 e 30), ambos enriquecidos em 15% de cálcio e vitamina C, a perda da estabilidade foi idêntica, concluindo-se assim que o enriquecimento em 15% de vitamina D do ensaio 17, não colaborou para aumentar a perda da estabilidade do EHS. O mecanismo de perda de estabilidade não se modifica prevalecendo o fenômeno de difusão molecular (Figura 31, Tabela 15).

Muito provavelmente a perda de estabilidade observada é ocasionada pela adição de íons cálcio e não pela adição de vitaminas. Este fato é corroborado pelos resultados obtidos com EHS comerciais, onde a adição de vitaminas quase não apresentou alterações no perfil de estabilidade da emulsão.

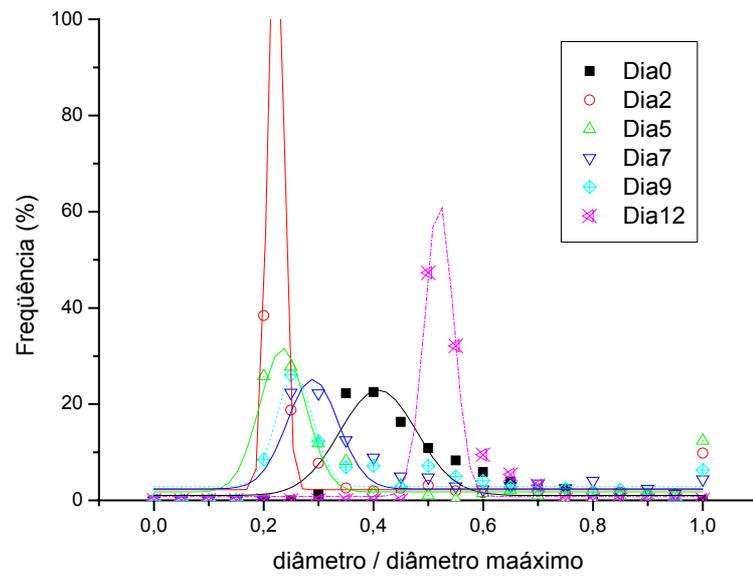


Figura 29 Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 13

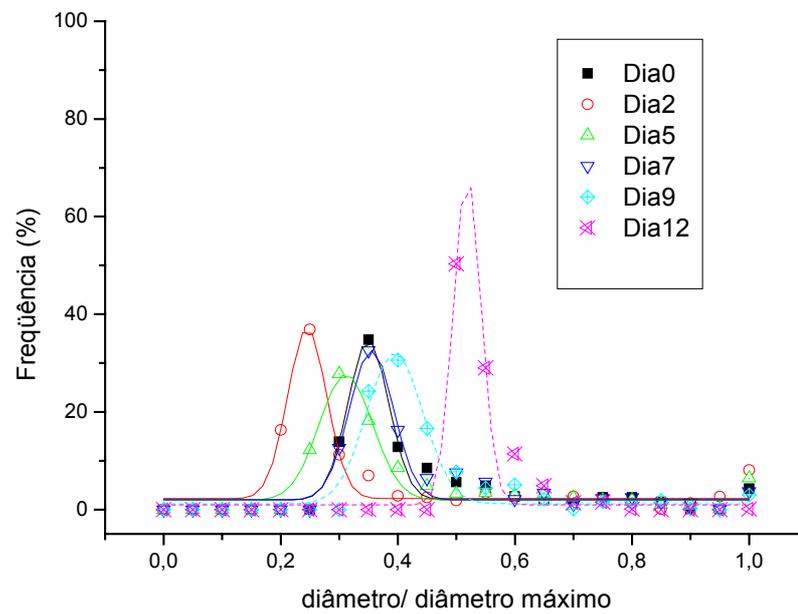


Figura 30 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 17

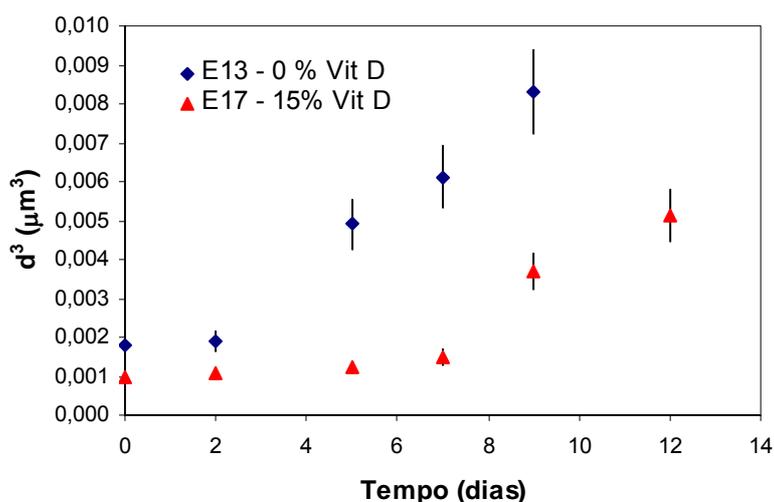


Figura 31 Variação de d^3 com o tempo de análise: Ensaios 13 e 17, Lote 3

6.4.5 - 4º Lote

6.4.5.1 Influência do Cálcio:

Comparando-se os ensaios do 4º Lote, pode-se concluir que em todos os casos houve um aumento no $d_{\text{médio}}$ ao longo do experimento o que caracteriza um aumento no tamanho das micelas (Figuras 32 a 34). No ensaio 4, o EHS enriquecido em 6% de cálcio apresentou um aumento no $d_{\text{médio}}$ em 16%, o EHS do ensaio 8 enriquecido em 21% de cálcio obteve um aumento do $d_{\text{médio}}$ de 17% e o EHS do ensaio 10 enriquecido em 30% de cálcio teve seu $d_{\text{médio}}$ aumentado de 64%.

