



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INARA SANCHES LOPES

**ESTABILIDADE TÉRMICA DE BEBIDAS PROTEICAS VEGETAIS MISTAS
SUBMETIDAS À TRATAMENTO UHT EM SISTEMA DE TROCA INDIRETA
DE CALOR**

**THERMAL STABILITY OF HYBRID PLANT PROTEIN BEVERAGES
SUBJECTED TO UHT TREATMENT IN INDIRECT HEAT EXCHANGE
SYSTEM**

CAMPINAS
2023

INARA SANCHES LOPES

**ESTABILIDADE TÉRMICA DE BEBIDAS PROTEICAS VEGETAIS MISTAS
SUBMETIDAS À TRATAMENTO UHT EM SISTEMA DE TROCA INDIRETA
DE CALOR**

**THERMAL STABILITY OF HYBRID PLANT PROTEIN BEVERAGES
SUBJECTED TO UHT TREATMENT IN INDIRECT HEAT EXCHANGE
SYSTEM**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Dissertation presented to the School of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in FOOD SCIENCE.

Orientador: PROF. DR. GUILHERME MIRANDA TAVARES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA INARA SANCHES LOPES, ORIENTADA PELO PROF. DR. GUILHERME MIRANDA TAVARES.

CAMPINAS
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Sanches Lopes, Inara, 1987-
Sa55e Estabilidade térmica de bebidas proteicas vegetais mistas submetidas à
tratamento UHT em sistema de troca indireta de calor / Inara Sanches Lopes. –
Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Guilherme Miranda Tavares.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas vegetais. 2. Tratamento UHT. 3. Isolado proteico de ervilha. 4.
Castanha-do-pará. I. Tavares, Guilherme Miranda. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Thermal stability of hybrid plant protein beverages subjected to UHT treatment in indirect heat exchange system.

Palavras-chave em inglês:

Plant proteins

UHT treatment

Pea protein isolate

Brazil nut

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Guilherme Miranda Tavares [Orientador]

Marcelo Cristianini

Denise Fabiana Silvestre Becker-Almeida

Data de defesa: 17-08-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0003-3192-1689>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/6193487961050359>

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Miranda Tavares

Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP)

Dra. Denise Fabiana Silvestre Becker de Almeida

Ingredion Brasil Ingredientes Industriais Ltda

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação

AGRADECIMENTOS

Agradeço à espiritualidade por me mostrar as oportunidades, por nutrir a minha fé e autoconfiança que possibilitaram a realização deste projeto.

À Universidade Estadual de Campinas e a Faculdade de Engenharia de Alimentos pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À empresa Ingredion do Brasil pelo apoio à pesquisa, fornecimento de insumos e disponibilidade da estrutura que possibilitaram a continuidade do projeto mesmo nos períodos de pandemia.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme M. Tavares por toda a paciência, direcionamento, incentivo, suporte, atenção e disponibilidade ao longo de todo o período, e em meio a todos os desafios que a pandemia nos trouxe. Seu trabalho, conduta, conhecimento, foco e energia de realização são fontes de admiração, que me inspiram tanto no âmbito profissional quanto pessoal.

Sou grata à minha mãe Rosely e meu pai Sergio, por todo o suporte, inspiração, incentivo, amor e carinho, não somente neste período, mas durante toda a minha vida. Às minhas irmãs Vivian e Tissiane, por todo o apoio e por acreditarem em mim em todos os momentos. À minha prima Tatiana por estar tão presente e por todos os conselhos. À toda minha família pelo carinho e amor.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Química de Alimentos da FEA: Alane, Alisson, Álvaro, Anne, Danilo, Lauane, Lívia, Mariana, Rosemar e Regiane por toda a ajuda e apoio nos momentos presenciais de laboratório e à distância.

Aos meus queridos amigos Karen, Eduardo, Gabriela, Bruna, Amanda, Júlio, Dhanus, Tatiana, Carolina, Bárbara, Júlia, Joyce, Andréia, Leonardo, Yara, Luciana, Kellen, Flávia e Silvia por sempre me ouvirem e incentivarem nos momentos que mais precisei.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

As proteínas vegetais oriundas de leguminosas (*pulses*) e de castanhas são importantes aliadas na formulação de produtos isentos de proteínas de origem animal por poderem fornecer, quando combinadas, todos os aminoácidos essenciais em proporções adequadas. Contudo, há pouca informação disponível a respeito do comportamento destas proteínas durante o processamento e a estocagem dos produtos formulados, o que aumenta o empirismo no desenvolvimento de tais produtos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade de bebidas vegetais mistas contendo proteínas de ervilha e de castanha-do-pará com alegação de fonte e rico em proteínas, submetidas ao processamento UHT. Formulações combinando isolado proteico de ervilha amarela e pasta de Castanha-do-pará com teores proteicos totais de 3,0%, 4,5% e 6,5% foram submetidas ao processamento UHT por troca indireta de calor e avaliadas quanto à solubilidade proteica, viscosidade, tamanho de partículas e perfil de proteínas insolúveis. O processamento UHT, combinado com homogeneização, levou à uma redução significativa do material insolúvel e do tamanho de partículas das bebidas, em comparação com as formulações antes do tratamento UHT. Após 60 dias de armazenamento, as bebidas apresentaram manutenção do tamanho de partículas e aumento da viscosidade aparente, sobretudo nas formulações de bebidas armazenadas em condição refrigerada (5°C). Esse aumento foi maior nas formulações de maior teor de proteínas (4,5% e 6,5%). Em relação ao perfil eletroforético das proteínas presentes na fração insolúvel das bebidas, o mesmo perfil se manteve constante ao longo do período de armazenamento avaliado. Os resultados indicam boa estabilidade térmica das formulações avaliadas, tanto submetidas a armazenamento em temperatura ambiente (25°C) quanto na condição refrigerada.

Palavras-chave: Proteínas vegetais, bebidas vegetais, tratamento UHT, isolado proteico de ervilha, castanha-do-pará.

ABSTRACT

Plant proteins derived from legumes (pulses) and nuts are important allies in the formulation of products free of animal proteins, as they can provide all the essential amino acids in adequate proportions when combined. However, there is little information available regarding the behavior of these proteins during processing and/or storage of formulated products, which increases empiricism in the development of such products. In this context, the present work aimed to evaluate the stability of hybrid plant-based UHT-treated beverages containing proteins from pea and Brazil nut, with the claims of source and rich in proteins. Formulations combining yellow pea protein isolate and Brazil nut paste with total protein contents of 3.0%, 4.5% and 6.5% were subjected to UHT treatment in indirect heat exchange and evaluated for protein solubility, apparent viscosity, particle size distribution and insoluble protein profile. UHT processing, combined with homogenization, led to a significant reduction in insoluble material and particle size in the beverages compared to formulations prior to UHT treatment. After 60 days of storage, the particle size of beverages remained unchanged, but an increase of apparent viscosity was noticed, especially in beverages stored under refrigerated conditions (5°C). This increase of apparent viscosity was more pronounced in formulations displaying higher protein content (4.5% and 6.5%). Regarding the electrophoretic profile of the proteins in the insoluble fraction of the beverages, the same profile was observed throughout the evaluated storage period. The results indicate good thermal stability of the evaluated formulations, both submitted to storage at room temperature (25°C) and in the refrigerated condition.

Keywords: plant proteins, plant-based beverages, UHT treatment, pea protein isolate, Brazil nut.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Demanda global do consumo diário de proteína (gramas/per capita) projetada até 2050.....	14
Figura 2: Impactos ambientais da produção de leite de vaca em relação às bebidas vegetais de soja, aveia e amêndoa.....	15
Figura 3: Perfil de eletroforese SDS-PAGE de isolados proteicos de ervilha para os cultivares N, T, S e A (linha de reprodução avançada Dakota do Norte, Trapeze, Spider e Agassiz, respectivamente); os números à esquerda indicam os pesos moleculares das proteínas marcadoras na coluna “Marker”. (CUI <i>et al.</i> , 2020). Autorização de uso em ANEXOS.....	19
Figura 4: Perfis de eletroforese em SDS-PAGE da proteína de castanha-do-pará (colunas A e C), e de farinha desengordurada de castanha-do-pará (colunas B, D e E). F contém o marcador de massa molecular; G contém a proteína 2S purificada pelo procedimento de extração em água / precipitação ácida. Os números à direita indicam as massas moleculares das proteínas marcadoras (SUN; LEUNG; TOMIC, 1987). Autorização de uso em ANEXOS.....	21
Figura 5. Curvas de tempo e temperatura para processo UHT com troca térmica direta (A) e indireta (B) (KELLEHER <i>et al.</i> , 2018). Autorização de uso em ANEXOS.....	24
Figura 6. Fluxograma de preparo da mistura.....	31
Figura 7. Fluxograma de processamento térmico em equipamento UHT e condições de armazenamento.....	31
Figura 8. Bebidas vegetais F1, F2 e F3 após o processamento UHT contendo 3%, 4,5% e 6,5% proteínas (da esquerda para a direita).....	32
Figura 9. Distribuição do tamanho de partículas das diferentes bebidas antes do processamento UHT, após o processamento UHT (D0) e após 60 dias armazenadas a 25°C (D60a) para as bebidas (A) F1, (B) F2 e (C) F3.....	46
Figura 10. SDS-PAGE em condições redutoras do isolado proteico de ervilha (IPE) à esquerda e da pasta de castanha-do-pará (PCP) à direita e suas respectivas frações proteicas.....	47
Figura 11. SDS-PAGE das frações insolúveis das bebidas antes (A) e depois (D0) do processamento UHT e após 60 dias (D60a) armazenadas a 25°C. As bandas 1 a 3 correspondem à F1, as bandas 4 a 6 correspondem à F2 e as bandas 7 a 9 correspondem à F3.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de aminoácidos nas proteínas da Castanha do Pará.....	22
Tabela 2. Formulações de Bebidas Vegetais para processamento UHT.....	28
Tabela 3. Composição calculada das diferentes formulações de Bebidas Vegetais.....	29
Tabela 4. Composição de aminoácidos essenciais (AAE) das fontes proteicas, da referência FAO/WHO/ONU e o calculado teórico nas fórmulas das bebidas mistas vegetais.....	30
Tabela 5. Teores de proteína, lipídeos e umidade das diferentes bebidas UHT.....	36
Tabela 6. Composição de Referência de aminoácidos estabelecida pela FAO/WHO/ONU e perfil de aminoácidos essenciais das diferentes bebidas UHT expressos em mg de aminoácido por grama de proteína.....	38
Tabela 7. pH das bebidas antes, imediatamente após o processamento UHT e após 60 dias de armazenamento a 25°C (D60a).....	39
Tabela 8. Resultados de viscosidade após processamento para as bebidas armazenadas a 25°C (D0) e após 5 e 60 dias para as bebidas armazenadas a 25°C (D5a e D60a) e a 5°C (D5r e D60r).....	41
Tabela 9. Massa de material sedimentável (g de precipitado úmido/L de amostra) antes e logo após o processamento UHT, após 60 dias para as bebidas armazenadas a 25°C (D60a) e após 5 e 60 dias para as bebidas armazenadas a 5°C (D5r e D60r).....	43
Tabela 10. Resultados de tamanho de partículas (µm) antes e após o processamento UHT (D0) e após 60 dias para as bebidas armazenadas a 25°C (D60a).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UHT	Ultra High Temperature (sigla em inglês para UAT: Ultra Alta Temperatura)
IPE	Isolado proteico de ervilha
PCP	Pasta de castanha-do-pará
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
WHO/OMS	Organização Mundial da Saúde
FAO	Food and Agriculture Organization
ONU	Organização das Nações Unidas
M _w	Massa molecular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Fontes proteicas vegetais	17
3.1.1 Proteínas de Ervilha	17
3.1.2 Castanha-do-pará	20
3.2 Desafios na produção de bebidas vegetais mistas submetidas a tratamento UHT	22
3.2.1 Tratamento Térmico UHT	23
3.2.2 Mecanismos de estabilização de proteínas	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Materiais	27
4.1.1 Formulação das Bebidas	27
4.2 Processamento das bebidas	30
4.3 Análise da composicional e do perfil de aminoácidos das bebidas	32
4.4 Análises de estabilidade das bebidas	33
4.4.1 Determinação do pH	33
4.4.2 Determinação da fração insolúvel	33
4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
4.4.4 Distribuição de tamanho de partículas	34
4.4.5 Análise de viscosidade aparente	34

4.5 Estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Caracterização da composição e do perfil de aminoácidos das bebidas UHT	36
5.2 Evolução do pH das bebidas UHT ao longo do armazenamento	38
5.3 Evolução da viscosidade aparente das bebidas ao longo do armazenamento	39
5.4 Estabilidade proteica nas bebidas UHT	42
5.4.1 Massa de material sedimentável	42
5.4.2 Distribuição do tamanho de partículas	44
5.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	47
6 CONCLUSÃO	50
7 REFERÊNCIAS	51
8 ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são macronutrientes muito importantes tanto por seu valor nutricional quanto por suas tecno-funcionalidades (BELICIU; MORARU, 2013). Apesar da principal função das proteínas alimentares estar relacionada com o fornecimento de aminoácidos para o corpo humano sintetizar novas proteínas, no contexto de ciência e tecnologia de alimentos, o comportamento destas moléculas durante o processamento é de extrema importância para manutenção da qualidade dos produtos. As matérias-primas de origem animal, como leite, ovos e carne, são, ainda, as fontes mais importantes de proteínas usadas pelas indústrias de alimentos, seguidas, por fontes proteicas de origem vegetal (ALVES; TAVARES, 2019). Este perfil de consumo suscita diversas preocupações ligadas à sustentabilidade e segurança alimentar, pois, em média são necessários 7 kg de produtos vegetais para produzir 1 kg de leite ou carne para consumo humano (NADATHUR; WANASUNDARA; SCANLIN, 2017).

