



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Avaliação da capacidade emulsificante de gelatina acilada

Cathia dos Reis

Engenheira de Alimentos, 2003 (UNICAMP)

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Orientadora

Dissertação apresentada à comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas, Junho 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Reis, Cathia dos
R277a Avaliação da capacidade emulsificante de gelatina acilada / Cathia
dos Reis. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Rosiane Lopes Cunha
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Gelatina. 2. Acilação. 3. Emulsificação. 4. Cloreto de acila.
I. Cunha, Rosiane Lopes. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Emulsifying capacity evaluation of acylated gelatin

Palavras-chave em inglês (Keywords): Gelatin, Acylation, Emulsification, Acyl chloride

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Rosiane Lopes Cunha

Flavia Maria Netto

Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

Data da defesa: 16/06/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de mestrado defendida por Cathia dos Reis aprovada pela comissão julgadora em 16/06/2011.

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento Engenharia de Alimentos
– UNICAMP (Orientadora)

Profa. Dra. Flávia Maria Netto

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Alimentos e Nutrição –
UNICAMP (Membro)

Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos – UFG (Membro)

Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento Engenharia de Alimentos
– UNICAMP (Suplente)

Profa. Suzana Caetano da Silva Lannes

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Tecnologia – USP
(Suplente)

"Os analfabetos do próximo século não são aqueles que não sabem ler ou escrever, mas aqueles que se recusam a aprender, reaprender e voltar a aprender." (Alvin Toffler)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, seus professores e funcionários pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho.

À Gelita do Brasil, em especial à Denise Reis e Paulo Reimann, por acreditarem em meu trabalho e investirem em mim.

À Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha pela orientação, apoio, conselhos e amizade que demonstrou não só durante o período em que durou este trabalho, mas durante todo o tempo em que nos conhecemos.

À banca examinadora pelas correções e sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento do trabalho.

Aos meus pais, Adolpho e Neide, pelo apoio, incentivo a seguir em frente e querer sempre mais e por me darem as condições para chegar até aqui.

Às minhas irmãs, Tathi, Nina e Nati, pela amizade, união e confiança que sempre me confortaram e pela ajuda nos momentos em que precisei.

À equipe de P&D da Gelita, Dani Serrano e Fernandes, Mari, Vivi, Vagner, Inês e Fafá, pela ajuda, discussões e sugestões para melhoria do trabalho.

Aos colegas Fabi, Luis e Aninha pelas informações passadas e dúvidas esclarecidas.

À Joyce e D. Ana pela ajuda no laboratório.

À todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	xvii
RESUMO GERAL	xix
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULO 1. Introdução e Objetivos	1
1.1. Introdução.....	3
1.2. Objetivos.....	5
CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica	7
2.1. Proteínas.....	9
2.1.1. Propriedades de emulsificantes das proteínas.....	12
2.2. Gelatina.....	17
2.3. Modificações químicas nas proteínas.....	22
2.3.1. Acilação.....	23
2.3.2. Reações de modificação da gelatina.....	26
CAPÍTULO 3. Material e Métodos	29
3.1. Material.....	31
3.2. Métodos.....	31
3.2.1. Ensaios preliminares.....	31
3.2.1.1. Avaliação do efeito do pH na reação de acilação.....	32
3.2.1.2. Avaliação do balanço de massa da reação.....	32
3.2.1.3. Determinação do tempo de reação.....	33
3.2.1.4. Avaliação da reação conduzida a seco.....	35
3.2.2. Preparo das gelatinas aciladas e das emulsões.....	37
3.2.2.1. Reação de acilação da gelatina.....	37
3.2.2.2. Preparo das emulsões.....	40
3.2.3. Análises.....	42
3.2.3.1. Grau de hidrólise (GH) e de acilação (GA).....	42
3.2.3.2. Atividade (AE) e estabilidade (ES) emulsificante.....	44
3.2.3.3. Força de gel (Bloom).....	45

3.2.3.4. Viscosidade.....	46
3.2.3.5. Proteína.....	48
3.2.3.6. Cinzas.....	48
3.2.3.7. Umidade.....	48
3.2.3.8. Cloretos.....	48
3.2.3.9. Distribuição de ponto isoelétrico.....	49
3.2.3.10. Distribuição de massa molecular.....	49
3.2.3.11. Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	50
3.2.3.12. Estabilidade visual das emulsões.....	50
3.2.3.13. Microscopia ótica e análise de imagens.....	50
3.2.4. Avaliação estatística dos dados.....	51
CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão.....	53
4.1. Ensaio preliminares.....	55
4.1.1. Determinação da quantidade de reagente para a reação de acilação.....	55
4.1.2. Avaliação do efeito do pH na reação de acilação.....	57
4.1.3. Avaliação do balanço de massa da reação.....	59
4.1.4. Determinação do tempo de reação.....	61
4.1.5. Avaliação da reação conduzida a seco.....	64
4.2. Definição das melhores condições para a reação de acilação a seco da gelatina.....	75
4.2.1. Grau de hidrólise (GH) e de acilação (GA).....	75
4.2.2. Atividade (AE) e estabilidade (ES) emulsificante.....	79
4.2.3. Força de gel (Bloom).....	83
4.2.4. Viscosidade.....	85
4.3. Caracterização físico-química das gelatinas aciladas.....	88
4.3.1. Distribuição de ponto isoelétrico.....	91
4.3.2. Distribuição de massa molecular.....	93
4.3.3. Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	96
4.4. Avaliação do desempenho das gelatinas aciladas na estabilização de emulsões.....	101

4.4.1. Definição das condições de preparo das emulsões.....	101
4.4.2. Avaliação das gelatinas aciladas nas emulsões.....	105
CAPÍTULO 5. Conclusões.....	111
CAPÍTULO 6. Referências Bibliográficas.....	115
ANEXO 1. Coeficientes de regressão do planejamento experimental.....	121
ANEXO 2. Gráficos da distribuição de massa molecular das gelatinas.....	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Cadeias laterais de aminoácidos utilizados para modificações químicas em proteínas.....	4
Tabela 2.1. Valores de pKa e pI de aminoácidos e proteínas a 25°C.....	10
Tabela 2.2. Hidrofobicidade dos grupos laterais de aminoácidos.....	11
Tabela 2.3. Estrutura e quantidade dos principais aminoácidos hidrofóbicos presentes na gelatina.....	18
Tabela 2.4. Estrutura e quantidade dos principais aminoácidos hidrofílicos presentes na gelatina.....	19
Tabela 3.1. Ensaio para o planejamento experimental da reação de acilação.....	37
Tabela 3.2. Amostras “controle” preparadas sob as mesmas condições das gelatinas aciladas, porém sem adição do reagente.....	38
Tabela 3.3. Condições de homogeneização para a determinação das condições de preparo das emulsões com gelatina.....	41
Tabela 4.1. Quantidade de grupos NH ₂ disponível para a reação de acilação da gelatina com cloreto de lauroíla calculado a partir do NH ₂ presente em cada aminoácido (NH _{2pres}).....	56
Tabela 4.2. Caracterização do produto de reação em diferentes tempos de reação.....	61
Tabela 4.3. Diâmetro médio de gota das emulsões estabilizadas com gelatinas obtidas em diferentes pHs de reação.....	64
Tabela 4.4. Resultados de caracterização das gelatinas utilizadas na reação a seco.....	65
Tabela 4.5. Distribuição de massa molecular, massa molecular média e polidispersão das gelatinas aciladas provenientes da gelatina GP1.....	68
Tabela 4.6. Distribuição de massa molecular, massa molecular média e polidispersão das gelatinas aciladas provenientes da gelatina GP2.....	69
Tabela 4.7. Atividade emulsificante (AE) para as gelatinas submetidas à reação a seco.....	71