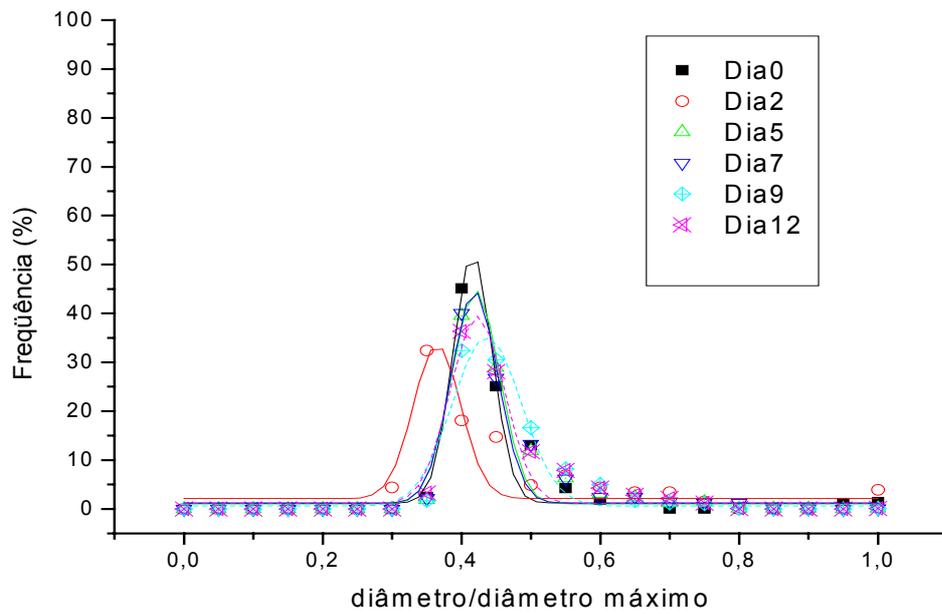


Figura 32 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 4

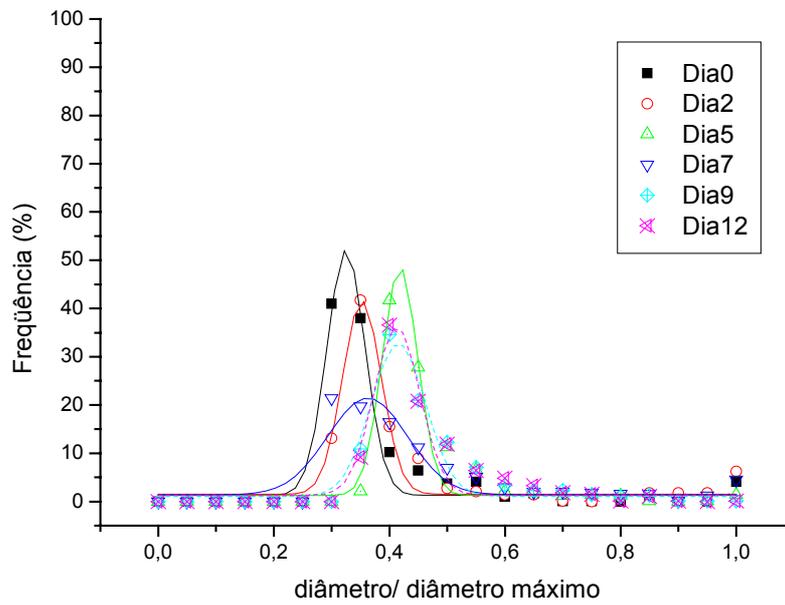


Figura 33 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 8

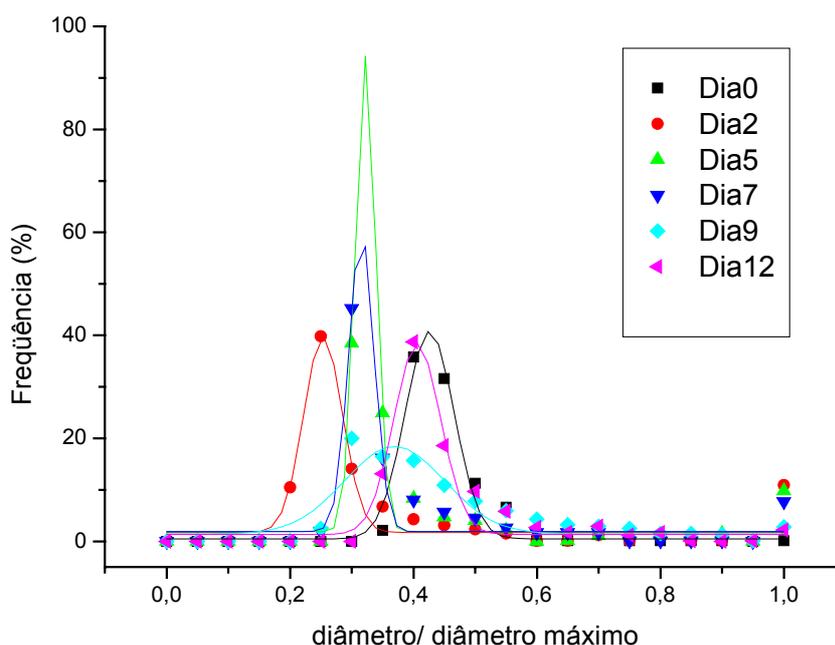


Figura 34 - Distribuição do tamanho de micelas da Amostra 10

6.4.5.2 Influência da adição de ambas as vitaminas (C e D)

Comparando-se os ensaios 11 e 14, ambos enriquecidos em 15% de cálcio e com diferentes concentrações de vitaminas não tiveram os valores de sigma e da média da distribuição alterados. Porém, as Figuras 35 e 36 mostram que no ensaio 11 o EHS sofreu uma maior variabilidade no valor de $d_{\text{médio}}$ (83%), já para o EHS do ensaio 14 o valor de $d_{\text{médio}}$ variou com redução de 7% sendo essa considerada estável.

Ao analisarmos a distribuição do tamanho das micelas em ambos os ensaios houve um aumento na dispersão destas distribuições uma vez que o valor de sigma aumentou 44% no ensaio 11 e de 33% no ensaio 14, sendo o

EHS do ensaio 14 também mais estável quando leva-se em consideração a homogeneidade dos tamanhos das micelas.