A população mundial é atualmente de 8 bilhões de pessoas e esse número vem crescendo a uma taxa de aproximadamente 1,02% ao ano (Worldometers, 2023). O crescimento populacional inevitavelmente implica em expansão agrícola e crescimento da produção, que por sua vez, pressiona os recursos naturais, aumentando o desmatamento, a emissão de gases de efeito estufa e o consumo de água (WHO, 2009). De 2010 a 2050, projeta-se que o consumo mundial de carnes e laticínios aumentará cerca de 173% e 158%, respectivamente (FASOLIN et al., 2019). Outras projeções estimam ainda de que a demanda mundial por proteínas de origem animal dobrará até 2050 (HENCHION et al., 2017). Em complemento ao aumento populacional, outras mudanças no perfil da sociedade, como, por exemplo, o aumento de classe média e a urbanização, também contribuirão com o aumento da demanda por produtos de origem animal (HENCHION et al., 2017).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a demanda diária de ingestão de proteína (gramas/per capita/dia) não deve acompanhar o desenvolvimento sustentável deste segmento, conforme aponta a Figura 1. Os valores projetados preveem uma demanda superior à projetada como sustentável, o que reforça a necessidade da busca pela produção de alimentos com redução do uso dos recursos ambientais. De acordo com a FAO, entende-se por desenvolvimento sustentável “a gestão e conservação da base de recursos naturais

e a orientação da mudança tecnológica e institucional de forma a garantir a realização e a satisfação contínua das necessidades humanas para as gerações presentes e futuras" (OECD/FAO, 2021).

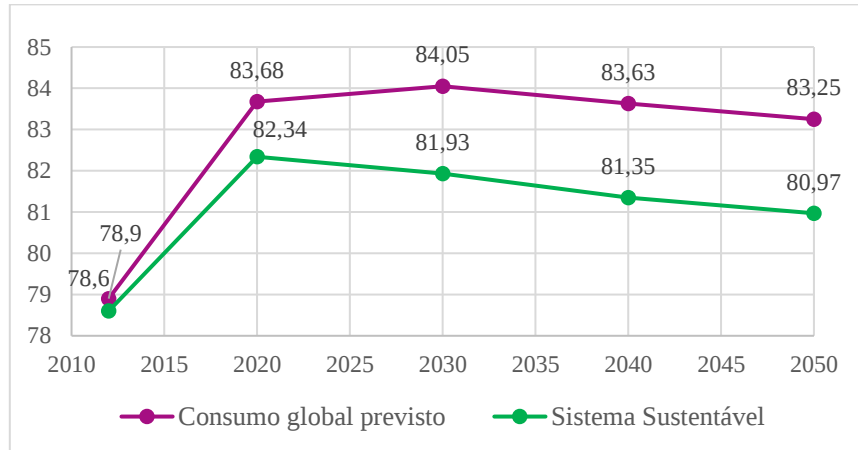


Figura 1. Demanda global do consumo diário de proteína (gramas/per capita) projetada até 2050. Fonte: Adaptado de Poore & Nemecek (2018).

Na Figura 2 aponta a variação dos impactos da produção de leite em comparação às bebidas vegetais de fontes distintas. O leite de vaca tem impactos significativamente maiores do que as alternativas vegetais nas métricas avaliadas: emite três vezes mais gases do efeito estufa; utiliza cerca de dez vezes mais terra; duas a vinte vezes mais água doce; e cria níveis muito mais elevados de eutrofização (POORE; NEMECEK, 2018).

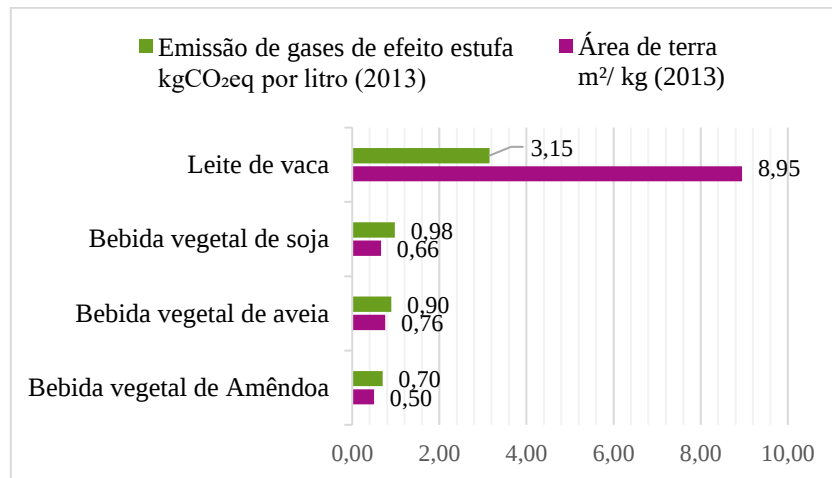


Figura 2: Impactos ambientais da produção de leite de vaca em relação às bebidas vegetais de soja, aveia e amêndoa. Fonte: Adaptado de Poore & Nemecek (2018).

Este cenário torna urgente a busca por fontes proteicas alternativas e com menor impacto ambiental. Assim, a substituição parcial ou total de proteínas de origem animal em produtos formulados por proteínas de origem vegetal aparece como uma importante estratégia para a redução dos impactos ambientais associados a este enorme consumo de proteínas de origem animal (ALVES; TAVARES, 2019; MESSION, J.-L.; ROUSTEL; SAUREL, 2017; SILVA *et al.*, 2019). Apesar do alto teor proteico de algumas fontes vegetais como feijões, tremoço e quinoa, frequentemente quando comparadas às fontes convencionais de proteínas como leite, ovos e carne, as proteínas de origem vegetal possuem maiores deficiências em certos aminoácidos essenciais (FASOLIN *et al.*, 2019; LONNIE *et al.*, 2018). Neste sentido, alguns sistemas mistos de proteínas vegetais, como exemplo misturas de proteínas de leguminosas com proteínas de castanha-do-pará, podem ser interessantes do ponto de vista nutricional, uma vez que aminoácidos sulfurados são aminoácidos limitantes nas proteínas de leguminosas, enquanto as proteínas da castanha-do-pará possuem elevados índices de metionina. Neste contexto, o presente projeto propôs o estudo de estabilidade de bebidas vegetais mistas formuladas com isolado proteico de ervilha e pasta de castanha-do-pará e submetidas a tratamento UHT com troca de calor indireta em sistema tubular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o comportamento e a estabilidade de proteínas de ervilha e de castanha-do-pará combinadas em formulações de bebidas contendo diferentes teores de proteínas, frente ao processamento UHT com troca de calor indireta.

2.2 Objetivos Específicos

1. Acompanhamento do tamanho das partículas em suspensão nas bebidas UHT como indicativo de separação de fases e sedimentação de proteínas durante a vida de prateleira;
2. Monitoramento das frações proteicas mais susceptíveis à sedimentação após o processamento UHT e durante a vida de prateleira das bebidas;
3. Avaliação do impacto do aumento do teor proteico total das formulações na viscosidade e estabilidade das bebidas submetidas ao processamento UHT ao longo do período de 60 dias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fontes proteicas vegetais

Na perspectiva de substituir proteínas de origem animal por proteínas de origem vegetal na formulação de produtos, um fator importante a ser avaliado é o perfil desejado de aminoácidos essenciais. Para tanto, a escolha e o balanceamento das fontes proteicas vegetais combinadas na formulação é um etapa crucial (FASOLIN *et al.*, 2019; JIMÉNEZ-MUNOZ; TAVARES; CORREDIG, 2021; MELINA; CRAIG; LEVIN, 2016).

As leguminosas (pulses), incluindo ervilha, soja, tremço, grão de bico, lentilha e feijão são importantes fontes de proteína em muitas dietas ao redor do mundo (DAY, 2013). Em complemento, as proteínas extraídas destas fontes têm despertado interesse da indústria de alimentos para aplicações na formulação de produtos devido ao seu alto valor nutricional, relativa grande disponibilidade e baixo custo comparativamente às proteínas de origem animal (LAM *et al.*, 2016). Dentre estas fontes, as proteínas isoladas da ervilha têm se destacado devido sua maior solubilidade (VENKATACHALAM; SATHE, 2006), capacidade de retenção de óleo, propriedades de emulsificação e gelificação, textura e sabor neutro (DAY, 2013). No entanto essas proteínas são limitadas nos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, que por sua vez, são bastante abundantes nas proteínas da castanha-do-pará. Dessa forma, as proteínas de ervilha combinadas com as proteínas de castanha-do-pará podem apresentar um perfil completo de aminoácidos definido pela FAO/WHO para dietas de adultos (WHO, 2007).

Neste tópico, serão apresentadas as características das proteínas da ervilha e da castanha-do-pará.

3.1.1 Proteínas de Ervilha

Dentre as leguminosas, a ervilha figura entre as fontes mais comumente usadas para a produção de ingredientes proteicos, em especial por (1) seu extensivo cultivo e disponibilidade ao redor do mundo, (2) seu envoltório de fácil remoção, (3) sua baixa alergenicidade, (4) seu alto valor nutricional e (5) seu baixo custo (DAY, 2013; LAM *et al.*, 2018).

Em média, as ervilhas contêm 25% de proteína, mas com uma grande variação entre as cultivares. Além disso, contêm altos níveis de carboidratos, concentrações relativamente altas de fibra alimentar insolúvel e baixas concentrações de lipídeos (DAY, 2013). As proteínas da ervilha podem ser divididas em albuminas e globulinas, representando de 10 a 20% e 70 a 80% do seu

conteúdo proteico total, respectivamente (LAM *et al.*, 2016).

As albuminas presentes na ervilha, em comparação com suas globulinas, contêm concentrações mais elevadas dos aminoácidos essenciais triptofano, lisina, treonina e metionina. As globulinas da ervilha estão subdivididas nas frações legumina (11S) e vicilina (7S), ambas com ponto isoeletrico de 4,5 e temperatura de desnaturação entre 82,7 e 85,5 °C (ALVES; TAVARES, 2019; CHIHAI *et al.*, 2016; SHEVKANI *et al.*, 2015). Comparada à legumina, a vicilina é uma proteína mais flexível, apresentando melhor atividade interfacial (ALVES; TAVARES, 2019; LAM *et al.*, 2016). Legumina e vicilina combinadas representam mais de 70% da proteína total da ervilha (DAY, 2013). Há ainda, em menores quantidades, de uma terceira fração compondo as globulinas da ervilha, conhecida como convicilina (LAM *et al.*, 2016).

O isolado proteico de ervilha (IPE) é um ingrediente produzido a partir desta leguminosa, contendo em torno de 90% de proteína. Na sua produção, frequentemente é utilizado um processo de solubilização das proteínas em pH alcalino, seguido de uma precipitação isoeletrica (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010). Entretanto, devido às características de solubilidade das diferentes frações proteicas da ervilha, a aplicação deste processo culmina em uma menor recuperação das albuminas no IPE (ADEBIYI; ALUKO, 2011). A utilização de técnicas de filtração tangencial com membranas, como a ultrafiltração, em substituição à precipitação isoeletrica possibilita uma maior recuperação de albuminas no IPE, que por sua vez poderá apresentar comportamento diferente daquele obtido por precipitação isoeletrica (LAM *et al.*, 2018). Embora trabalhos anteriores tenham relatado as propriedades tecno-funcionais do IPE, até o momento existem poucas informações sobre os atributos tecno-funcionais de cada uma das frações proteicas isoladas (ADEBIYI; ALUKO, 2011). Na Figura 3 é possível identificar as frações proteicas que compõe os isolados proteicos de ervilha obtidos por extração alcalina a partir de diferentes cultivares, através da aplicação da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em condição redutora. Neste estudo será utilizado isolado proteico de ervilha com teor mínimo de proteínas em 80% em base seca.