Tabela 4.8. Diâmetro de gota (d_{32}) no tempo zero (T0) e 12 dias (T12) de estocagem das emulsões produzidas a partir das gelatinas submetidas à reação a seco.....	72
Tabela 4.9. Grau de hidrólise (GH) e de acilação (GA) para as gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.....	76
Tabela 4.10. Análise de variância (ANOVA) para o grau de acilação.....	78
Tabela 4.11. Atividade (AE) e estabilidade emulsificante (ES) para as gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.....	80
Tabela 4.12. Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante.....	81
Tabela 4.13. Força de gel para as gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.....	83
Tabela 4.14. Análise de variância (ANOVA) para a força de gel.....	84
Tabela 4.15. Viscosidade para as gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.....	86
Tabela 4.16. Análise de variância (ANOVA) para a viscosidade.....	87
Tabela 4.17. Teor de proteína e cinzas para as gelatinas aciladas.....	89
Tabela 4.18. Teor de umidade e cloretos para as gelatinas aciladas.....	90
Tabela 4.19. Distribuição de massa molecular das gelatinas aciladas.....	93
Tabela 4.20. Massa molecular média (mW) e polidispersão das gelatinas aciladas.....	95
Tabela 4.21. Diâmetro de gota para as emulsões obtidas em diferentes condições de homogeneização.....	103
Tabela 4.22. Diâmetro de gota para as emulsões obtidas a partir das gelatinas aciladas.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Ilustração esquemática de gotas de óleo estabilizadas pela ação de emulsificantes (A) e por estabilizantes (B).....	14
Figura 2.2 Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões.....	15
Figura 2.3. Estrutura tridimensional da molécula de colágeno.....	18
Figura 2.4. Perfil de massa molecular de gelatinas tipos A e B.....	20
Figura 2.5. Massa molecular média das cadeias α , β e γ	20
Figura 2.6. Reação geral de acilação.....	23
Figura 2.7. Mecanismo da reação de acilação com cloretos de acila.....	24
Figura 2.8. Reação teórica de acilação da gelatina com cloreto de lauroíla.....	25
Figura 3.1. Fluxograma de processo para avaliação da reação em diferentes pHs.....	32
Figura 3.2. Fluxograma de processo para avaliação do balanço de massa da reação.....	33
Figura 3.3. Fluxograma de processo para avaliação da cinética da reação.....	34
Figura 3.4. Fluxograma de processo para reação conduzida a seco sem ajuste de pH.....	35
Figura 3.5. Fluxograma de processo para reação conduzida a seco com ajuste de pH.....	36
Figura 3.6 Fluxograma de processo da reação de acilação da gelatina.....	39
Figura 3.7. Procedimento para a análise de TNBS.....	43
Figura 3.8. Desenho esquemático da pipeta padrão utilizada para análise de viscosidade.....	47
Figura 4.1. Bloom e atividade emulsificante final das gelatinas aciladas em diferentes pHs.....	57
Figura 4.2. Estabilidade emulsificante das gelatinas aciladas em diferentes pHs.....	58

Figura 4.3. Resultados finais do balanço de massa e composição dos produtos da reação em base seca.....	59
Figura 4.4. Mecanismo de formação do ácido carboxílico durante a reação.....	60
Figura 4.5. Atividade e estabilidade emulsificante das gelatinas obtidas em diferentes tempos de reação.....	62
Figura 4.6. Grau de hidrólise (GH) das gelatinas obtidas em diferentes tempos de reação.....	63
Figura 4.7. Perfil de eletroforese para as gelatinas submetidas à reação a seco.....	67
Figura 4.8. Análise de GPC para as gelatinas submetidas à reação a seco provenientes da gelatina GP1.....	68
Figura 4.9. Análise de GPC para as gelatinas submetidas à reação a seco provenientes da gelatina GP2.....	70
Figura 4.10. Distribuição de gotas no tempo zero (T0) de estocagem.....	72
Figura 4.11. Distribuição de gotas após 12 dias (T12) de estocagem.....	73
Figura 4.12. Ilustração da separação de fases após 12 dias de estocagem.....	74
Figura 4.13. Superfícies de resposta para o grau de acilação das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.....	79
Figura 4.14. Superfícies de resposta para a atividade emulsificante das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.....	82
Figura 4.15. Superfícies de resposta para a força de gel das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.....	85
Figura 4.16. Superfícies de resposta para a viscosidade das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.....	88
Figura 4.17. Perfil de distribuição de ponto isoelétrico das gelatinas aciladas em pH 8,4 e 9,5.....	92
Figura 4.18. Perfil de distribuição de ponto isoelétrico das gelatinas aciladas em pH 8, 10,6 e 11.....	92

Figura 4.19. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas “controle” obtidas em diferentes pHs.....	97
Figura 4.20. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 8,0.....	98
Figura 4.21. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 8,4.....	98
Figura 4.22. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 9,5.....	99
Figura 4.23. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 10,6.....	99
Figura 4.24. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 11,0.....	100
Figura 4.25. Avaliação visual das emulsões após 10 dias de produção das mesmas.....	102
Figura 4.26. Microscopia das emulsões após 10 dias da produção das mesmas.....	104
Figura 4.27. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 8,0.....	106
Figura 4.28. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 8,4.....	106
Figura 4.29. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 9,5.....	107
Figura 4.30. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 10,6.....	108
Figura 4.31. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 11,0.....	108

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 3.1. Número de grupos amino livres.....	43
Equação 3.2. Grau de acilação.....	44
Equação 3.3. Atividade emulsificante.....	45
Equação 3.4. Estabilidade emulsificante.....	45
Equação 3.5. Viscosidade.....	47
Equação 3.6. Diâmetro médio superficial.....	51
Equação 4.1. Quantidade de NH_2 disponível para a reação.....	55
Equação 4.2. Quantidade de NH_2 presente no aminoácido.....	55
Equação 4.3. Sentido e efeito de cada variável no grau de acilação da gelatina.....	77
Equação 4.4. Sentido e efeito de cada variável na atividade emulsificante da gelatina.....	81
Equação 4.5. Sentido e efeito de cada variável na força de gel da gelatina.....	84
Equação 4.6. Sentido e o efeito de cada variável na viscosidade da gelatina.....	87

Dissertação de mestrado

AUTORA: Cathia dos Reis

TÍTULO: Avaliação da capacidade emulsificante de gelatina acilada

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Depto. Engenharia de Alimentos – FEA - UNICAMP