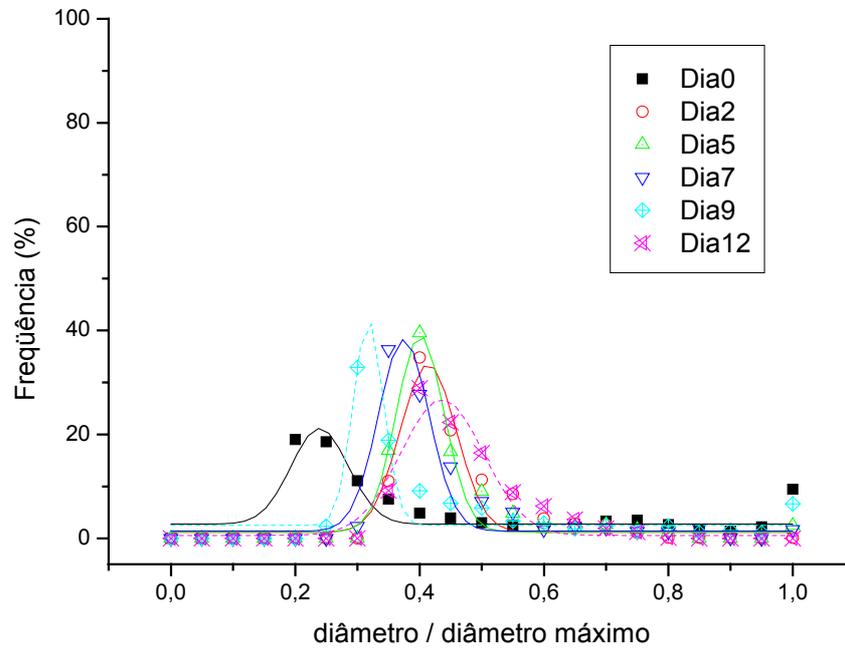


Figura 35 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 11

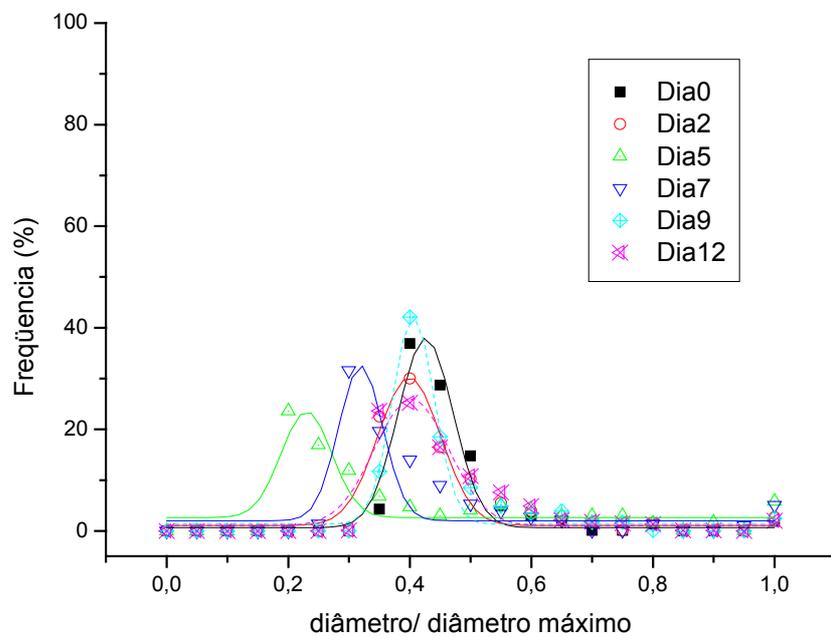


Figura 36 - Distribuição do tamanho de micelas do Ensaio 14

6.4.6 Conclusão Geral

O mecanismo de perda de estabilidade por difusão molecular parece ser característico das amostras com adição de cálcio independente do tipo de perda de estabilidade que se estabeleça no EHS controle, i.e., apesar dos lotes apresentarem comportamentos distintos o mecanismo é idêntico quando se adiciona cálcio.

Aparentemente a adição de vitaminas não muda o padrão de perda de estabilidade, mas modifica o tamanho médio das micelas.