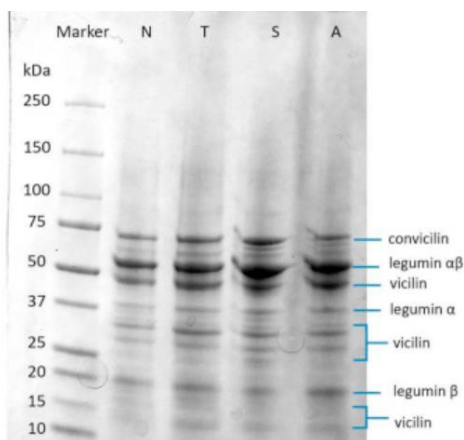


Figura 3: Perfil de eletroforese SDS-PAGE de isolados proteicos de ervilha para os cultivares N, T, S e A (linha de reprodução avançada Dakota do Norte, Trapeze, Spider e Agassiz, respectivamente); os números à esquerda indicam os pesos moleculares das proteínas marcadoras na coluna “Marker”. (CUI *et al.*, 2020).

Considerando o tratamento térmico como uma etapa frequentemente aplicada no processamento de alimentos com o objetivo de modificar as propriedades tecno-funcionais dos ingredientes, torna-se necessário o entendimento do comportamento e estabilidade das proteínas de ervilha quando expostas ao aquecimento. Peng *et al.* (2016) constataram que o tratamento térmico a 95°C por 30 minutos não diminuiu significativamente a solubilidade de suspensões a 0,1 a 0,5% de isolado de proteínas de ervilha, e resultou em interações hidrofóbicas entre gotículas nas emulsões, aumentando a floculação das gotículas e a estabilidade da gordura.

Em relação à hidrofobicidade superficial e à tensão interfacial, é bem conhecido que o tratamento térmico pode expor grupos hidrofóbicos em proteínas globulares como resultado de desdobramento parcial (Peng, 2016; Sorgentini, Wagner, & Anon, 1995). Estudos constataram que o aumento da concentração da proteína submetida ao tratamento térmico, aumentou também o tamanho dos agregados de proteína e a hidrofobicidade superficial das proteínas da ervilha (Peng *et al.*, 2016). No que diz respeito frações das globulinas legumina (11S) e vicilina (7S), Chihi *et al.* (2016) e Zheng *et al.* ((2016; 1993) constataram que as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas governam a associação de agregados primários de proteínas durante a formação de macro agregados solúveis.

Em suma, estudos prévios mostram que a agregação proteica estaria relacionada ao equilíbrio entre repulsão eletrostática pela carga superficial líquida e as interações hidrofóbicas

induzidas pelo calor (MESSION, J.-L.; ROUSTEL; SAUREL, 2017). De forma mais abrangente, o tratamento térmico acima da temperatura de desnaturação geralmente causa desdobramento parcial e subsequente agregação de proteínas (PENG *et al.*, 2016).

3.1.2 Castanha-do-pará

A castanha-do-pará tem elevado potencial nutritivo e tecnológico, tendo em vista sua composição, com aproximadamente 14% de proteína, 60% de lipídios e 5% de fibras. A fração lipídica da castanha-do-pará é composta principalmente por ácido oléico (C18:1) e ácido linoléico (C18:2). Elas possuem igualmente quantidades consideráveis de vitaminas como a B1, B6 e E, e minerais, como cálcio, selênio, ferro, zinco (DE SOUZA, M. L.; DE MENEZES, 2008; LOBSTEIN, 2011).

As proteínas da castanha-do-pará são consideradas de alto valor biológico e estão entre as proteínas alimentares mais ricas em aminoácidos sulfurados. É relatado na literatura que suas proteínas contêm cerca de 8,3% m/m de metionina e cisteína. A fração proteica total da castanha-do-pará contempla três classes de proteínas, denominadas 11S, 7S e 2S, com massas moleculares de 24 a 32 kDa, 14 a 45 kDa e 3 e 9 kDa, respectivamente (SUN; LEUNG; TOMIC, 1987). Na Figura 4 pode ser observado o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida das proteínas da castanha-do-pará fresca e da farinha desengordurada. As proteínas da castanha-do-pará atendem à maior parte das necessidades de aminoácidos essenciais, apesar de sua limitação lisina segundo o preconizado pela WHO/FAO/UNU, conforme aponta a Tabela 1 (BORGES; FREITAS, 2009; FELBERG *et al.*, 2009). Além dos níveis expressivos de metionina e cisteína, destaca-se o conteúdo de glutamina presente na castanha-do-pará (Tabela 1).

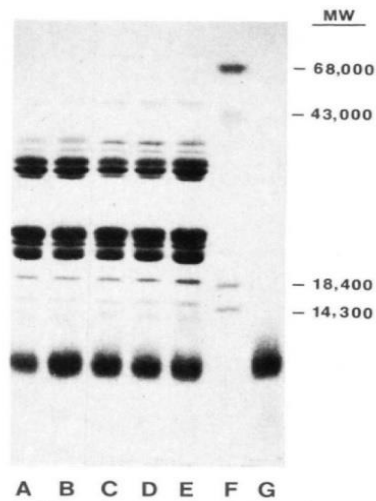


Figura 4: Perfis de eletroforese em SDS-PAGE da proteína de castanha-do-pará (colunas A e C), e de farinha desengordurada de castanha-do-pará (colunas B, D e E). F contém o marcador de massa molecular; G contém a proteína 2S purificada pelo procedimento de extração em água / precipitação ácida. Os números à direita indicam as massas moleculares das proteínas marcadoras (SUN; LEUNG; TOMIC, 1987).

Tabela 1: Composição de aminoácidos nas proteínas da Castanha do Pará ¹

Descrição	Castanha do Pará ¹	Referência FAO/WHO/ONU ²
Aminoácidos Essenciais		
Histidina	30,2	15
Isoleucina	31,5	30
Leucina	82,4	59
Lisina	37,4	45
Metionina + cisteína	95,9	22
Fenilalanina + Tirosina	71,8	38
Treonina	26,4	23
Triptofano	10,1	6
Valina	49,2	39
Aminoácidos Não-Essenciais		
Ácido Aspártico	101,1	-
Ácido Glutâmico	205,1	-
Alanina	43	-
Arginina	151	-
Glicina	52,4	-
Prolina	49,8	-
Serina	46,2	-

(1) Souza; Menezes (2004); Venkatachalam (2006); (2) Brasil (2020).

3.2 Desafios na produção de bebidas vegetais mistas submetidas a tratamento UHT

As informações disponíveis sobre ingredientes à base de proteína de ervilha em aplicações de alimentos e bebidas são ainda limitadas, principalmente devido às suas propriedades estruturais e tecno-funcionais variarem de acordo com o fabricante e com o processo de extração utilizado na obtenção do ingrediente. O uso de proteína de ervilha como componente ou suplemento nutricional em produtos alimentícios e bebidas tem sido um grande desafio científico

e tecnológico na indústria de alimentos e bebidas. Em grande parte, isto se deve ao fato da solubilidade das proteínas em água ser afetada por muitos fatores do meio, incluindo pH, força iônica ou a presença de outros ingredientes (WEI *et al.*, 2020). Uma abordagem que tem recebido atenção crescente de pesquisadores para a melhoria da estabilidade de proteínas em alimentos e bebidas é o uso de polissacarídeos para evitar a agregação ou precipitação/sedimentação de proteínas em produtos formulados, em especial àqueles submetidos a tratamentos térmicos intensos (Viebke, Al-Assaf, & Phillips, 2014).

3.2.1 Tratamento Térmico UHT

Os produtos UHT são aqueles tratados termicamente de maneira a reduzir a contagem microbiana além da pasteurização convencional, são geralmente embalados sob condições higiênicas extremas e com consequente prazo de validade prolongado (RYSSTAD; KOLSTAD, 2006). O tratamento térmico é uma etapa crítica no processamento da maioria dos alimentos, e em especial dos produtos UHT, entre outras coisas, em razão das alterações físico-químicas que podem ser desencadeadas no produto pelo tratamento térmico intenso. A estabilidade térmica das proteínas, de maneira geral é relativamente baixa, o que pode levar à formação de agregados proteicos durante o tratamento térmico, causando alterações na viscosidade, turbidez, tamanho das partículas e potenciais separações de fase (BUGGY *et al.*, 2018).

Diferentes métodos de processamento UHT podem ser aplicados aos alimentos. Os métodos de injeção direta de vapor (DSI) têm vantagens sobre o aquecimento indireto por trocadores de calor tubulares ou de placas (IND), pois há contato direto com o meio de aquecimento seguido de resfriamento instantâneo a vácuo, o que permite uma transferência de calor mais eficiente (LEE; BARBANO; DRAKE, 2017). Este comparativo é ilustrado na Figura 5, para os tratamentos térmicos direto (Figura 5 a) por infusão de vapor e indireto (Figura 5 b) em trocador de calor tubular.

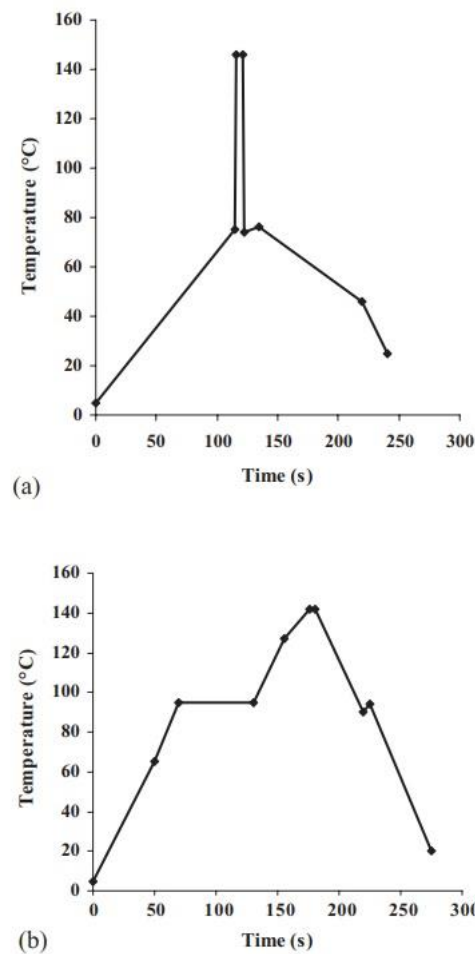


Figura 5. Curvas de tempo e temperatura para processo UHT com troca térmica direta (A) e indireta (B) (Sunds, A. V., 2016).

A interface de transferência de calor dos sistemas de aquecimento indireto reduz a taxa de transferência de calor para o produto, dessa forma o aquecimento localizado na interface pode resultar em níveis mais altos de desnaturação e incrustação de proteínas em comparação com os sistemas diretos (AMARAL *et al.*, 2013; DATTA *et al.*, 2002; PHINNEY; FELDMAN; HELDMAN, 2017). De acordo com o estudo de Phinney *et al.* (2017), a redução na temperatura de processo com troca térmica indireta, mantendo uma eficiência microbiológica equivalente, resultou na redução das taxas de incrustação durante o processamento de bebida UHT contendo proteínas. Do ponto de vista de viscosidade, os trocadores de calor tubulares são mais indicados para produtos de maior viscosidade em relação aos demais sistemas UHT (sistemas de troca direta, especialmente por infusão de vapor; e sistema indireto de trocadores de placas, devido aos espaços

estreitos entre as placas). Isso é particularmente importante nas seções de resfriamento, onde a viscosidade do produto aumenta à medida que esfria podendo causar danos às vedações e ao final do processo (DATTA *et al.*, 2002; LEE; BARBANO; DRAKE, 2017).

Em relação à eficiência energética, nos sistemas de aquecimento direto é possível uma menor regeneração de calor quando comparado aos sistemas indiretos, uma vez que o vapor da câmara de vácuo é condensado e o calor útil é perdido nos sistemas. Em sistemas indiretos, todo o produto esterilizado ainda na temperatura de esterilização (135 - 150°C) pode ser usado na seção de regeneração. Assim, a regeneração de calor em sistemas indiretos é geralmente > 90%, enquanto apenas em torno de 50% em sistemas diretos (DATTA *et al.*, 2002).

O processamento UHT de produtos adicionados de proteínas de origem vegetal ainda é pouco explorado, portanto pouco se sabe sobre a eficiência nestes sistemas e os mecanismos de estabilização usualmente aplicados em produtos contendo proteínas lácteas, como a adição de sais quelantes.

3.2.2 Mecanismos de estabilização de proteínas

Os mecanismos que podem conferir estabilidade durante o processamento e ao longo da vida de prateleira de bebidas UHT adicionadas de proteínas vegetais ainda são pouco elucidados. Uma das rotas possíveis a ser considerada é a adição dos sais quelantes às formulações, visando sua interação com as proteínas vegetais. De acordo com LAM *et al.* (2018), dependendo do tipo e da concentração do sal presente, as proteínas podem sofrer “*salting in*” ou “*salting out*”. Na primeira situação (“*salting in*”), os sais favorecem interações proteína-água e ordenam as camadas de hidratação ao redor da proteína para aumentar a solubilidade. Já na condição de “*salting out*”, os sais em excesso favorecem interações íon-água, que levam a uma redução das camadas de hidratação ao redor das proteínas e favorecendo interações proteína-proteína. Consequentemente, agregação e precipitação proteica podem ocorrer dependendo da força iônica e do nível de exposição dos resíduos hidrofóbicos (MELINA; CRAIG; LEVIN, 2016).