RESUMO GERAL

A gelatina é uma proteína de alto interesse e valor comercial, no entanto seu uso como agente emulsificante ainda é bastante restrito devido às limitações tecnológicas. O objetivo geral deste trabalho foi investigar as alterações nas propriedades físicas, químicas e funcionais da gelatina de origem bovina quando submetida à modificação química através da reação de acilação com um cloreto de ácido graxo, bem como avaliar seu desempenho em aplicações com finalidade tecnológica de emulsificação. Para a definição das condições ótimas de reação de acilação (pH de reação e concentração do reagente), foram avaliados o grau de acilação (GA), a atividade (AE) e estabilidade emulsificante (ES), a força de gel (Bloom) e a viscosidade. As gelatinas aciladas obtidas foram também caracterizadas quanto aos teores de proteína, cinzas, umidade, cloretos, distribuição de peso molecular, ponto isoeletrico e espectroscopia de infravermelho. As emulsões (20% óleo) produzidas utilizando as gelatinas aciladas foram avaliadas através de medidas de separação visual de fases e determinação de tamanho de gota por microscopia ótica. Os resultados mostraram que a reação de acilação apenas tornou-se efetiva quando realizada em pH extremamente alcalino (pH 11,0), porém a força de gel e a viscosidade diminuíram nestas

condições. As gelatinas aciladas com maior força de gel e viscosidade mostraram maior efeito na estabilização das emulsões do que o grau de acilação. Como consequência, as gelatinas “controle” apresentaram melhor atuação na estabilização das emulsões. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição de ponto isoeletrico das gelatinas e nos espectros de infravermelho obtidos. No entanto, as gelatinas aciladas em pHs mais altos (pH 10,6 e 11,0) apresentaram aumento da massa molecular média quando comparadas as gelatinas “controle” devido a introdução do grupo acila na cadeia de gelatina.

Master degree thesis

AUTHOR: Cathia dos Reis

TITLE: Emulsifying capacity evaluation of acylated gelatin

SUPERVISOR: Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Dept. Food Engineering – FEA - UNICAMP

ABSTRACT

Gelatin is a protein widely used in food industry. However, its use as an emulsifier agent is still restricted due to technological limitations. The objective of this work was to investigate the alterations at physical, chemical and functional properties of bovine gelatin after it has been subjected to a chemical modification through the acylation with a fatty acid chloride. In addition, the behavior of this acylated gelatin as emulsifier was evaluated. The acylation degree (AD), the emulsifying activity (EA) and stability (ES), the gel strength (or Bloom) and the viscosity of the modified gelatins were evaluated to define the more adequate conditions of the acylation reaction (pH and reactive concentration). The acylated gelatins were characterized regarding to protein, ash, moisture, chloride content, molecular weight distribution, isoelectric point distribution and infrared spectroscopy. O/W emulsions (20% oil) stabilized with acylated gelatins were evaluated through visual phase separation measurements and determination of drop size using optical microscopy. The results showed that the acylation reaction was effective only at very high pH (around 11.0). However, the gel strength and viscosity decreased at higher pH of reaction. Acylated gelatins with higher gel strength and viscosity showed more pronounced effect on emulsions stability than the acylation degree. As a

consequence, the “control” gelatins presented better emulsion stability than acylated ones. It was not observed significant differences at isoelectric point distribution and infrared spectrum obtained for the acylated gelatins. However, acylated gelatins at higher pH (pH 10.6 and 11.0) showed an increase of the mean molecular mass when compared to the “control” gelatins due to the introduction of acyl groups to the gelatin chain.

CAPÍTULO 1. Introdução e objetivos

1.1. Introdução

As proteínas possuem grande versatilidade em aplicações alimentícias e farmacêuticas devido em parte às suas propriedades físico-químicas e também à sua natureza anfifílica, ou seja, a presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula (KINSELLA; WHITEHEAD, 1988). Dentre as principais propriedades funcionais das proteínas, destacam-se, sua solubilidade, poder de absorção de água, modificações reológicas que conferem ao produto, atividade e estabilidade emulsificante, capacidade de formação de gel, formação e estabilização de espumas e absorção de gordura (MAGDASSI, 1996).

As propriedades físicas dos géis, emulsões e espumas formadas ou estabilizadas pelas proteínas podem ser afetadas por fatores intrínsecos (estrutura macromolecular) ou extrínsecos (pH, força iônica, temperatura, etc). Variações nas condições do solvente (como por exemplo, o pH) podem influenciar na estrutura da proteína devido à alterações nas cargas com conseqüente influência nas interações eletrostáticas e hidrofóbicas (KINSELLA; WHITEHEAD, 1988). No entanto, as propriedades funcionais das proteínas podem também ser modificadas através de tratamentos físicos, químicos ou biológicos levando a alterações de conformação e estrutura. A modificação química de proteínas é o principal método utilizado para produzir ingredientes com melhores propriedades funcionais para as indústrias de alimentos e farmacêutica (DJAGNY; WANG; XU, 2001c). Estas modificações afetam tanto as interações entre as moléculas da proteína quanto sua atividade de superfície (KINSELLA; WHITEHEAD, 1988). A atividade de superfície das proteínas depende da sua hidrofobicidade superficial ou da

natureza da ligação dos grupos hidrofóbicos assim como da quantidade dessas ligações (LIN; CHEN, 2006b).

Na prática, existe um número limitado de cadeias laterais de aminoácidos disponíveis para modificação em proteínas. Um resumo desses grupos e possíveis reações podem ser vistos na Tabela 1.1 (KINSELLA; WHITEHEAD, 1988).

Tabela 1.1. Cadeias laterais de aminoácidos utilizados para modificações químicas em proteínas (KINSELLA; WHITEHEAD, 1988).

<i>Grupo</i>	<i>Reação</i>
Amino (lisina)	Acilação; Alquilação
Carbonila (asparagina, glutamina)	Esterificação; Formação de amida
Dissulfeto (cistina)	Redução
Sulfidril (cistina)	
Tioéter (metionina)	
Imidazol (histidina)	Alquilação; Oxidação
Índol (triptofano)	
Fenólico (fenilalanina)	Acilação
Guanidino (arginina)	Condensação via dicarbonila

A gelatina é uma proteína de origem animal cujas propriedades dependem do processo de obtenção e do tipo de matéria-prima utilizada. Devido a suas características funcionais, associada a sua habilidade em formar um gel transparente sob determinadas condições, é uma proteína de alto interesse e valor comercial, no entanto seu uso como agente emulsificante ainda é bastante restrito devido a limitações tecnológicas para a aplicação (DJAGNY; WANG; XU, 2001c). A gelatina possui grande número e variedade de grupos efetivamente reativos ao longo de sua cadeia, o que aumenta seu potencial frente a modificações químicas. Sua alta solubilidade em água permite um melhor controle e maior velocidade das

reações químicas durante a modificação, no entanto limita a escolha dos reagentes (WARD; COURTS, 1977).

Na literatura existem poucos trabalhos relacionados a modificações químicas da gelatina com o intuito de aumentar sua capacidade emulsificante, sendo a maioria deles relacionados à reação de esterificação ou de acilação com anidridos succínico ou acético em gelatinas de origem suína ou gelatina hidrolisada. Dessa forma, a avaliação de outros tipos de modificação química utilizando gelatinas obtidas a partir de outras matérias-primas e processos, como por exemplo, a acilação de uma gelatina de origem bovina utilizando cloretos de acila, torna-se importante na tentativa de se obter outras opções de gelatina com maior poder de emulsificação para diferentes tipos de aplicação.