Através da análise do gráfico de pareto (Figura 37) a adição conjunta de cálcio e vitamina C mostrou ser um efeito significativo ($p < 0,05$) no processo de perda de estabilidade do EHS.

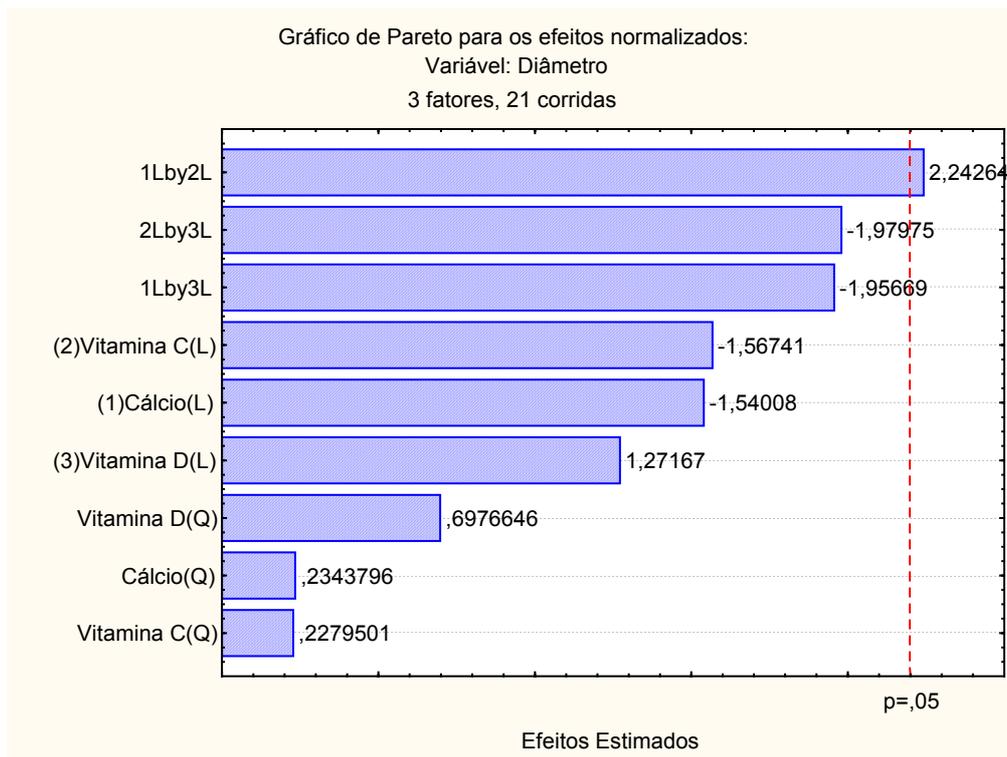


Figura 37 - Análise dos efeitos normalizados

6.5 Reologia

6.5.1 Influência da Taxa de Deformação na Viscosidade

Os mesmos resultados (Figura 37) foram relatados por Richardson (1953) no trabalho (The flow of emulsions). Esse autor concluiu que a viscosidade aparente das emulsões, com as mesmas concentrações, é inversamente proporcional a este diâmetro médio. Conseqüentemente, as variações de viscosidade de uma emulsão com a taxa de cisalhamento e a concentração das micelas ser explicada em termos do trabalho realizado em distorcer das micelas e no deslizamento de uma pela outra.