Em comparação com outras proteínas de leguminosas (como grão de bico, feijão fava e lentilha), a proteína de ervilha em pH 7,0 possui estrutura de superfície mais hidrofóbica, carga superficial inferior e solubilidade em água reduzida, podendo levar à instabilidade da proteína em solução aquosa (KARACA; LOW; NICKERSON, 2011; WEI *et al.*, 2020). A partir deste cenário, uma abordagem que tem recebido atenção crescente dos pesquisadores para a melhoria da

estabilidade de proteínas em produtos alimentícios e bebidas, é a adição de polissacarídeos com o intuito de prevenir a agregação ou precipitação/sedimentação proteica (VIEBKE; AL-ASSAF; PHILLIPS, 2014; WEI *et al.*, 2020). Os polissacarídeos são especialmente usados na indústria de alimentos para manter a estabilidade de partículas como proteínas, particularmente em produtos lácteos (WEI *et al.*, 2020). A adição de gomas polissacarídicas em produtos alimentícios ou bebidas pode aumentar a viscosidade da fase contínua e/ou formar uma rede polimérica emaranhada, o que contribui para evitar a agregação e precipitação de proteínas (Saha & Bhattacharya, 2010). Um exemplo de polissacarídeo complexo que confere efeito estabilizante sem gerar demasiado aumento de viscosidade é a goma acácia, exsudato de origem vegetal. Outro exemplo de agente estabilizante aplicável em bebidas é a goma gelana, um polissacarídeo extracelular secretado pelo microrganismo *Sphingomonas elodea*. Este hidrocolóide forma géis suaves e elásticos após aquecimento a 85°C seguido de resfriamento, agindo como excelente agente de suspensão em bebidas esterilizadas (DRAGET, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Formulação das Bebidas

As bebidas foram formuladas a partir do isolado proteico de ervilha e pasta de castanha-do-pará. O Isolado proteico de ervilha, proveniente da extração aquosa de proteínas de ervilhas amarelas (variedade *Pisum sativum*) com teor mínimo de 80% de proteínas em matéria seca, foi cedido pela empresa Ingredion Inc. (unidade de Mogi Guaçu). A pasta de castanha-do-pará, obtida a partir do processamento das castanhas (nome científico *Bertholletia excelsa*) sem casca até consistência fina e homogênea, com teor de 14,4% de proteína, foi cedida pela Carino Ingredientes (Marília, São Paulo). O sistema estabilizante aplicado nas bebidas UHT foi cedido pela empresa Ingredion INC.

A Tabela 2 apresenta as formulações F1, F2 e F3 das bebidas mistas, enquanto a Tabela 3 mostra os respectivos cálculos de informação nutricional. As formulações foram definidas de maneira a somarem níveis totais de proteína de 3,0%, 4,5% e 6,5%, respectivamente para as formulações F1, F2 e F3. Também foi considerada a composição proteica requerida para os apelos “fonte” e “rico em proteínas” (BRASIL, 2020). Além disso, o teor de açúcar adicionado foi reduzido ao nível inferior a 2,5 g/100g de bebida, possibilitando a classificação “baixo em açúcares”, de acordo com RDC 75 / 2020 (BRASIL, 2020). Foi aplicado sistema estabilizante salino composto por fosfato dissódico e fosfato dipotássico em nível 0,18%, conforme recomendação do fornecedor (Grupo ICL). Em complemento, para a estabilização do pH durante o *shelf life*, foi aplicado citrato trissódico com efeito tamponante (Adicel). Para a estabilização da suspensão proteica, foi aplicado um sistema estabilizante composto pelos hidrocolóides goma acácia e goma gelana (alto grau de aclilação) em dosagem de 0,30%. Para complementação do gosto doce foi utilizado o edulcorante estévia.

Tabela 2. Formulações de Bebidas Vegetais para processamento UHT

Ingredientes	F1(%)	F2(%)	F3(%)	Função
Água	90,25	87,95	85,55	Diluyente
Açúcar	2,40	2,40	2,40	Aporte de sólidos e dulçor
IPE	3,30	5,10	8,00	Aporte de proteínas e gorduras
PCP	3,50	4,00	4,80	
Sistema estabilizante (goma acácia e goma gelana)	0,30	0,30	0,30	Agentes de suspensão e emulsificação
Esteviosídeo (stevia)	0,03	0,03	0,03	Edulcorante
Sistema de sais (fosfato dissódico e fosfato dipotássico)	0,15	0,15	0,15	Agentes Estabilizantes/ tamponantes
Citrato trissódico	0,05	0,05	0,05	Regulador de acidez
Total	100,0	100,0	100,0	

Tabela 3. Composição calculada das diferentes formulações de Bebidas Vegetais

Componente	Composição Nutricional teórica/calculada		
Formulação	F1	F2	F3
Proteínas (%)	3,00	4,40	6,60
Gorduras totais (%)	2,50	2,90	3,40
Carboidratos (%)	2,90	3,00	3,10
Açúcares adicionados (%)	2,40	2,40	2,40
Fibra alimentar (%)	0,60	0,70	0,80
Selênio (µg) ¹	7,14	8,16	9,18
Sólidos totais (%)	9,40	11,60	13,90
Baixo teor de açúcares (< 5g por porção)			
Alegações Nutricionais (porção de 200 mL)²	Fonte de proteínas (6,0 gramas na porção)	Fonte de proteínas (9,0 gramas na porção)	Rico em proteínas (13 gramas na porção)

(1) Quantidade de selênio informado pelo fornecedor da pasta de castanha-do-pará. (2) Em concordância com a Instrução normativa nº 75, de 08 de Outubro de 2020 (BRASIL, 2020).

A Tabela 4 apresenta as composições de aminoácidos essenciais (AAE) do isolado proteico de ervilha, da pasta de castanha-do-pará e a referência para valores mínimos de aminoácidos essenciais (AAE) segundo FAO/WHO/ONU, além das respectivas composições de AAE teóricas para cada formulação de bebida vegetal mista.

Tabela 4. Composição de aminoácidos essenciais (AAE) das fontes proteicas, da referência FAO/WHO/ONU e o calculado teórico nas fórmulas das bebidas mistas vegetais.

Descrição	PCP ¹	IPE ²	Referência ³	F1	F2	F3
Aminoácidos Essenciais	mg de aminoácido/g de proteína					
Histidina	30,2	25,2	15	26	26	26
Isoleucina	31,5	47,7	30	44	46	46
Leucina	82,4	86,2	59	86	86	86
Lisina	37,4	76,9	45	70	72	73
Metionina + cisteína	95,9	17,2	22	31	27	25
Fenilalanina + Tirosina	71,8	90,1	38	87	88	88
Treonina	26,4	35,8	23	34	35	35
Triptofano	10,1	9,3	6	9	9	9
Valina	49,2	50,4	39	50	50	50

(1) Borges e Freitas (2009). (2) Teor proteico mínimo de 80% em base seca. (3) FAO/WHO/ UNU (2007).

4.2 Processamento das bebidas

O processamento das bebidas foi realizado em escala piloto em equipamento MicroThermics Flex UHT/HTSTLab-25HVH (Estados Unidos, 2007) com trocador de calor tubular (vapor indireto), com vazão de 60 L/hora. A etapa de homogeneização foi realizada após o tratamento térmico (*downstream*) com o intuito de contribuir com uma maior estabilidade das bebidas. Comparativamente ao processo de homogeneização antes do tratamento térmico (*upstream*), a homogeneização em *downstream* pode atuar em proteínas “sensibilizadas” pelo processo de esterilização, o que pode impactar positivamente na estabilidade dos produtos durante o armazenamento.

Foram preparados 10 litros de cada formulação de bebida, conforme o fluxograma descrito na Figura 6, que apresenta o procedimento de preparo das misturas. A Figura 7, por sua vez, apresenta o detalhamento do processamento térmico UHT e condições de envase e estocagem das bebidas. O processamento de cada formulação foi realizado em duplicata.

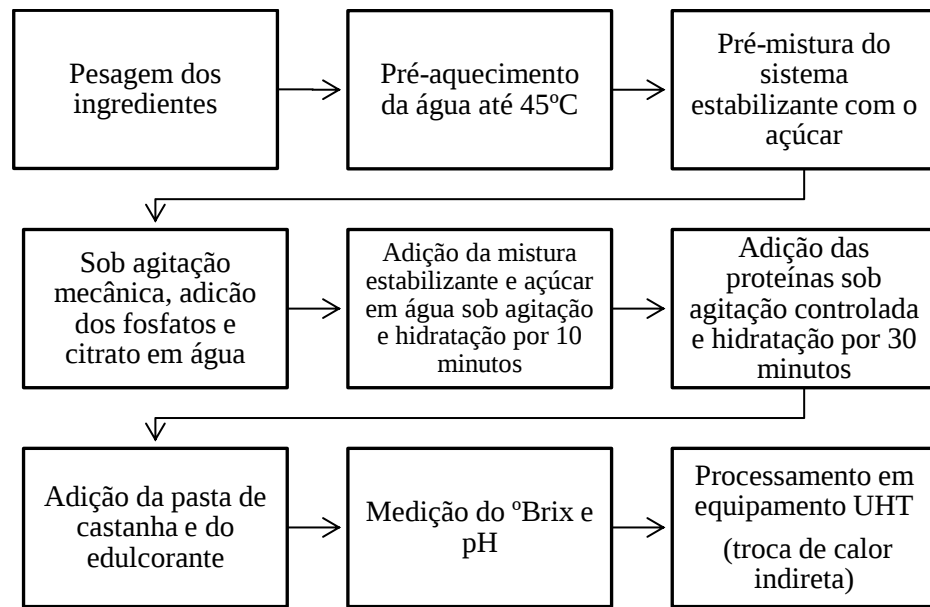


Figura 6. Fluxograma de preparo da mistura.

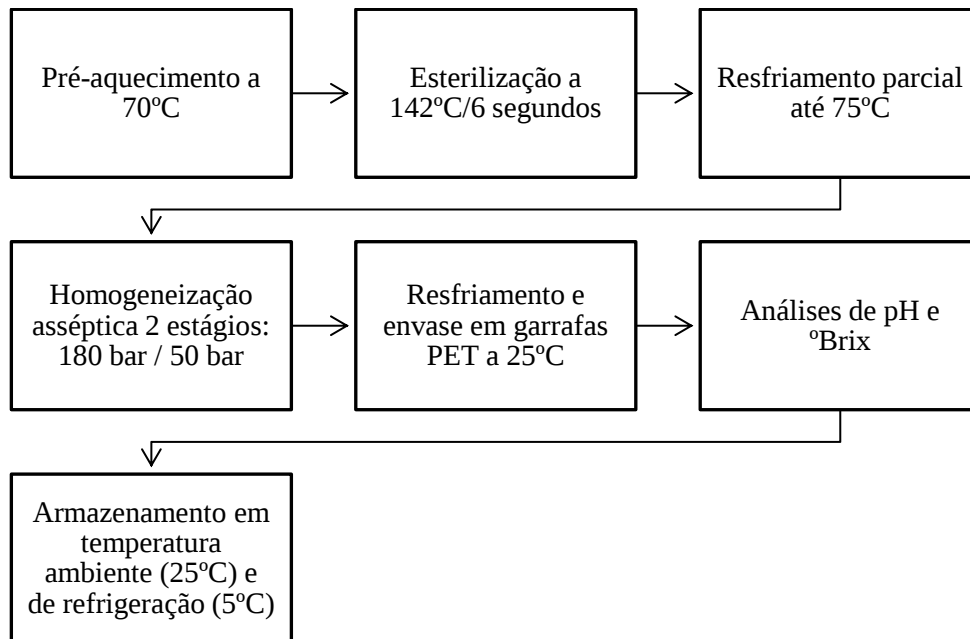


Figura 7. Fluxograma de processamento térmico em equipamento UHT e condições de armazenamento.

As bebidas foram armazenadas em garrafas PET de 250mL esterilizadas. Na Figura 8 estão exemplificadas as bebidas após o processamento UHT contendo 3,0%, 4,5% e 6,5% proteínas, respectivamente.



Figura 8. Bebidas vegetais F1, F2 e F3 após o processamento UHT contendo 3%, 4,5% e 6,5% proteínas (da esquerda para a direita).

4.3 Análise da composicional e do perfil de aminoácidos das bebidas

As bebidas UHT foram analisadas quanto ao teor de proteínas e umidade. A análise de proteínas foi realizada pelo método Kjeldahl aplicando o fator de conversão de nitrogênio de 6,25, indicado para misturas de proteínas, de acordo com a IN nº 75 de 2020 (BRASIL, 2020). O teor de umidade, por sua vez, foi determinado pela metodologia gravimétrica, com secagem em estufa a 105°C (IAL, 2008). As análises de proteínas e umidade foram realizadas em triplicata. A análise de lipídeos foi realizada nas bebidas liofilizadas pelo método de Soxhlet (IAL, 2008).