1.2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar as alterações que ocorrem nas propriedades físicas e na funcionalidade da gelatina de origem bovina quando submetida à modificação química através da reação de acilação com um cloreto de ácido graxo, assim como avaliar seu desempenho como agente emulsificante.

Os objetivos específicos foram:

- Encontrar as condições ideais da reação de acilação através de delineamento experimental para as variáveis independentes: pH da reação e concentração de reagente;
- Caracterizar a gelatina obtida após acilação com cloreto de ácido graxo, verificando as alterações em suas propriedades físicas e funcionais;

- Avaliar o desempenho das gelatinas modificadas na estabilização de emulsões obtidas em condições ideais de homogeneização.

CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica

2.1. Proteínas

Proteínas são polímeros altamente complexos constituídos de mais de 20 aminoácidos diferentes. Uma vez que os aminoácidos contêm tanto um grupo carboxílico (ácido) quanto um grupo amino (básico), as proteínas se comportam como ácidos e bases e são chamadas de anfóteras ou anfílicas (DAMODARAN, 1996).

Em pH neutro, os grupos amino e carboxílico estão ionizados e a molécula é um íon dipolar. O pH no qual o íon dipolar está eletricamente neutro é chamado de pI . Quando este íon é titulado com ácido, o grupo COO^- se torna protonado e o pH no qual a concentração de COO^- é igual à de $COOH$ é chamado de pK_{a1} . Quando este íon é titulado com uma base, o grupo NH_3^+ se torna desprotonado e o pH no qual a concentração de NH_3^+ é igual à de NH_2 é chamado de pK_{a2} . A Tabela 2.1 mostra os valores de pK_a e pI de diferentes aminoácidos isolados e em proteínas. O valor de pK_a de um aminoácido em uma cadeia de proteína (pK_{aR}) pode dar uma noção da reatividade dessa proteína frente a um tratamento químico. A arginina, por exemplo, é o aminoácido com maior valor de pK_a quando avaliado na cadeia de proteína, o que a torna bastante resistente a tratamentos químicos, exceto quando em meio extremamente alcalino (DAMODARAN, 1996).

Tabela 2.1. Valores de pKa e pI de aminoácidos e proteínas a 25°C (Fonte: DAMODARAN, 1996).

<i>Aminoácido</i>	<i>pK_{a1} (α-COOH)</i>	<i>pK_{a2} (α-NH₃)</i>	<i>pK_{aR}</i>		<i>pI</i>
			<i>AA</i>	<i>Cadeia lateral</i>	
Alanina	2,34	9,69	-	-	6,00
Arginina	2,17	9,04	12,48	>12,00	10,76
Asparagina	2,02	8,80	-	-	5,41
Ácido aspártico	1,88	9,60	3,65	4,60	2,77
Cistina	1,96	10,28	8,18	8,80	5,07
Glutamina	2,17	9,13	-	-	5,65
Ácido glutâmico	2,19	9,67	4,25	4,60	3,22
Glicina	2,34	9,60	-	-	5,98
Histidina	1,82	9,17	6,00	7,00	7,59
Isoleucina	2,36	9,68	-	-	6,02
Leucina	2,30	9,60	-	-	5,98
Lisina	2,18	8,95	10,53	10,20	9,74
Metionina	2,28	9,21	-	-	5,74
Fenilalanina	1,83	9,13	-	-	5,48
Prolina	1,94	10,60	-	-	6,30
Serina	2,20	9,15	-	-	5,68
Treonina	2,21	9,15	-	-	5,68
Triptofano	2,38	9,39	-	-	5,89
Tirosina	2,20	9,11	10,07	9,60	5,66
Valina	2,32	9,62	-	-	5,96

pK_{aR} = Valores de pK_a em aminoácidos (AA) e proteínas (Cadeia lateral).

Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com o grau de interação das cadeias laterais com a água. A Tabela 2.2 mostra os valores de hidrofobicidade dos grupos laterais dos aminoácidos. A hidrofobicidade pode ser definida como a variação do excesso de energia livre de um soluto dissolvido em água em relação ao mesmo soluto dissolvido em um solvente orgânico em

condições similares, sendo denominado ΔG_t . Os aminoácidos com valores positivos de ΔG_t são hidrofóbicos e em proteínas, tendem a se localizar no interior da estrutura das mesmas. Já os que apresentam valores negativos são hidrofílicos e tendem a se localizar na superfície das mesmas. A lisina, apesar de ser considerada hidrofílica, apresenta ΔG_t positivo, devido principalmente aos quatro grupos CH_2 em sua molécula, que preferem se manter em meio orgânico ao invés de meio aquoso (SIKORSKI, 2002).

Tabela 2.2. Hidrofobicidade dos grupos laterais de aminoácidos (Fonte: SIKORSKI, 2002).

<i>Aminoácido</i>	<i>ΔG_t (etanol $\rightarrow$ água) kJ/mol</i>
Alanina	3,1
Arginina	3,1
Asparagina	-0,04
Ácido aspártico	2,2
Cistina	4,2
Glutamina	-0,4
Ácido glutâmico	2,3
Glicina	0,0
Histidina	2,1
Isoleucina	12,4
Leucina	10,1
Lisina	6,2
Metionina	5,4
Fenilalanina	11,1
Prolina	10,8
Serina	0,2
Treonina	1,8
Triptofano	12,5
Tirosina	12,0
Valina	7,0

Dentre as propriedades funcionais e tecnológicas das proteínas destacam-se: a solubilidade, a absorção e a capacidade de se ligar à água, as modificações reológicas que conferem aos produtos (viscosidade, textura, entre outros), a atividade emulsificante e a estabilização de emulsões, a capacidade de formação de gel, a formação e estabilização de espuma e a absorção de gordura (MAGDASSI, 1996).

As características do meio podem influenciar as propriedades funcionais das proteínas, destacando-se: a natureza do solvente, o pH, a força iônica, a temperatura e a presença de interfaces (MAGDASSI, 1996). No entanto, o tamanho, formato, composição e sequência de aminoácidos são as características principais que governam a funcionalidade de uma proteína (DAMODARAN, 1996). Dentro de certos limites, é possível mudar algumas destas propriedades usando modificações químicas, hidrólise enzimática ou desnaturação protéica (MAGDASSI, 1996).

2.1.1. Propriedades emulsificantes das proteínas

Inúmeros alimentos naturais e processados são produtos do tipo emulsão em que as proteínas têm importante papel como emulsificantes, como em leites, margarinas, maioneses, molhos, pastas, sobremesas congeladas, entre outros (DAMODARAN, 1996). A estabilização de emulsões é um dos maiores problemas encontrados nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica e tem levado a inúmeros esforços na tentativa de estudar e desenvolver compostos surfactantes e estabilizantes cada vez melhores (DJAGNY; WANG; XU, 2001b).