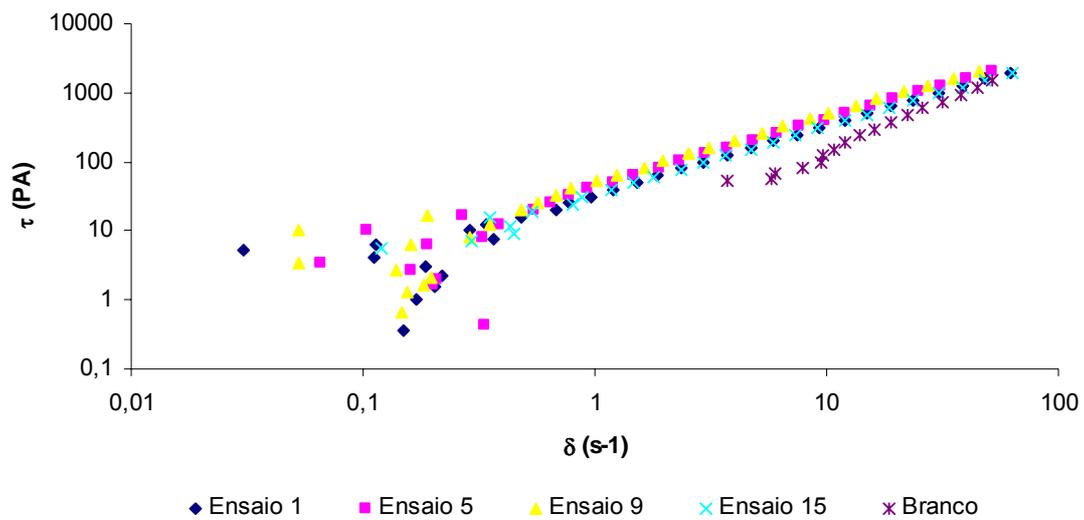
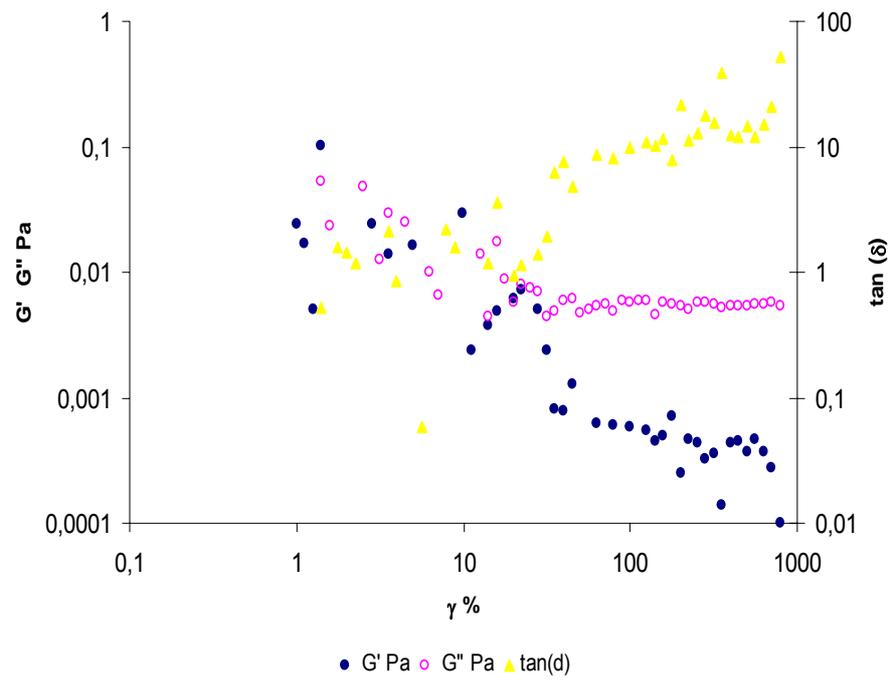