Para a determinação do perfil de aminoácidos as amostras foram previamente liofilizadas em liofilizador Liotop K108 (Liobras, São Carlos, Brasil), e os pós obtidos foram armazenados à vácuo à -18°C até a realização das análises. O perfil de aminoácidos foi determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando um cromatógrafo equipado com detector DAD e de fluorescência (Separation module 2695, Fluorescence Detector 2475, Waters, Massachusetts, EUA), pilotado com o software Empower 3. As amostras foram submetidas a três diferentes preparações para hidrólise das proteínas e consequente liberação dos aminoácidos: (i) a primeira preparação foi a de hidrólise ácida para quantificação dos aminoácidos resistentes a tais condições reacionais, em meio ausente de oxigênio; (ii) a segunda preparação foi para

quantificação dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) a partir de pré-oxidação com ácido fórmico, peróxido de hidrogênio e ácido bromídrico; e (iii) a terceira preparação foi a de hidrólise alcalina para quantificação do triptofano. Cada etapa de hidrólise foi seguida por etapa de derivatização utilizando reagente carbamato 6-aminoquinolilsuccimidil (AQC) seguida da quantificação em coluna cromatográfica C18 (AccQ.Tag®, Waters) e fase móvel composta por tampão acetato pH 5,05 / acetonitrila / água para os aminoácidos resistentes e sulfurados. Para a análise do triptofano, ácido acético e acetonitrila foram utilizados como fase móvel. A eluição dos aminoácidos foi acompanhada por meio de leitura de fluorescência com excitação a 250 nm e emissão a 395 nm (MA *et al.*, 2015).

4.4 Análises de estabilidade das bebidas

4.4.1 Determinação do pH

As formulações das diferentes bebidas F1, F2 e F3 foram avaliadas em relação ao pH antes do processamento UHT, após o processamento UHT (D0) e após 60 dias de vida de prateleira para a condição de armazenamento a 25°C (ambiente) (D60a). As medições foram realizadas em pHmetro Mettler Toledo, modelo MP 220 (Schwerzenbach, Switzerland).

4.4.2 Determinação da fração insolúvel

As frações solúveis e insolúveis das diferentes formulações antes e após o processamento UHT foram separadas por centrifugação a 2330 g a 25°C $\pm$ 2°C por 5 min em Centrífuga Nova Técnica, modelo 812 (Piracicaba, Brasil). A massa da fração insolúvel foi quantificada e expressa em gramas de precipitado úmido por litro de amostra (g/L). As análises foram realizadas em triplicata em cada uma das duas replicatas independentes de processo.

4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A técnica de SDS-PAGE foi aplicada para identificar o perfil das proteínas em função de suas massas moleculares. A análise foi realizada em condições redutoras. Foram analisadas as amostras: 1) isolado proteico de ervilha (IPE), 2) pasta de castanha-do-pará (PCP) e 3) frações insolúveis obtidas das formulações de bebidas UHT.

As dispersões de IPE e PCP foram preparadas separadamente em concentração proteica de 10 mg/mL. As frações insolúveis das formulações F1, F2 e F3 foram avaliadas antes e logo após

o processamento UHT (D0) e após 60 dias do processamento UHT para as bebidas armazenadas em temperatura de 25°C (ambiente) (D60a). A fração insolúvel foi obtida conforme tópico “Determinação da fração insolúvel”. Uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi misturada com 1,0 mL do tampão de amostra contendo 2% de SDS, 20% de glicerol, 10% β - mercaptoetanol (utilizado como agente redutor), 62.5 mM Tris – HCl pH 6,8. As amostras foram aquecidas a 90 °C por 5 min e em seguida agitadas em vórtex à 25°C por 1 min, para garantir que as proteínas estivessem completamente dispersas. Após o resfriamento as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 14%. A análise foi realizada em uma célula de eletroforese (Mini Protein tetra cell, Biorad, Singapura) a 120 V por 60 min. O tampão de corrida foi composto por 25 mM Tris base, 0,1% SDS, 192 mM glicina, pH 8,3. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G - 250 (0,1% em 10% de ácido acético, 40% de metanol e 50% de água destilada) por 24h e descoloridos em uma solução contendo ácido acético/metanol/água (1/ 4/ 5). As análises foram realizadas em duplicata.

4.4.4 Distribuição de tamanho de partículas

A análise de tamanho de partícula por difração a laser foi realizada nas diferentes formulações de bebida UHT utilizando o equipamento Horiba, modelo LA-300 (Califórnia, EUA), utilizando o software LA300 para Windows.

A distribuição do tamanho das partículas no intervalo de 0,1 a 600 μ m foi obtida a partir de alíquotas coletadas dos frascos contendo 250 mL de cada uma das 3 formulações, F1, F2 e F3. As distribuições de tamanho de partículas foram analisadas em sextuplicata nas bebidas antes e após o processamento UHT (D0) e após 60 dias $\pm$ 2 para as bebidas armazenadas sob refrigeração a 5°C (D60r) e a temperatura ambiente a 25°C (D60a).

4.4.5 Análise de viscosidade aparente

As bebidas UHT foram avaliadas quanto sua viscosidade aparente logo após o tratamento UHT (D0) e ao longo da vida de prateleira, após 5 e 60 dias ($\pm$ 2 dias), para as bebidas armazenadas a 5°C e 25°C (D5r e D5a, D60r e D60a). Antes da medição da viscosidade, as amostras mantidas sob refrigeração foram mantidas em temperatura ambiente por tempo suficiente para atingirem a temperatura de 23°C $\pm$ 2°C para a realização da análise. As bebidas foram transferidas para béqueres e misturadas 10 vezes com uma colher, a fim de eliminar qualquer potencial efeito

de separação de fases. O equipamento utilizado foi o Viscosímetro Brookfield modelo RV DV-II+Pro (Massachusetts, USA). Os parâmetros de análise foram fixados na rotação de 50 rpm e tempo de medição de 30 segundos, a fim de manter constante a taxa de cisalhamento aplicada nas amostras e possibilitar a análise comparativa das medições ao longo da vida de prateleira. A análise foi realizada em quadriplicata.

4.5 Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Minitab, versão 20 (Minitab Statistical Software, Pennsylvania, EUA). Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para avaliar diferenças entre as amostras com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da composição e do perfil de aminoácidos das bebidas UHT

As bebidas UHT foram analisadas quanto ao teor de proteínas e umidade. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5. O teor de proteínas das diferentes amostras foi próximo ao teórico idealizado para cada uma das formulações. Estas concentrações proteicas atendem a Instrução Normativa Nº 75 de 2020 (BRASIL, 2020) que estabelece a quantidade mínima de proteínas para as alegações nutricionais “fonte de proteínas” (mínimo de 6 g de proteína/porção) e “rico em proteínas” (mínimo de 12 g de proteína/porção), considerando a porção de 200 mL, conforme estabelecido pela IN nº 75 na categoria de bebidas não alcoólicas (BRASIL, 2020).

Os teores lipídicos obtidos nas fórmulas F1, F2 e F3 liofilizadas foram de 26,09% para F1, 30,31% para F2 e 34,36% para F3. O aumento observado entre as fórmulas é baseada na variação do nível de pasta de castanha-do-pará entre as 3 formulações, sendo o nível em F1 de 3,5%, em F2 o nível foi de 4,0% e em F3 a dosagem foi de 4,8%, de forma a complementar o perfil de aminoácidos proporcionalmente nas diferentes bebidas. No que diz respeito a análise de umidade, os valores encontrados foram de 92,9% para F1, 90,7% para F2 e 87,2% para F3. A redução do teor de umidade de F1 para F2, bem como de F2 para F3 deu-se de maneira condizente e inversamente proporcional ao aumento do teor de proteínas (e total de sólidos). Os resultados do teor de umidade foram coerentes, embora ligeiramente maiores, com o teórico idealizado na concepção da formulação (Tabela 3).

Tabela 5. Teores de proteína, lipídeos e umidade das diferentes bebidas UHT.

Análise	F1	F2	F3
Proteínas ¹ (%)	3,01 ± 0,01	4,41 ± 0,01	6,57 ± 0,14
Umidade ¹ (%)	92,9 ± 0,16	90,7 ± 0,12	87,2 ± 0,18
Lipídeos ² (b.c.)	26,09	30,31	34,3

¹Resultados expressos pela média da análise em triplicata. ²Análise realizada nas bebidas liofilizadas.

Além da quantidade de proteínas, as bebidas UHT devem atender o perfil de aminoácidos essenciais em quantidades mínimas, conforme estabelecido pela FAO para ter a alegação nutricional de proteínas. A Tabela 6 apresenta o perfil de aminoácidos essenciais das diferentes bebidas UHT, bem como a composição referência da FAO (BRASIL, 2020). O perfil de aminoácidos das bebidas UHT mostrou valores acima da composição mínima de referência para

todos os aminoácidos essenciais (AAE's), cumprindo, portanto, as exigências para as alegações nutricionais referentes às proteínas. A soma dos aminoácidos metionina e cisteína esperada para formulações cuja fonte proteica fosse apenas ervilha seria em torno de 17 mg/g de proteína. Esses aminoácidos, que são limitantes nas leguminosas, foram complementados pela adição da castanha-do-pará. Os resultados obtidos para a soma dos aminoácidos metionina e cisteína ficaram acima do valor mínimo de referência de 22 mg/g de proteína, apresentando somatórias de 37, 35 e 39 mg/g proteína para as amostras F1, F2 e F3, respectivamente. Os valores reais de aminoácidos essenciais das diferentes bebidas foram bastante condizentes com o teórico estimado para as diferentes formulações (Tabela 4), à exceção dos valores ligeiramente inferiores de leucina e ligeiramente superiores dos aminoácidos sulfurados. Dessa forma, a alegação “fonte de proteínas” (mínimo de 6 g de proteína/porção) é aplicável às bebidas F1 e F2, e a alegação “rico em proteínas” ou “alto teor de proteínas” (mínimo de 12 g de proteína/porção) é aplicável à bebida F3 (BRASIL, 2020).

Tabela 6. Composição de Referência de aminoácidos estabelecida pela FAO/WHO/ONU e perfil de aminoácidos essenciais das diferentes bebidas UHT expressos em mg de aminoácido por grama de proteína.

Aminoácidos Essenciais	Referência FAO/WHO/ONU	F1	F2	F3
Histidina	15	25	25	25
Isoleucina	30	44	45	46
Leucina	59	79	80	81
Lisina	45	70	73	72
Metionina + cisteína	22	37	35	39
Fenilalanina + tirosina	38	85	86	88
Treonina	23	36	35	36
Triptofano	6	9	8	8
Valina	39	48	49	50

5.2 Evolução do pH das bebidas UHT ao longo do armazenamento

O pH das diferentes bebidas UHT foi monitorado ao longo do armazenamento como indicativo da estabilidade físico-química e microbiológica das amostras. Os valores de pH das amostras antes e logo após o processamento UHT e após 60 dias de armazenamento a temperatura ambiente de 25°C (D60a) estão descritos na Tabela 7. Não houve variação significativa do pH da bebida F1 entre os pontos analisados, com pH de 7,42 antes do processamento UHT e 7,32 em D60a. Resultados equivalentes foram observados para a amostra F2, que apresentou pH de 7,38 antes do processamento UHT, 7,36 logo após o processamento UHT e 7,34 em D60a. No que concerne a amostra F3, o valor de pH da bebida antes do processamento UHT foi de 7,19 e se diferiu significativamente do pH da amostra logo após o processamento UHT (7,29) e em D60a (7,32). Para essa amostra, houve um ligeiro aumento do pH em decorrência do processamento UHT, o qual se manteve estável ao longo do armazenamento por 60 dias a temperatura ambiente. O pH inferior da amostra F3 antes do processamento UHT, comparativamente às formulações F1 e F2, pode ser atribuído ao maior conteúdo proteico da bebida, o que resultou em menor hidratação e solubilização das proteínas antes do processamento UHT. Em resumo, o monitoramento do pH evidencia estabilidade das bebidas ao longo dos 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente (25°C).

Tabela 7. pH das bebidas antes, imediatamente após o processamento UHT e após 60 dias de armazenamento a 25°C (D60a).