Uma emulsão é composta por dois líquidos imiscíveis, normalmente óleo e água, sendo um dos líquidos disperso no outro na forma de pequenas gotas esféricas através do processo de homogeneização. Este processo geralmente é realizado em duas etapas, sendo a primária definida como a produção de uma emulsão diretamente a partir de dois líquidos imiscíveis e a secundária consiste na redução do tamanho das gotas existentes na emulsão primária (MCCLEMENTS, 2005).

Todas as emulsões são termodinamicamente instáveis e tendem a se romper com o tempo, resultando em duas fases líquidas separadas. O desafio do processamento de alimentos emulsionados é garantir que o tempo requerido para que uma inevitável separação de fases ocorra seja maior que o tempo de prateleira do produto em questão (MAGDASSI, 1996).

Para produzir emulsões cineticamente estáveis é necessária a adição de emulsificantes e/ou estabilizantes. Os emulsificantes são espécies químicas que promovem a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial. Existem dois tipos de emulsificantes usados no processamento de alimentos: os surfactantes de baixa massa molecular, como monoglicerídeos, polissorbatos e a lecitina, e os emulsificantes macromoleculares como as proteínas. Já os estabilizantes, normalmente atuam através de dois mecanismos: via modificação da viscosidade ou gelificação da fase contínua aquosa. Nesse caso algumas proteínas e polissacarídeos são bastante utilizados (DICKINSON, 2003). No entanto, a ação das proteínas como emulsificante se deve principalmente à sua natureza anfifílica. As proteínas migram espontaneamente para a interface ar-água ou óleo-água, o que indica que a energia livre destas macromoléculas é

menor na interface do que na fase contínua aquosa. Além disso, diferente dos surfactantes de baixa massa molecular, as proteínas formam um forte filme viscoelástico na interface com habilidade de resistir a choques mecânicos durante a estocagem e o manuseio (DAMODARAN, 1996).

A Figura 2.1 ilustra a diferença no mecanismo de estabilização pela ação de emulsificantes e estabilizantes.

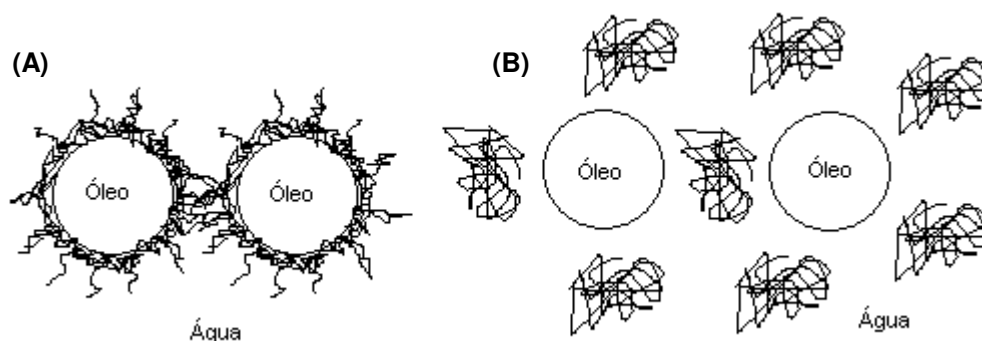


Figura 2.1. Ilustração esquemática de gotas de óleo estabilizadas pela ação de emulsificantes (A) e por estabilizantes (B) (Fonte: GARTI; LESER, 2001).

Os principais mecanismos de desestabilização de emulsões são mostrados na Figura 2.2. A cremação gravitacional ocorre quando a fase dispersa é menos densa que a contínua, porém não existe coalescência. Já a sedimentação, ocorre quando as gotas são mais densas que o meio contínuo. A floculação ocorre quando as gotas emulsificadas se associam em flocos sem a destruição das gotas individuais e a coalescência das gotas, quando as paredes das gotas são destruídas e existe a formação de gotas maiores (DICKINSON, 1992).

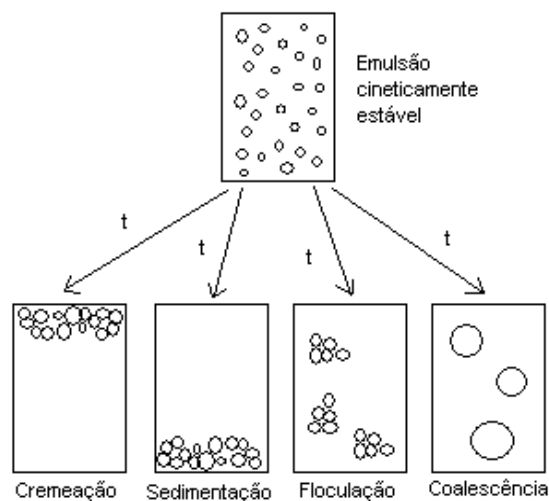


Figura 2.2. Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões (Fonte: MCCLEMENTS, 2005).

O tamanho médio da gota de uma emulsão depende da adsorção das moléculas surfactantes às gotas de óleo formadas durante o processo de emulsificação. Esse fenômeno ocorre simultaneamente com a coalescência das gotas, de forma que, quanto mais rápida as moléculas se ancoram na interface entre a gota de óleo e o meio aquoso, menor será o tamanho médio de gota no final do processo. No caso das proteínas, a difusão das mesmas para a interface ocorre de maneira mais lenta que os surfactantes de baixa massa molecular, o que pode promover um aumento do tamanho das gotas. No entanto, a propriedade estabilizante das proteínas se deve também a características reológicas e eletrostáticas do filme formado, reduzindo a coalescência das gotas (SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 2004).

A solubilidade tem um importante papel nas propriedades emulsificantes das proteínas. Uma vez que a estabilidade dos filmes de proteína na interface óleo-água é dependente de interações favoráveis com ambas as fases, certo grau

de solubilidade é necessário. Geralmente, proteínas com alta solubilidade no ponto isoelétrico, como a gelatina, apresentam máxima atividade e capacidade emulsificante nesse pH, principalmente devido à falta de carga e interações eletrostáticas repulsivas, maximizando a quantidade de proteína na interface e promovendo a formação de um filme altamente viscoelástico. No entanto, a falta de interações eletrostáticas repulsivas entre as gotas da emulsão poderia promover a floculação ou coalescência das gotas (DAMODARAN, 1996).

As propriedades emulsificantes das proteínas podem também ser correlacionadas com a sua hidrofobicidade. A habilidade de várias proteínas de diminuir a tensão na interface óleo-água e com isso aumentar a atividade emulsificante pode ser correlacionada com os valores de hidrofobicidade superficial, no entanto, esta correlação nem sempre é perfeita, sendo a flexibilidade molecular em alguns casos mais importante na determinação das propriedades emulsificantes desta macromolécula. A desnaturação parcial da proteína, em geral, aumenta a propriedade emulsificante da mesma devido ao aumento da flexibilidade molecular e a hidrofobicidade na superfície (DAMODARAN, 1996).