Figura 38- Viscosidade das amostras *versus* taxa de deformação

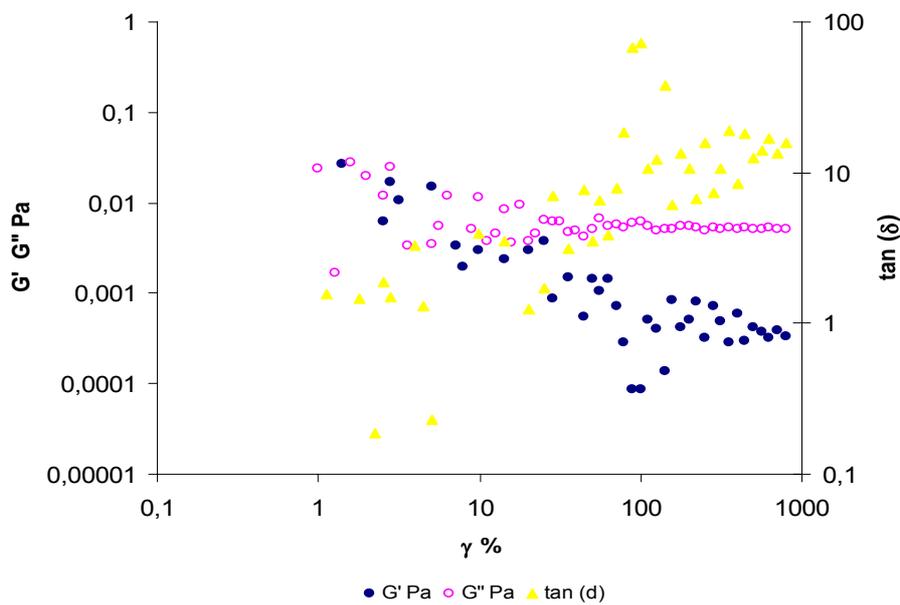
6.5.2 Viscoelasticidade

Comparando-se o EHS puro com as amostras enriquecidas (Figura 38) pode-se perceber que o enriquecimento não causou alterações na reologia das amostras. Além disso, as propriedades viscosas ficaram constantes (G'')

E suas propriedade elásticas G' decresceram de forma acentuada, sendo assim a parte viscosa mais importante que a parte elástica, como pode-se comprovar com o aumento da $\tan \delta$.



(a)



(b)

Figura 39 – Influência da deformação na estabilidade da amostra enriquecida em 15% de cálcio e vitaminas C e D (a) e da amostra pura (b)

CAPÍTULO 7

7.1. CONCLUSÕES

EHS puro comercial mantido a 25°C apresentou uma redução no tamanho de suas micelas denotando uma modificação da estrutura da emulsão semelhante à observada pelo ensaio 9 (0% Ca; 3,4 mg / 100mL de vitamina C; 0,38 µg / 100 mL de vitamina D) que permaneceu estável durante a amostragem com uma redução de 12% no valor do seu diâmetro médio.

Na amostra de EHS comercial, a adição de cálcio promoveu uma distribuição mais dispersa do tamanho das micelas da emulsão, o que pode ser encarado como uma maior heterogeneidade do sistema, fato este também verificado nos ensaios 5 (aumento de 167% na dispersão) e 6 (aumento de 133% na dispersão).

A adição de cálcio levou a um processo de desestabilização do EHS por difusão molecular (aumento linear do valor de d^3 com o tempo de análise). Este processo parece ser ocasionado pela adição de íons cálcio e não pela adição de vitaminas.

No EHS comercial enriquecido em vitaminas, a adição destas apresentou alterações similares àsquelas do leite sem enriquecimento, fato este comprovado nos ensaios com EHS da Ecobras onde vitamina D (ensaio 17) não colaborou para aumentar a perda da estabilidade do EHS.

O aumento da adição de vitamina C leva a uma aceleração no processo de perda de estabilidade provocado pelo fenômeno de coalescência, ocorrendo um aumento na heterogeneidade do tamanho das micelas.

Já o EHS comercial com a adição conjunta de cálcio e vitaminas promoveu um efeito diverso ao anteriormente observado, levando, porém, a diferenças menos significativas do que àquelas observadas com o produto original (sem enriquecimento), fato este observado quando se compara os ensaios 11 e 14, onde o enriquecimento com vitaminas favoreceu a estabilidade da emulsão.

O enriquecimento máximo do EHS sugerido que não provoca uma desestabilização é definido abaixo:

- ✓ 15% de cálcio, uma vez que, com 21%, apesar do tamanho das micelas ser pouco alterado em relação ao EHS puro, ocorreu um grande aumento na dispersão do tamanho das micelas.
- ✓ 15% de vitamina C: altas concentrações de vitamina C levaram ao crescimento das micelas que apresentava comportamento linear (difusão molecular) para exponencial (coalescência).
- ✓ 30% de vitamina D: altas concentrações de vitamina D favoreceram a estabilidade do EHS. Concentrações maiores não foram estudadas, pois este enriquecimento iguala a concentração desta vitamina encontrada no leite bovino (0,8 µg/100mL).

O enriquecimento do hidrolisado solúvel de soja pode ser um processo satisfatório, se adequadamente formulado, para manter suas propriedades físico-químicas, além das nutricionais, tornando-se assim um excelente substituto para o leite bovino.

7.2. SUGESTÕES

Estudos reológicos deverão ser realizados futuramente de forma a avaliar os extratos solúveis de soja enriquecidos de cálcio e vitaminas em diferentes temperaturas, frequências e taxas de deformação além do efeito de tixotropia.

Análise sensorial do EHS enriquecido.

Além disso, estudos do aumento do tempo de prateleira de 15 dias para 30 dias utilizando conservantes e estabilizantes naturais e orgânicos.