Fórmula	Antes UHT	Após UHT (D0)	D60a
F1 (3,0% proteínas)	7,42 ± 0,06 ^{A a}	7,36 ± 0,06 ^{A a}	7,32 ± 0,05 ^{A a}
F2 (4,5% proteínas)	7,38 ± 0,09 ^{A a}	7,36 ± 0,06 ^{A a}	7,34 ± 0,02 ^{A a}
F3 (6,5% proteínas)	7,19 ± 0,01 ^{A b}	7,29 ± 0,03 ^{A a}	7,32 ± 0,025 ^{A a}

Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes para os valores em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes para os valores em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.3 Evolução da viscosidade aparente das bebidas ao longo do armazenamento

A viscosidade aparente das diferentes amostras foi determinada ao longo do armazenamento tanto à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), quanto em temperatura de refrigeração (5°C). Na Tabela 8 constam os valores de viscosidade aparente para as amostras logo após o processamento UHT (D0), após 5 e 60 dias com armazenamento à temperatura ambiente de 25°C (D5a e D60a) e temperatura de refrigeração de 5°C (D5r e D60r). Os valores de viscosidade das diferentes bebidas F1, F2 e F3 logo após o processamento UHT (D0) diferiram significativamente entre si; com valores de 20,27 mPa.s para a amostra F1, 24,53 mPa.s para F2 e 48,70 mPa.s para a amostra F3. O aumento de viscosidade entre as amostras F1 e F2, bem como entre as amostras F2 e F3 são resultantes do aumento dos níveis de proteínas, bem como do aumento do teor de sólidos totais das amostras. A amostra F1, com menor teor de proteína ($\sim 3,0\%$) apresentou menor viscosidade aparente, a amostra F2 contendo níveis intermediários de proteína ($\sim 4,4\%$) apresentou valores intermediários de viscosidade aparente, enquanto a amostra F3, com maior teor de proteína ($\sim 6,5\%$), apresentou maior viscosidade. Entretanto, apesar das diferentes viscosidades aparentes, todas as amostras estavam fluidas o suficiente para serem adequadamente processadas no tratamento UHT.

Na análise das viscosidades aparentes ao longo da estocagem em temperatura ambiente, houve aumento significativo da viscosidade na amostra F1 em D5a de 20,27 mPa.s para 28,8 mPa.s, ao passo que entre D5a e D60a não houve variação significativa na viscosidade aparente, com o resultado de 27,6 mPa.s em D60a. Esses resultados indicam maiores variações

logo nos primeiros dias de estocagem, mas variações mínimas para maiores tempos de estocagem, nesta amostra. Para a amostra F2, os valores obtidos não diferiram entre si para as análises logo após o processamento UHT (24,5 mPa.s) e em D5a (28,0 mPa.s), ao passo que houve aumento significativo comparando os resultados entre D5a e D60a, com resultados variando de 28,0 mPa.s para 36,6 mPa.s. Apesar desta variação, a viscosidade após o armazenamento não foi grande o suficiente para impedir a fluidez da bebida F2. Em relação à F3, ao longo do período de estocagem a 25°C, a viscosidade aparente foi significativamente maior com o maior período de estocagem (D60a), com viscosidade de 91,7 mPa.s, seguido do resultado em D5a (67,1 mPa.s), e por sua vez, a menor viscosidade aparente foi observada em D0 (48,7 mPa.s). Essa variação pode ser interpretada como consequência do aumento do teor proteico, mas também do teor de lipídeos, em decorrência do incremento da proporção de pasta de castanha-do-pará nesta formulação. Essas diferenças podem ter influenciado o perfil de interação soluto-solvente e consequentemente modulado a viscosidade.

A presença do sistema estabilizante composto por goma acácia e goma gelana parece possuir baixa influência no aumento da viscosidade das bebidas, uma vez que o nível aplicado de sistema estabilizante foi o mesmo nas 3 diferentes formulações e ambos os hidrocolóides apresentam, normalmente, baixa viscosidade quando em solução. Especificamente sobre a goma acácia, Williams P.A. e Phillips G.O. (2021) exemplificaram que as soluções desta goma só se tornam viscosas em concentrações superiores a cerca de 30%, em decorrência de sua estrutura altamente ramificada. Em complemento, em relação à goma gelana alta acil, Sworn et al (2021) mencionam que em baixas concentrações (0,02%–0,05%) as soluções desta goma são de natureza líquida, mas consistem em uma rede de gel fraca. Esses sistemas, geralmente chamados de “géis fluidos”, apresentam propriedades de suspensão extremamente boas, mas têm uma viscosidade muito baixa (SWORN; STOUBY, 2021). Adicionalmente, de acordo com Singh et al. (2020), a goma gelana é um agente de suspensão que gera uma rede tridimensional e resulta em um gel que possui interações que são facilmente destruídas com aplicação de cisalhamento.

Tabela 8. Resultados de viscosidade após processamento para as bebidas armazenadas a 25°C (D0) e após 5 e 60 dias para as bebidas armazenadas a 25°C (D5a e D60a) e a 5°C (D5r e D60r).

Fórmula	Após UHT	D5a	D60a	D5r	D60r
F1	20,27 ± 0,99 ^{Cc}	28,80 ± 0,20 ^{Bc}	27,60 ± 0,85 ^{Cc}	41,27 ± 6,29 ^{Cb}	54,90 ± 2,08 ^{Ca}
F2	24,53 ± 0,42 ^{Bd}	28,00 ± 2,60 ^{Bcd}	36,60 ± 0,00 ^{Bc}	54,93 ± 7,91 ^{Bb}	78,90 ± 1,894 ^{Ba}
F3	48,70 ± 0,53 ^{Ae}	67,10 ± 2,08 ^{Ad}	91,70 ± 1,59 ^{Ac}	159,83 ± 3,37 ^{Ab}	221,80 ± 15,03 ^{Aa}

As médias na coluna com sobrescrito maiúsculo diferente são significativamente diferentes em $p < 0,05$.

As médias na linha com sobrescrito minúsculo diferente são significativamente diferentes em $p < 0,05$.

Adicionalmente, a Tabela 8 também apresenta os resultados de viscosidade aparente para as bebidas estocadas sob refrigeração (5°C) após 5 e 60 dias (D5r e D60r). De forma similar ao observado durante a estocagem a temperatura ambiente, quanto maior o teor proteico da amostra, maior foi a viscosidade aparente observada. Para o período de 5 dias (D5r), o valor mais baixo observado foi em F1 (41,27 mPa.s), seguido da amostra F2 (54,92 mPa.s) e o valor mais alto foi observado em F3 (159,83 mPa.s). A partir da análise das amostras ao longo do período de armazenamento, todas as fórmulas apresentaram aumento significativo da viscosidade entre D5r e D60r. Os dados em D60r para F1, F2 e F3 foram de 54,9 mPa.s, 78,9 mPa.s e 221,8 mPa.s, respectivamente.

De forma comparativa, os valores de viscosidade das formulações mantidas sob refrigeração (5°C) foram superiores às respectivas viscosidades das bebidas mantidas à 25°C, sugerindo a ocorrência de cristalização da fração lipídica. Um ponto importante a ser salientado é o fato de que a estabilidade das bebidas foi mantida durante o período avaliado, apresentando aspecto liso e homogêneo até as avaliações de D60.

Em relação ao teor proteico, as viscosidades aumentaram à medida que os valores proteicos aumentaram. Para a amostra F3 com 6,5% de proteínas, a viscosidade aparente na amostra armazenada sob refrigeração (221,8 mPa.s) foi equivalente à de um iogurte batido ou bebida fermentada, com aparência cremosa, porém fluida. Como um exemplo comparativo de viscosidade, Thami, et. al (2022) estudaram adição de extrato de semente de uva em iogurte batido de búfala e relataram viscosidade aparente de 250 mPa.s para o iogurte controle. Em complemento, Borges et al. (2023) obtiveram viscosidades aparentes entre 194 mPa.s e 197,8 mPa.s para bebidas

láticas UHT com alto teor de proteína (10%) adicionadas de carboidratos. Os valores relatados por esses autores foram próximos ao encontrado para a bebida F3 contendo 6,5% proteínas em D60r (221,8 mPa.s).

5.4 Estabilidade proteica nas bebidas UHT

5.4.1 Massa de material sedimentável

Os resultados relativos ao nível de material sedimentável nas amostras antes do processamento UHT estão descritos na Tabela 9. A massa de precipitado úmido foi significativamente crescente com o aumento do teor de proteínas (e sólidos totais) das amostras. As formulações F1, F2 e F3, antes do processamento UHT, apresentaram 251,35, 326,15 e 416,69 g de precipitado úmido por L de amostra, respectivamente. O aumento do teor de material sedimentável de acordo com o aumento do teor de proteínas nas bebidas, sugere que o precipitado úmido possui participação considerável de proteínas. Comparando os dados antes do tratamento UHT e logo após (D0) é importante ressaltar a considerável diminuição do conteúdo de material sedimentável. Estes resultados demonstram a grande importância do processo de homogeneização como etapa que gera grande influência na solubilidade em proteínas vegetais, conforme citado em diversos estudos na literatura (CHANG *et al.*, 2022; D’ALESSIO *et al.*, 2023; PRIMOZIC *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018). Adicionalmente, Melchior *et al.* (2021) e D’Alessio *et al.* (2023)(D’ALESSIO *et al.*, 2023) mencionam a homogeneização possui a capacidade de aumentar a solubilidade e a retenção de óleo das proteínas de ervilha.

No que se refere ao período de estocagem, não houve variação significativa durante o período avaliado para a amostra F1, com valores de 64,38 g de precipitado úmido/L de amostra em D0 e 66,74 g de precipitado úmido/L de amostra após 60 dias (D60a). O mesmo comportamento foi observado na amostra F2, que apresentou valores de material sedimentável após o processamento UHT (D0) e após 60 dias (D60a) de 72,07g/L e 73,44 g/L, respectivamente. Os resultados mostram estabilidade das bebidas ao longo dos 60 dias em armazenamento a 25°C e manutenção da estabilidade proteica das bebidas, mesmo após o tratamento UHT. No que concerne a amostra F3 durante o período avaliado, a massa de material sedimentável em D0 foi significativamente maior (93,55 g/L de amostra) que a medição em D60a (54,63 g/L de amostra). Uma hipótese para interpretação desta redução de material sedimentável em F3 é o aumento da

viscosidade aparente de forma significativa, ocorrida no mesmo período (entre D0 e D60), restringindo a sedimentação

Tabela 9. Massa de material sedimentável (g de precipitado úmido/L de amostra) antes e logo após o processamento UHT, após 60 dias para as bebidas armazenadas a 25°C (D60a) e após 5 e 60 dias para as bebidas armazenadas a 5°C (D5r e D60r).

Fórmula	Antes do UHT	Após o UHT	D60a	D5r	D60r
F1	251,35 ± 16,56 ^{C a}	64,38 ± 7,51 ^{B b}	66,74 ± 5,35 ^{A b}	61,23 ± 2,70 ^{A bc}	43,55 ± 11,44 ^{A c}
F2	326,14 ± 2,84 ^{B a}	72,07 ± 15,15 ^{B b}	73,44 ± 3,13 ^{A b}	55,17 ± 3,79 ^{B bc}	38,37 ± 11,55 ^{A c}
F3	416,69 ± 10,28 ^{A a}	93,55 ± 10,40 ^{A b}	54,63 ± 6,96 ^{B c}	55,45 ± 3,18 ^{B c}	40,53 ± 2,57 ^{A d}

Letras maiúsculas diferentes para os valores em uma mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05).

Letras minúsculas diferentes para os valores em uma mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05).

Na avaliação das amostras armazenadas em condição refrigerada (5°C), os maiores valores encontrados para material sedimentável forem em D5r (61,23 g/L para F1, 55,17 g/L para F2 e 55,45 g/L para F3), sendo observada uma redução dos resultados após 60 dias (D60r) para as 3 formulações (43,55 g/L, 38,37 g/L e 40,53 g/L para F1, F2 e F3 respectivamente). Após 5 dias de estocagem em condições refrigeradas (D5r), F1 apresentou o maior resultado entre as formulações, com diferença significativa em relação às bebidas F2 e F3, o que pode estar relacionado à viscosidade inferior de F1, facilitando a segregação de material insolúvel durante a centrifugação. Na análise de D60r, não houve diferença significativa entre os resultados de F1, F2 e F3. A redução de material sedimentado de F3 em D60r pode ser justificada como uma consequência do aumento significativo de viscosidade entre o período D5r e D60r, conforme descrito na Tabela 8, ocasionado uma restrição da mobilidade do material durante a centrifugação na análise em D60r. Em análise comparativa das diferentes condições de armazenamento (25°C e 5°C) em D60a e D60r, observa-se uma menor concentração de material sedimentável em todas as amostras armazenadas a 5°C em relação às amostras armazenadas a 25°C. Este comportamento

reforça a influência do aumento da viscosidade na redução da fração sedimentável nas amostras D60r, como discutido anteriormente.