As propriedades das emulsões estabilizadas por proteínas podem ser afetadas por diversos fatores, que incluem fatores intrínsecos (pH, força iônica, temperatura, presença de surfactantes de baixa massa molecular, açúcares, fração volumétrica de óleo, tipo de proteína e a temperatura de fusão do óleo) e extrínsecos (tipo de equipamento, taxa de entrada de energia e a taxa de cisalhamento) (DAMODARAN, 1996). Além disso, apesar de as proteínas serem consideradas emulsificantes efetivos, em alguns casos, as condições de processo

de obtenção severas, como pH e temperatura, podem diminuir ou alterar suas propriedades de superfície (DJAGNY; WANG; XU, 2001b).

2.2. Gelatina

A gelatina é uma proteína de origem animal, solúvel em água, cujas propriedades dependem do processo de obtenção e da matéria-prima utilizada. Suas características funcionais associadas a sua habilidade em formar um gel transparente sob determinadas condições fazem com que seja uma proteína de alto interesse e valor comercial (DJAGNY; WANG; XU, 2001c).

As matérias-primas para produção de gelatina contêm colágeno em sua estrutura e são principalmente as peles bovinas e suínas, os ossos e os tecidos conectivos. O processo de obtenção se dá através de tratamento com ácidos e bases, seguido por extração com água quente, conferindo ao produto final alta viscosidade em água, composição química similar a do colágeno e capacidade de formação de gel sob resfriamento. Existem dois tipos de gelatina, que são classificadas de acordo com o tipo de matéria-prima que as originou: gelatina tipo A, que é produzida através de pele e ossos suínos; e a gelatina tipo B, produzida através de couro, ossos e aparas bovinas (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

A molécula de colágeno existe na forma de tripla hélice, a qual é composta de três cadeias denominadas α . Estas cadeias se posicionam em uma estrutura tridimensional, que pode ser vista na Figura 2.3. As cadeias α de colágeno são compostas por uma seqüência específica de aminoácidos, na qual a glicina é o aminoácido em maior concentração na cadeia, cerca de 1/3 do total, seguido pela

prolina e hidroxiprolina, com cerca de 1/5 do total cada uma. Os principais aminoácidos constituintes da gelatina, sua estrutura e as quantidades são mostrados nas Tabelas 2.3 e 2.4, mas a seqüência que mais aparece na cadeia é a glicina-prolina-hidroxiprolina. No geral, a cadeia é constituída por seqüências de peptídeos contendo predominantemente aminoácidos neutros alternados com seqüências em sua maioria polares contendo aminoácidos ácidos e básicos. No entanto, estudos de microscopia eletrônica mostraram áreas alternadas com aminoácidos polares e apolares (WARD; CURTS, 1977).

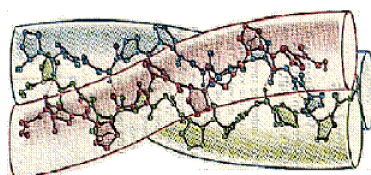
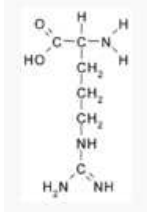
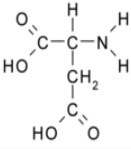
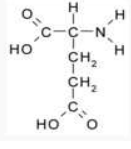
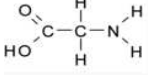
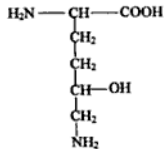
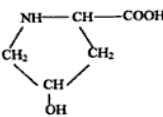
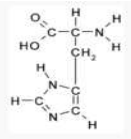
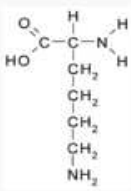
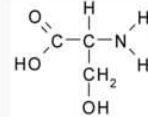
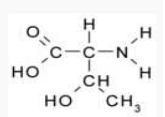


Figura 2.3. Estrutura tridimensional da molécula de colágeno (Fonte: Gelita do Brasil).

Tabela 2.3. Estrutura e quantidade dos principais aminoácidos hidrofóbicos presentes na gelatina.

Aminoácido	Alanina <chem>CC(N)C(=O)O</chem>	Isoleucina <chem>CC(C)C(C)C(N)C(=O)O</chem>	Leucina <chem>CC(C)C(C)C(N)C(=O)O</chem>	Metionina <chem>CSCC(C)C(N)C(=O)O</chem>	Fenilalanina <chem>c1ccccc1C(C)C(N)C(=O)O</chem>
Quantidade	8,79g/100g proteína	1,36g/100g proteína	2,72g/100g proteína	0,37g/100g proteína	2,10g/100g proteína
Aminoácido	Prolina <chem>C1CCN(C1)C(=O)O</chem>	Tirosina <chem>c1ccc(cc1)C(C)C(N)C(=O)O</chem>	Valina <chem>CC(C)C(C)C(N)C(=O)O</chem>		
Quantidade	13,38g/100g proteína	0,48g/100g proteína	2,05g/100g proteína		

Tabela 2.4. Estrutura e quantidade dos principais aminoácidos hidrofílicos presentes na gelatina.

Aminoácido	Arginina 	Ácido aspártico 	Ácido glutâmico 	Glicina 	Hidroxilisina 
Quantidade	7,18g/100g proteína	4,20g/100g proteína	9,25g/100g proteína	25,49g/100g proteína	1,00g/100g proteína
Aminoácido	Hidroxiprolina 	Histidina 	Lisina 	Serina 	Treonina 
Quantidade	12,90g/100g proteína	0,67g/100g proteína	3,24g/100g proteína	2,87g/100g proteína	1,47g/100g proteína

A distribuição de massa molecular das gelatinas tipo A e B é um pouco diferente. A gelatina tipo B normalmente apresenta uma maior proporção de frações de alta massa molecular, enquanto a tipo A possui uma distribuição mais homogênea, contendo maior quantidade de polipeptídios de baixa massa molecular. Estas diferenças estão associadas com as diferenças na maturidade do colágeno utilizado na obtenção desses dois tipos de gelatina, no entanto, as condições de processo podem ser alteradas a fim de se obter gelatinas com diferentes perfis de distribuição de massa molecular. A Figura 2.4 mostra o perfil de massa molecular de gelatinas tipos A e B, obtidos através da metodologia de cromatografia de permeação em gel (WARD; COURTS, 1977).

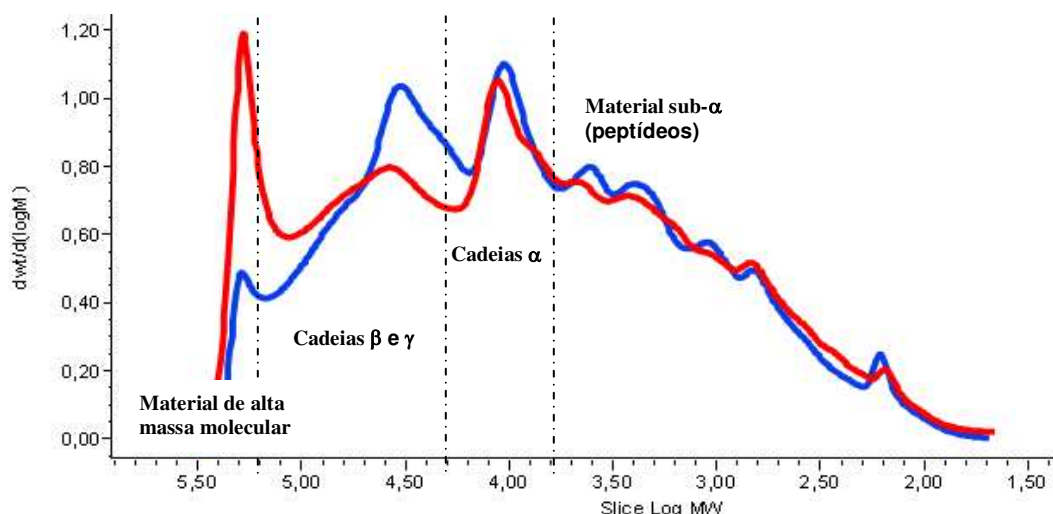


Figura 2.4. Perfil de massa molecular de gelatinas tipos A e B (Fonte: Gelita do Brasil).