CAPÍTULO 8

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNIELSEN, Relatório Executivo de Notícias, **ACNielsen Global Services** Dezembro, 2004

BRINK, E.J.; DEKLER, P.R.; VAN BERESTEIJN, E.C.; BEYNEM, A.C. Bioavailability of magnesium and calcium from cow's milk and soya-bean beverage in rats. **British Journal Nutrition**, n. 68, p. 271-282, 1992.

BUZINARO, E.F.; ALMEIDA, R.N.A.; MAZETO, G.M.F.S. Biodisponibilidade do Cálcio Dietético. **Arq Bras Endocrinol Metab** v 50 n 5, p. 852-861 , 2006

CASÉ, F.; ROSENTHAL, A.; MANTOVANI, D.; FELBERG, I., Produção de 'leite' de soja enriquecido com cálcio, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 25, v.1, p. 86-91, 2005.

CASSELLA A.R., COSTA F.P., ALBUQUERQUE F.C., CABRAL M.V. Caracterização de Emulsões Água em Óleo na Indústria do Petróleo por Calorimetria Exploratória Diferencial. In: **V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (V CBRATEC)**, 2006.

COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de minerais. **Nutrição PUCCAMP**, v. 10, n. 2, p. 87-98, 1997.

"Comparision of Particle Sizing Methods". <http://www.cpsinstruments.com/TechLibrary/CompareMethods.PDF>, (consultado em 21/06/2006).

DE ANGELIS, R. C. Alimentos de origem vegetal são saudáveis: verdades e alguns questionamentos. **Nutrição em Pauta**, ano X, n. 57, p. 30-34, 2002.

_____., *et al* ;A importância dos alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas; 2^a. edição; **Editora Atheneu**, São Paulo, 2005. Cap 31: Efeitos fisiológicos da soja, p. 169 - 170.

DELIZA, R.; SERNA SALDIVAR, S.; GERMANI, R.; BENASSI, V.T.; CABRAL, L.C. The effects of colored textured soybean protein (TSP) on sensory and physical attributes of ground beef patties. **Journal of Sensory Studies**, v. 17, n. 2, p. 121-132, 2002.

DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Uso da soja como feijão. In: MIYSAKA, S.; MEDINA, J.C. A soja no Brasil. Campinas: **ITAL**,. p. 847-9. 1981

_____.; SCATENA, L.; OLIVEIRA NETO, N.; DUATRE, G.G. The nutritive value of soy milk in malnourish children: a comparative study. **Jornal de Pediatria**, v.69, p.670-5, 1996.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Codex Alimentarius commission. Organically Produced Foods . Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1385e/a1385e00.pdf> Acesso em: abr. 2008.

FERREIRA, E. C., “Application of Image Analysis Techniques in Biotechnology, Waste Water Treatment and Food Technology”, **Biotec’98 Book of Abstracts**, 203, 1998.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 307 p

FREIRE G. M., DIAS, A.M.A, COELHO, M.A.Z. COUTINHO, J. A.P., MARRUCHO, I.M, Emulsões de Perfluorocarbonetos: Estabilidade e

Solubilidade de Gases, Relatório de Estágio da Licenciatura em Química ,
Universidade de Aveiro, 2003.

_____. Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis, **Journal of Colloid and Interface Science**, v.286, p. 224–232, 2005.

FUCHS, R. H. B.; BORSATO, D.; BONA, E.; HAULY, M. C. O.; "Iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.25 n.1, 2005.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p. 1401-1412, 1995.

GORDON.J; Como funciona a vitamina C, **HowStuffWorks**. Publicado em 01 de abril de 2000 (atualizado em 06 de maio de 2008) <http://saude.hsw.uol.com.br/vitamina-c1.htm> (02 de novembro de 2008)

HEANEY, R.P.; DOWELL, M.S.; RAFERTY, K.; BIERMAN, J. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1166-9, 2000.

"Image Processing Toolbox, For Use With Matlab", The Math Works Inc., version 2, (1997).

"Image-Pro Plus" Reference Guide for Windows™ The Proven Solution for Image Analysis, 2001 Media Cybernetics, Inc. (1993).

IOM/FNB. "Opportunities in the Nutrition and Food Sciences", ed. P.R. Thomas and R. Earl, p. 109. **Institute of Medicine/National Academy of Sciences**, National Academy Press, Washington, D.C., 1994.

KATZ, F. Research priorities more toward healthy and safe. **Food Technology**, v. 54, n. 12, p. 42-44, 2000.

KAGAWA, A. ed. Standard table of food composition in Japan. Tokyo: University of Nutrition for women, p. 104-105, 1995.

KRAUSE, M.V.; MAHAN, L.K. 1991. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 7ed. Roca. 978p.

LAJOLO, F. M, Alimentos Funcionais. Uma Visão Geral In: DE ANGELIS, R. C., A importância dos alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas; 2ª. edição; Editora Atheneu c. 33,: p.175 -181, 2005.