5.4.2 Distribuição do tamanho de partículas

O tamanho de partículas foi analisado nas amostras F1, F2 e F3 antes e após o processamento UHT (D0) e após 60 dias de armazenamento a 25°C (D60a). Os valores do tamanho médio das partículas (μm) nas diferentes amostras estão descritos na Tabela 10. Antes do processamento UHT, o tamanho médio das partículas foi de 151,19 μm , 153,54 μm e 148,32 μm para as formulações F1, F2 e F3 respectivamente. Para as 3 formulações, foi observado uma redução significativa do tamanho de partículas entre os dados obtidos antes e após o tratamento térmico UHT. Esta redução ocorreu em função da etapa de homogeneização, que promove redução do tamanho dos glóbulos lipídicos e dos agregados proteicos. Durante a homogeneização, o fluido é forçado a passar por um estreito orifício na válvula do homogeneizador, onde é submetido a uma rápida aceleração (D’ALESSIO *et al.*, 2023). Consequentemente, cavitação, tensão de cisalhamento e turbulência ocorrem simultaneamente, permitindo a indução de fenômenos como ruptura mecânica das diferentes estruturas em suspensão (D’ALESSIO *et al.*, 2023). O comportamento das amostras fica ainda mais evidente na observação da distribuição do tamanho de partículas apresentada na Figura 7. Nas diferentes formulações, antes do tratamento UHT há predominância de uma população de partículas cujo tamanho é superior a 100 μm . Após o processamento UHT, o perfil de distribuição do tamanho de partículas muda, com a clara presença de duas populações: uma por volta de 80 μm e outra inferior a 1 μm . O mesmo perfil se reproduz em todas as diferentes bebidas, independentemente do teor total de proteína. Na análise das diferentes bebidas depois do processamento UHT (D0), não houve diferença significativa do tamanho médio de partículas entre as formulações F1, F2 e F3; sendo os resultados obtidos de 19,12 μm , 17,83 μm e 15,23 μm , respectivamente.

Em relação aos resultados comparativos entre D0 (após o UHT) e após 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente (D60a), o tamanho médio de partículas entre as formulações não diferiu significativamente. O mesmo se reproduz no perfil de distribuição de partículas (Figura 9). Em adição, não foram observadas variações significativas entre o tamanho médio das partículas nas formulações F1, F2 e F3 após o período de armazenamento (18,77 μm ,

19,01 μm e 16,81 μm respectivamente), indicando estabilidade das estruturas proteicas, sem indícios de formação de agregados proteicos ao longo do período de armazenamento avaliado.

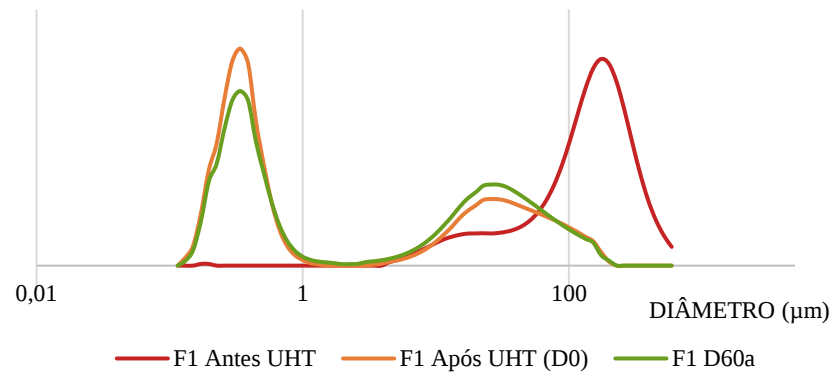
Tabela 10. Tamanho médio de partículas (μm) antes e após o processamento UHT (D0) e após 60 dias para as bebidas armazenadas a 25°C (D60a).

Fórmula	Antes do UHT	Após UHT (D0)	D60a
F1	151,19 $\pm$ 2,15 ^{AB a}	19,12 $\pm$ 3,45 ^{A b}	18,77 $\pm$ 1,10 ^{A b}
F2	153,54 $\pm$ 2,97 ^{A a}	17,83 $\pm$ 2,33 ^{A b}	19,01 $\pm$ 0,71 ^{A b}
F3	148,32 $\pm$ 2,14 ^{B a}	15,23 $\pm$ 1,47 ^{A b}	16,81 $\pm$ 0,32 ^{B b}

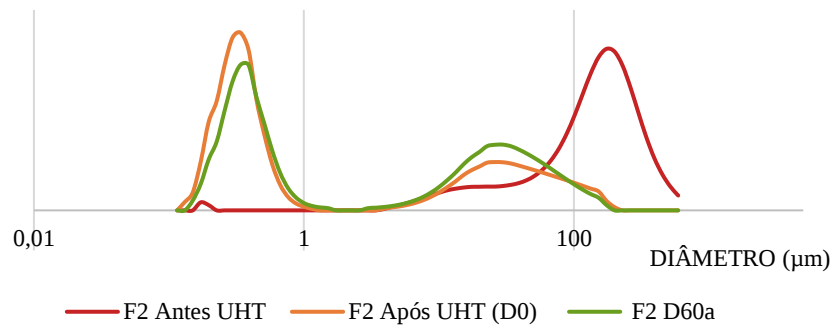
Letras maiúsculas diferentes para os valores em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes para os valores em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

(A) F1



(B) F2



(C) F3

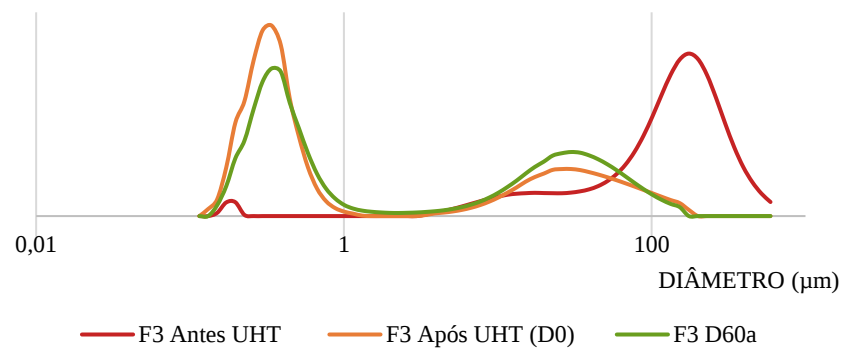


Figura 9. Distribuição do tamanho de partículas das diferentes bebidas antes do processamento UHT, após o processamento UHT (D0) e após 60 dias armazenadas a 25°C (D60a) para as bebidas (A) F1, (B) F2 e (C) F3.

5.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise de SDS-PAGE foi realizada para identificar as bandas (proteínas) características de cada um dos ingredientes proteicos utilizados na formulação das bebidas, ou seja, IPE (isolado proteico de ervilha) e PCP (pasta de castanha-do-pará). Em complemento a análise foi igualmente realizada para avaliar a estabilidade dessas proteínas nas bebidas, pela avaliação das proteínas presentes no material sedimentável ao longo do armazenamento. Os géis de eletroforese contendo os ingredientes proteicos IPE e PCP estão na Figura 10. No gel referente ao IPE, é possível identificar as bandas características das três principais proteínas (globulinas) da ervilha: convicilina, legumina e vicilina. De acordo com Cui et al. (2020), o perfil característico apresenta as seguintes massas moleculares: (i) a convicilina, cuja massa molecular é ao redor de 70 kDa; (ii) as frações proteicas compondo a legumina (α de ~40 kDa e β de ~20 kDa); e (iii) a vicilina, que é composta principalmente por três frações de diferentes massas moleculares. Com relação ao perfil proteico da pasta de castanha-do-pará, é possível visualizar 3 bandas com massas moleculares ao redor de 30 kDa, 15 a 20 kDa e ~10 kDa, que podem ser correlacionadas com as frações 11S, 7S e 2S, respectivamente. Sun et al (1987) mencionaram a presença de frações com massas moleculares de 24 a 32 kDa, 14 a 45 kDa e 3 e 9 kDa, para essa fonte proteica.

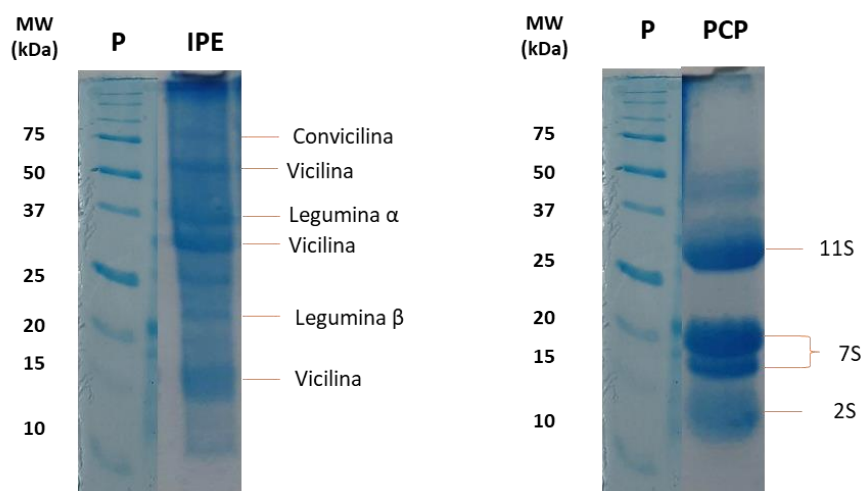


Figura 10. SDS-PAGE em condições redutoras do isolado proteico de ervilha (IPE) à esquerda e da pasta de castanha-do-pará (PCP) à direita e suas respectivas frações proteicas.

O perfil eletroforético das frações insolúveis das bebidas antes do processamento UHT (A), logo após o processamento (D0) e após 60 dias com armazenamento a 25°C (D60a) estão ilustrados na Figura 10. É possível observar de forma clara a redução da intensidade das bandas após o processamento UHT (D0 e D60a) em relação às bandas observadas antes do processo UHT (A). Esse comportamento é similar para as 3 formulações, indicando uma solubilização parcial a partir do aquecimento e cisalhamento, através da etapa de homogeneização, aplicados no processo. Esses resultados são coerentes com a avaliação da massa de material sedimentável nas diferentes etapas do processo. Entre as bandas observadas nas amostras em D0 e D60a não foi observada variação no perfil geral das frações proteicas compondo o material sedimentável. É possível, ainda, identificar as frações das três principais proteínas globulares da ervilha nas bandas observadas na Figura 11: convicilina, vicilina e legumina (CHANG *et al.*, 2022; D’ALESSIO *et al.*, 2023; MESSION, J. L. *et al.*, 2013)(CHANG *et al.*, 2022; D’ALESSIO *et al.*, 2023; MESSION, J. L. *et al.*, 2013). O perfil observado no gel das bebidas corresponde majoritariamente ao perfil das proteínas da ervilha, uma vez que a composição proteica das bebidas foi de aproximadamente 90:10 entre a proporção de proteína de ervilha e proteína da castanha-do-pará, respectivamente. Não obstante, é possível identificar na Figura 11 a fração com massa molecular ao redor de 20 kDa em todos os poços, de forma mais evidente do que no gel da proteína de ervilha isoladamente, o que sugere a participação da fração 7S da proteína da castanha no perfil do material sedimentável das bebidas.

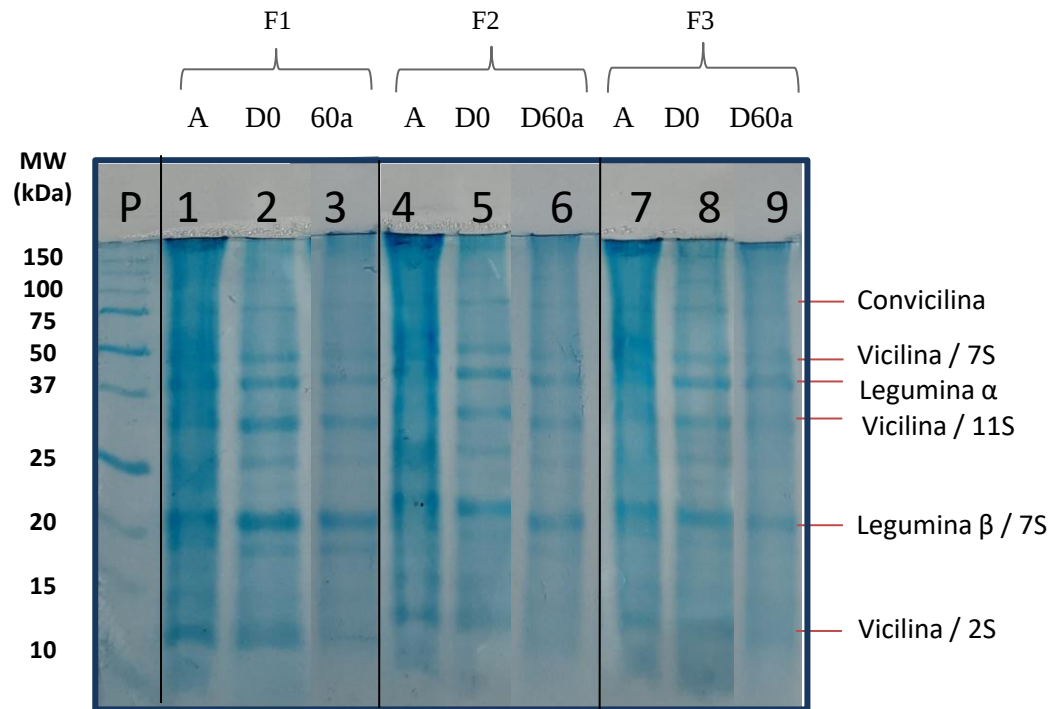


Figura 11. SDS-PAGE das frações insolúveis das bebidas antes (A) e depois (D0) do processamento UHT e após 60 dias (D60a) armazenadas a 25°C. As bandas 1 a 3 correspondem à F1, as bandas 4 a 6 correspondem à F2 e as bandas 7 a 9 correspondem à F3.