O perfil apresenta picos que indicam as proporções relativas das diferentes frações, as quais são combinações da cadeia α que é a unidade básica. As cadeias β são formadas por duas diferentes cadeias α , a α_1 e a α_2 , provenientes de diferentes tipos de colágeno. Oligômeros de três cadeias normalmente aparecem na forma de tripla hélice e são chamados de cadeias γ . A Figura 2.5 mostra a massa molecular média das cadeias α , β e γ . A gelatina consiste de uma mistura destas diferentes frações de polipeptídios tendo uma massa molecular média estimada em cerca de 100.000 Da (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

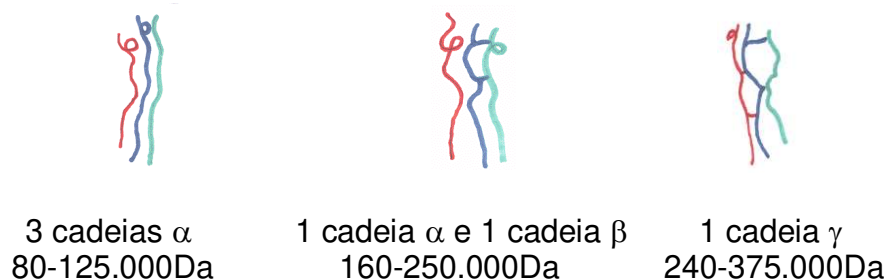


Figura 2.5. Massa molecular média das cadeias α , β e γ (Fonte: Gelita do Brasil).

Diferenças no perfil de distribuição de massa molecular afetam diretamente a funcionalidade da gelatina. Em termos gerais, uma maior proporção de frações de baixa massa molecular aumenta o tempo necessário para a formação de gel. Além disso, a força de gel, também conhecida como “Bloom” da gelatina, está relacionada à soma das cadeias α e β juntamente com os peptídeos de maior cadeia, já a viscosidade, pode ser correlacionada diretamente com a massa molecular média (WARD; COURTS, 1977).

Devido às diferenças de processo entre as gelatinas tipo A e B, elas apresentam diferentes valores de pI, sendo o da gelatina tipo A em torno de 7,0-9,0 e a tipo B de 5,0-6,0. Além da diminuição da solubilidade, o pI também afeta o comportamento da gelatina em combinação com outros hidrocolóides, principalmente se estes também forem carregados. Quando a gelatina é misturada a um hidrocolóide carregado com carga oposta, ocorre a neutralização das cargas e haverá separação de fases ou coacervação levando o gel a ficar turvo devido à precipitação de um dos hidrocolóides. Por outro lado, se a gelatina for combinada a um hidrocolóide com a mesma carga, efeitos sinérgicos podem ocorrer, pois a carga do sistema se move para longe do pI (WARD; COURTS, 1977).

As propriedades de superfície da gelatina se devem ao fato de as cadeias laterais possuírem grupos carregados e seqüências de aminoácidos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, assim como ocorre com as outras proteínas. Essa natureza anfílica da gelatina permite com que ela se ligue a superfícies de diferentes naturezas químicas. Dessa forma, ambas as partes hidrofílicas e hidrofóbicas tendem a migrar em direção a superfície, conseqüentemente

reduzindo a tensão superficial de soluções aquosas. Ao mesmo tempo, a gelatina possui diversas propriedades para proteger e estabilizar a superfície formada, como a capacidade de formação de gel e/ou aumento da viscosidade da fase aquosa. Esta propriedade multifuncional da gelatina é utilizada na produção e estabilização de espumas e emulsões (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

2.3. Modificações químicas nas proteínas

As propriedades funcionais das proteínas podem ser alteradas através de reações de modificação química das cadeias laterais, porém, apenas algumas destas reações são adequadas para modificações de proteínas alimentícias (DAMODARAN, 1996). A melhora da capacidade emulsificante das proteínas pode ser conseguida com a modificação da sua hidrofobicidade superficial. O aumento da hidrofobicidade da molécula de proteína pode promover alterações na estrutura ou massa molecular através da ligação covalente de grupos hidrofóbicos à molécula de proteína. Este é um dos métodos mais vantajosos, dado que o aumento da hidrofobicidade superficial pode ser controlado pelo número de grupos ligados por molécula de proteína, pelo tamanho da cadeia ligada ou pelo tipo de grupo hidrofóbico utilizado (MAGDASSI, 1996).

Dentre as técnicas utilizadas para modificação química, as reações de acetilação e succinilação dos derivados de grupos amino da lisina são bastante conhecidas por aumentar a carga negativa das moléculas de proteínas e com isso aumentar as forças repulsivas eletrostáticas intra e intermoleculares, favorecendo a formação e a estabilização das emulsões. Já a acilação, causa expansão molecular das moléculas de proteína, favorecendo a melhoria da funcionalidade

(MAGDASSI, 1996). A acilação aumenta a lipofilicidade e a capacidade de ligação de óleo das proteínas, facilitando a formação de novas estruturas micelares e outros tipos de agregados protéicos. Os grupos amino dos resíduos de lisina e os grupos SH da cistina são os grupos nucleofílicos mais reativos nas proteínas, sendo que a maioria das modificações químicas envolve esses grupos. A reação de acilação é a forma mais comum de ligação covalente nos grupos lisina (DAMODARAN, 1996).

2.3.1. Acilação

A acilação refere-se a toda reação que resulte da introdução de um grupo acila, por substituição ou adição, em um composto orgânico. A Figura 2.6 mostra a reação geral de acilação com um composto orgânico.

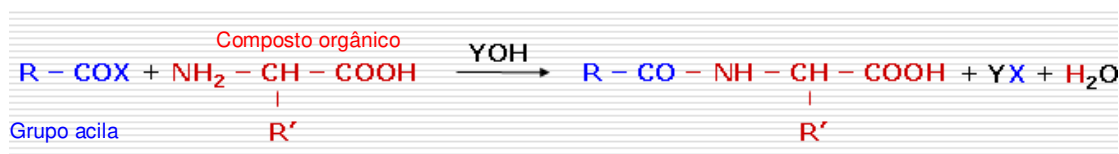


Figura 2.6. Reação geral de acilação, onde R e R' representam os radicais do grupo acila e do composto orgânico, respectivamente e YX o sal formado após a reação.