LIFSHITZ, I. M., SLYOZOV, V. V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions, **J. Phys. Chem. Solids** , v.19, p. 35–50, 1961.

LYSSANT, K., Emulsions and Emulsions Technology, Surfactant Science Series, Volume 6, New York, 1974.

MACHADO, J.C.V. Reologia e Escoamento de Fluidos: ênfase na indústria do petróleo. Engenho Novo, RJ: Interciência, 257p, 2002.

McCLEMENTES, D. J., Food Emulsions principles, practice, and techniques, London, **Food Science Biochemistry Food Chemistry**, 186, 249, 1999.

MORAIS, A.A.; SILVA, A.L. A soja: suas aplicações. Rio de Janeiro: **Meds**, p. 259 1996

MOSQUIN, M.C.A.; PEIXOTO, E.C.; MAGALHÃES, G.; MONTEIRO, R.R. Enriquecimento com Cálcio do leite submetido a Pasteurização. Boletim Informativo Purac, 1996.

NEVEN, L. Isoflavones – an overview of benefits for health and market. **Agro-Food Industry Hi- Technology**, p. 39-41, 1998.

PEREIRA FILHO, D., FURLAN, S.A., Prevalência de Intolerância a Lactose em função da faixa etária e do sexo: Experiência do Laboratório Dona Francisca, Joenville (SC), **Revista Saúde e Ambiente**, v.5 n.1 p.25 , 2004.

PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R., Tecnologia Farmacêutica, Vol. III, 4ª Ed., **Fundação Calouste Gulbenkian**, Lisboa, 1995.

RIAZ, M.N. Soybeans as functional foods. **Cereal Foods World**, v. 44, n. 2, p. 88-92, 1999.

RICHARDSON, E.G. The Flow of Emulsions, **Journal of Colloid Science**, v.8; p.367-373, 1953.

ROBERFROID, M. B. Concept in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, (Suppl.), v. 129, p. 1398-1401, 1999.

ROERDINK. J. B. T. M., “An Introduction to Digital Image Processing. In: Digital Image Analysis of Microbes”, eds. **Wilkinson, M.H.F. & Schutt, F.**, John Wiley & Sons, UK, ISBN 0-471-97440-4, 1998.

SALOMÃO, C. C., Mercado de orgânicos no brasil e exterior, **arScientia**, 2006, http://www.arscientia.com.br/materia/ver_materia.php?id_materia=268#
Acesso em 22/10/2008.

SEVÁ- PEREIRA, A. Malabsorção de lactose do adulto em uma população brasileira, tese de Doutorado, Faculdade de ciências Médicas, **UNICAMP**, 1981.

_____, Milhões de Brasileiros adultos não toleram um copo de leite, *GED (gastroenterol. endosc. dig)*; v.15, n.6, p.196-200, 1996.

SLIGHTOWLER, H.; DAVIES, J. The Vegan Dairy. **Nutrition and Food Science**, v. 2, n. 2, p. 3153-157, 1998.

STEFFE, J., "Rheological methods in Food Process Engineering", Freeman Press, East Lansing-USA, 1996.

TREVINO, L., SOLÉ-VIOLAN, L., DAUMUR, P., DEVALLEZ, B. POSTEL, M., RIESS, J. G., Molecular Diffusion in Concentrated Fluorocarbon Emulsions and its Effect on Emulsion Stability, **New. J. Chemistry**, v. 17, p. 275-278, 1993.

VECHT-LIFSHITZ S. E., Ison, A. P., "Biotechnological Applications of Image Analysis: Present and Future Prospects", *Journal of Biotechnology*, v. 23, p. 1-18, 1992.

WILKINSON, M. H. F., "Automated and Manual Segmentation Techniques in Image Analysis of Microbes, In: Digital Image Analysis of Microbes", eds. Wilkinson, M.H.F. & Schutt, F., John Wiley & Sons, UK, ISBN 0-471-97440-4, 1998.

WILLER H, YUSSEFI M., The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2006 IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements), **Bonn Germany & FiBL (Research Institute of Organic Agriculture), Frick, Switzerland**, 213 p. 2006.

XU, X.; WANG, H.; MURPHY, P.A.; COOK, L.; HENDRICH, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 825-832, 1994.

YAZICI, F.; ALVAREZ, V.B.; HANSEN, P.M.T. Fermentation and Properties of Calcium-fortified Soy Milk Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, p. 457-461, 2006.

<http://saude.hsw.uol.com.br/vitamina-c.htm>, em 19/10/2008.

http://www.emedix.com.br/vit/vit009_1f_vitaminac.php, em 19/10/2008.

http://www.emedix.com.br/vit/vit003_1f_vitaminad.php, em 19/10/2008.

<http://www.svb.org.br/depmeioambiente/pdfs/Leite.pdf>, em 19/10/2008.