6 CONCLUSÃO

A utilização combinada de isolado proteico de ervilha e pasta de castanha-do-pará possibilitou a formulação de bebidas vegetais mistas com as alegações fonte e rico em proteínas, contendo todos os aminoácidos essenciais de forma balanceada, conforme preconizado pela FAO. Independentemente das diferentes concentrações proteicas, as formulações foram adequadamente submetidas ao processamento UHT. A realização da homogeneização após o tratamento térmico contribui na diminuição do tamanho das partículas das bebidas e igualmente na proporção de material sedimentável. Ao longo do armazenamento durante 60 dias, o perfil do tamanho das partículas das bebidas se manteve inalterado, no entanto, um aumento da viscosidade aparente dos produtos foi observado. Esse aumento foi mais relevante para as formulações com maiores teores de proteínas e para a condição de armazenamento refrigerada. O produto com aproximadamente 6,5 % de proteínas apresentou viscosidade compatível com a de iogurtes batidos quando armazenada por 60 dias sob refrigeração. No entanto, esse mesmo produto apresentou uma viscosidade significativamente menor quando armazenada pelo mesmo período a temperatura ambiente (25°C).

O perfil de proteínas presente no material sedimentável não variou ao longo do tempo, nem em função da variação entre as formulações. Portanto, nenhum comportamento indicando maior susceptibilidade de determinada proteína à sedimentação pôde ser evidenciado. As formulações permaneceram globalmente estáveis ao longo do período avaliado. Os resultados apontam como promissora a estratégia de combinação de diferentes fontes proteicas para a produção de produtos capazes de suprir demandas de mercado por alternativas a produtos tradicionalmente formulados com proteínas de origem animal, mas que mantenham a qualidade nutricional requerida.

Na continuidade deste tópico de trabalho, seria interessante realizar avaliações sensoriais dos produtos para balizar ajustes de formulação no que concerne percepção de dulçor, viscosidade e percepção global.

7 REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, A. P.; ALUKO, R. E. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, v. 128, n. 4, p. 902–908, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>>.
- ALVES, A. C.; TAVARES, G. M. *Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities?* *Food Hydrocolloids*. [S.l: s.n.], , 2019
- AMARAL, G. *et al.* *Proteins in Food Processing*. [S.l: s.n.], 2013. v. 369. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2011.03.003%0A>>.
- BELICIU, C. M.; MORARU, C. I. Physico-chemical changes in heat treated micellar casein – Soy protein mixtures. *LWT - Food Science and Technology*, v. 54, n. 2, p. 469–476, 1 dez. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813002302>>. Acesso em: 20 out. 2019.
- BORGES, J.; FREITAS, D. E. *UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS QUALIDADE NUTRICIONAL E VALOR PROTÉICO DA AMÊNDOA DE BARU EM RELAÇÃO AO AMENDOIM, CASTANHA-DE-CAJU E CASTANHA-DO-PARÁ*. . [S.l: s.n.], 2009.
- BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. *Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed*. *Food Research International*. [S.l.]: Elsevier. , 1 mar. 2010
- BRASIL. Instrução Normativa Nº75 de 8 de Outubro de 2020 - Rotulagem nutricional nos alimentos embalados. *Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA*, v. 8, n. 75, 2020.
- BUGGY, A. K. *et al.* Pilot-scale formation of whey protein aggregates determine the stability of heat-treated whey protein solutions—Effect of pH and protein concentration. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 12, p. 10819–10830, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-14177>>.
- CHANG, L. *et al.* Plant proteins from green pea and chickpea: Extraction, fractionation, structural characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*, v. 123, n. September 2021, p. 107165, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107165>>.
- CHIH, M.-L. *et al.* Heat-Induced Soluble Protein Aggregates from Mixed Pea

Globulins and β -Lactoglobulin. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 21 maio 2020.

CUI, L. *et al.* Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. *Food Hydrocolloids*, v. 108, n. May, p. 106008, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106008>>.

D’ALESSIO, G. *et al.* High pressure homogenization to boost the technological functionality of native pea proteins. *Current Research in Food Science*, v. 6, n. December 2022, p. 100499, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100499>>.

DATTA, N. *et al.* Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: Comparison of direct and indirect modes of heating. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 57, n. 3, p. 211–227, 2002.

DAY, L. Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, v. 32, n. 1, p. 25–42, jul. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441300109X>>. Acesso em: 22 maio 2020.

DE SOUZA, A. B. *et al.* Sedimentation in UHT high-protein dairy beverages: Influence of sequential preheating coupled with homogenisation or supplementation with carbohydrates. *International Dairy Journal*, v. 137, p. 105505, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105505>>.

DE SOUZA, M. L.; DE MENEZES, H. C. Extrusão de misturas de castanha do Brasil com mandioca. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 2, p. 451–462, abr. 2008.

DRAGET, K. I. *Handbook of hydrocolloids (incl. Alginates)*. [S.l.: s.n.], 2009.

FASOLIN, L. H. *et al.* Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*, v. 125, n. July, p. 108586, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>>.

FELBERG, I. *et al.* Bebida de soja e castanha do Brasil: Processamento, composição, avaliação sensorial e de cor. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 3, p. 609–617, 2009.

HENCHION, M. *et al.* Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, v. 6, n. 7, p. 53, 2017.

JIMÉNEZ-MUNOZ, L. M.; TAVARES, G. M.; CORREDIG, M. Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality. *Trends in Food Science and Technology*, v. 113, n. April, p. 139–150, 2021.

KARACA, A. C.; LOW, N.; NICKERSON, M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, v. 44, n. 9, p. 2742–2750, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>>.

KELLEHER, C. M. *et al.* The effect of direct and indirect heat treatment on the attributes of whey protein beverages. *International Dairy Journal*, v. 85, p. 144–152, 1 out. 2018.

LAM, A. C. Y. *et al.* Food Reviews International Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lfri20>>. Acesso em: 20 maio 2020.

LAM, A. C. Y. *et al.* *Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality*. *Food Reviews International*. [S.l.]: Taylor and Francis Inc. , 17 fev. 2018

LEE, A. P.; BARBANO, D. M.; DRAKE, M. A. The influence of ultra-pasteurization by indirect heating versus direct steam injection on skim and 2% fat milks. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 3, p. 1688–1701, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11899>>.

LOBSTEIN, A. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. *Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP Tabela*, v. 4, n. 3, p. 164, 2011.

LONNIE, M. *et al.* Protein for life: Review of optimal protein intake, sustainable dietary sources and the effect on appetite in ageing adults. *Nutrients*, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2018.

MA, X. *et al.* Chromatographic method for determination of the free amino acid content of chamomile flowers. *Pharmacognosy Magazine*, v. 11, n. 41, p. 176–179, 2015.

MELCHIOR, S. *et al.* Food and Bioproducts Processing High pressure homogenization shapes the techno-functionalities and digestibility of pea proteins. *Food and Bioproducts Processing*, v. 131, p. 77–85, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.10.011>>.

MELINA, V.; CRAIG, W.; LEVIN, S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, v. 116, n. 12, p. 1970–1980, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886704>>. Acesso em: 26 jul. 2020.

MESSIEN, J.-L.; ROUSTEL, S.; SAUREL, R. Interactions in casein micelle - Pea

protein system (Part II): Mixture acid gelation with glucono- δ -lactone. *Food Hydrocolloids*, v. 73, p. 344–357, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X17303089>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

MISSION, J. L. *et al.* Thermal denaturation of pea globulins (*Pisum sativum* L.) - Molecular interactions leading to heat-induced protein aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 6, p. 1196–1204, 13 fev. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf303739n>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

NADATHUR, S. R.; WANASUNDARA, J. P. D.; SCANLIN, L. Proteins in the Diet: Challenges in Feeding the Global Population. *Sustainable Protein Sources*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 1–19.

OECD/FAO. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030*. [S.l.: s.n.], 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/19428846-en>>.

PENG, W. *et al.* Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocolloids*, v. 52, p. 301–310, 1 jan. 2016.

PHINNEY, D. M.; FELDMAN, A.; HELDMAN, D. Modeling high protein liquid beverage fouling during pilot scale ultra-high temperature (UHT) processing. *Food and Bioproducts Processing*, v. 106, p. 43–52, 1 nov. 2017.

POORE, J.; NEMECEK, T. Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, v. 360, n. 6392, p. 987–992, 2018.

PRIMOZIC, M. *et al.* Food Hydrocolloids Formation , stability and in vitro digestibility of nanoemulsions stabilized by high-pressure homogenized lentil proteins isolate. *Food hydrocolloids*, v. 77, p. 126–141, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.028>>.

RYSSTAD, G.; KOLSTAD, J. Extended shelf life milk - Advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*, v. 59, n. 2, p. 85–96, 2006.

SHEVKANI, K. *et al.* Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 679–689, 1 jan. 2015.

SILVA, J. V. C. *et al.* Heat-induced gelation of mixtures of micellar caseins and plant proteins in aqueous solution. *Food Research International*, 2019.

SINGH, J. *et al.* Ultra-high temperature (UHT) stability of chocolate flavored high

protein beverages. *Journal of Food Science*, v. 85, 2020.

SOUZA, M. L. DE; MENEZES, H. C. DE. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 120–128, 2004.

SUN, S. S. M.; LEUNG, F. W.; TOMIC, J. C. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) Proteins: Fractionation, Composition, and Identification of a Sulfur-Rich Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 35, n. 2, p. 232–235, 1987.

SWORN, G.; STOUBY, L. *Gellan gum*. 3. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-820104-6.00009-7>>.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

VIEBKE, C.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O. Food hydrocolloids and health claims. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 4, n. 2, p. 101–114, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.06.006>>.

WEI, Y. *et al.* Comparative studies on the stabilization of pea protein dispersions by using various polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, v. 98, n. March 2019, p. 105233, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105233>>.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. *Gum arabic*. 3. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-820104-6.00022-X>>.

YANG, J. *et al.* Food Hydrocolloids Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, v. 83, n. May, p. 275–286, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.020>>.

ZHENG, B. A.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Conformational Changes and Surface Properties of Legumin from Broad Beans in Relation to Its Thermal Aggregation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 8, p. 1366–1368, 1993.

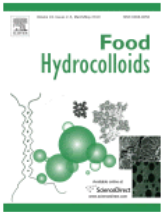
WHO (World Health Organization). Nutrition health topics. **Global and regional food consumption patterns and trends: Availability and changes in consumption of animal products.** Technical Report Series, 2009. Disponível em: <<https://www.who.int/nutrition/topics/3foodconsumption/en/index4.html>> Acesso em: 10 jul. 2020.

Worldometers - Estatísticas do mundo em tempo real. 2020. Disponível em:
<<https://www.worldometers.info/br/>> Acesso em: 08 Ago. 2023.

8 ANEXOS

- Autorização de uso da Figura 3

CUI, Leqi et al. Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. Food Hydrocolloids, v. 108, p. 106008, 2020.



Thank you for your order!

Dear Prof. Guilherme Tavares,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	University of Campinas
Order Date:	Jun 29, 2023
Order Number:	5578221424358
Publication:	Food Hydrocolloids
Title:	Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Total:	0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

customer@copyright.com
<https://myaccount.copyright.com>

**RightsLink**

- Autorização de uso da Figura 4

SUN, Samuel SM; LEUNG, Filomena W.; TOMIC, Jody C. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) proteins: fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 35, n. 2, p. 232-235, 1987.

29/06/2023, 10:53

Rightslink® by Copyright Clearance Center



 Home
  Help
  Live Chat
  Guilherme Tavares



Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) proteins: fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein

Author: Samuel S. M. Sun, Filomena W. Leung, Jody C. Tomic
Publication: Journal of Agricultural and Food Chemistry
Publisher: American Chemical Society
Date: Mar 1, 1987

Copyright © 1987, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

- Autorização de uso da Figura 5

KELLEHER, Clodagh M. et al. The effect of direct and indirect heat treatment on the attributes of whey protein beverages. International Dairy Journal, v. 85, p. 144-152, 2018.



Thank you for your order!

Dear Prof. Guilherme Tavares,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee: University of Campinas
Order Date: Jun 29, 2023
Order Number: 5578231126197
Publication: International Dairy Journal
Title: The effect of direct and indirect heat treatment on the attributes of whey protein beverages
Type of Use: reuse in a thesis/dissertation
Order Total: 0.00 USD

[View or print complete details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

[Texto das mensagens anteriores oculto]