De acordo com Belitz, Grosch e Schieberle (2009), são considerados cinco tipos de processos, segundo a forma de ligação que se efetua:

a) Substituição de um hidrogênio em um grupo hidroxila de álcoois ou fenóis (O-alkilação/acilação);

b) Substituição de um hidrogênio ligado a um átomo de nitrogênio trivalente (N-alquilação/acilação);

c) Adição de um haleto ou éster de alquila a um átomo de nitrogênio pentavalente;

d) Substituição de um hidrogênio em hidrocarbonetos (C-alquilação/acilação);

e) Adição de compostos alquil-metálicos (O-alquilação/C-alquilação).

No processo de acilação, a ligação covalente nos grupos amino pode ser feita através de:

- Reação com anidridos derivados de ácidos carboxílicos, como o anidrido acético, por exemplo;

- Reações com ésteres de N-hidroxisuccinamida;

- Reação com cloretos de acila de diferentes tamanhos de cadeia, como mostra a Figura 2.7 (MAGDASSI, 1996);



Figura 2.7. Mecanismo da reação de acilação com cloretos de acila.

Os cloretos de acila, como por exemplo, o cloreto de lauroíla (C12), são haletos de acila que intermediam muitas das reações químicas de acilação (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). A Figura 2.8 mostra a reação teórica dos grupos funcionais da gelatina com terminação amino com o cloreto de lauroíla.

No caso da gelatina, os aminoácidos com terminais amino disponíveis para a reação são a arginina, lisina e hidroxilisina.

Representação dos resíduos de aminoácidos disponíveis para a reação de acilação em uma gelatina padrão

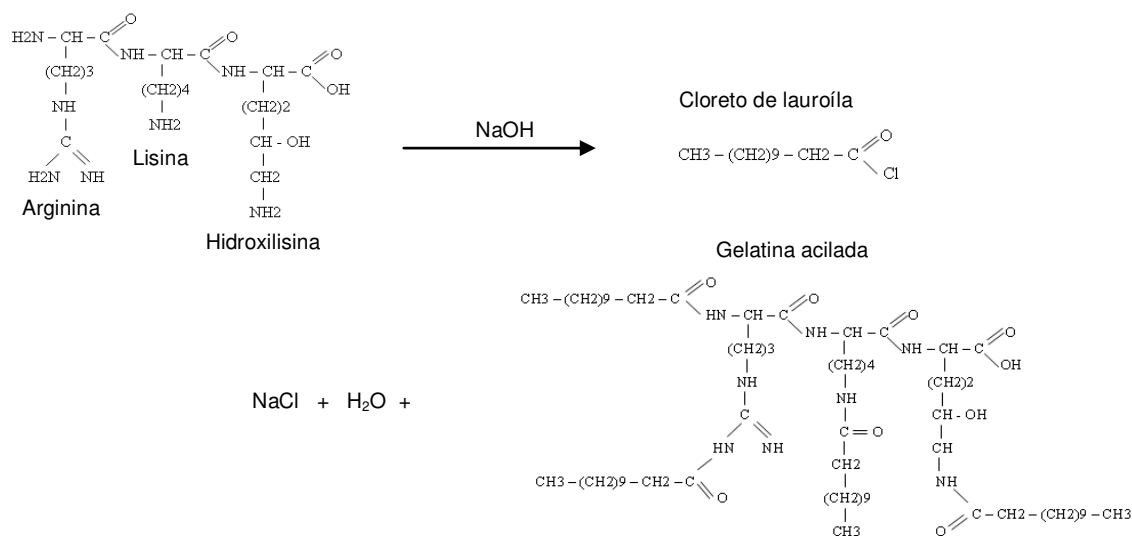


Figura 2.8. Reação teórica de acilação da gelatina com cloreto de lauroíla.

Uma vez que as formas protonadas e desprotonadas de uma cadeia lateral reativa possuem propriedades químicas diferentes, o pH tem uma importante influência sobre a acilação destes grupos. Geralmente, a reatividade aumenta com o aumento da nucleofilicidade e com a diminuição da protonação. A taxa de acilação é altamente reduzida ou até mesmo suprimida quando o pH está significativamente abaixo do pKa do grupo funcional. Desta forma, os grupos amino tendem a tornarem-se mais reativos quando em pH altos (MAGDASSI, 1996).

A acilação dos grupos do aminoácido lisina com anidridos ácidos (por exemplo, anidrido succínico) é a mais estudada para diferentes tipos de proteínas.

A proteína hidrolisada de soja, quando acilada com anidrido succínico apresentou maior atividade de superfície se comparada com a proteína nativa devido ao aumento da hidrofobicidade (LIN; CHEN, 2006b).

As propriedades de formação de espuma da proteína hidrolisada de canola, após reação de acilação com cloretos de acila de diferentes tamanho de cadeia (C6 a C16), foram avaliadas em comparação à BSA (albumina bovina sérica) e SDS (dodecil sulfato de sódio). Os peptídeos de canola acilados com cloretos de acila C10, C12 e C14, mostraram alto grau de pureza e hidrofobicidade superficial crescente de acordo com o tamanho de cadeia acila (do C10 para o C14). Os melhores resultados foram obtidos para os peptídeos acilados com cloretos de acila de cadeias C10 e 12, que formaram uma espuma de textura mais estável do que a formada pelos padrões. Além disso, também foi observada uma diminuição da tensão superficial em emulsões estabilizadas por estes peptídeos acilados, sendo para C10 o melhor resultado, seguido por C12 e C14 (SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 2001). Em outro estudo com os mesmos autores, foi observada uma diminuição do tamanho médio de gota nas emulsões e maior estabilidade quanto maior o tamanho de cadeia acila, também devido ao aumento da hidrofobicidade (SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 2004).

2.3.2. Reações de modificação da gelatina

As modificações químicas da gelatina normalmente ocorrem em meio aquoso devido a seu menor custo e conveniência como solvente. Outras alternativas são o uso de amônia anidra liquefeita, dimetilsufóxido, formamida ou dimetilformamida. Quando nenhum dos solventes é adequado, se torna

necessário conduzir a reação com a gelatina em forma de uma suspensão de finos grãos, o que retarda a velocidade da reação e a torna menos eficiente, porém não ocorre a degradação hidrolítica do reagente. Com o intuito de diminuir a degradação na molécula de gelatina, é necessário que se mantenha a temperatura de reação abaixo de 80°C, a não ser que a reação ocorra em um período de tempo bastante curto. Já a temperatura mínima para evitar a gelificação é em torno de 35°C. O limite de pH normalmente está entre 3 e 10, novamente com exceção para casos em que a reação ocorre de forma rápida. A necessidade de uma agitação eficiente durante essas reações é crítica, principalmente se o reagente a ser usado é um agente reticulante. Após a reação, normalmente se faz necessário o uso de um ácido ou base para ajuste final do pH da gelatina (WARD; COURTS, 1977).

Alguns estudos específicos utilizando gelatina de origem suína, como o conduzido por Djagni, Wang e Xu (2001a), mostraram os efeitos no grau de esterificação da gelatina utilizando diferentes condições de reação com ácidos graxos como tempo, temperatura, pH, quantidade de água, proporção reagente:gelatina e tipo de reagente utilizado (DJAGNY; WANG; XU, 2001a). Em continuação a este estudo, mostraram as alterações que a esterificação da gelatina acarretou em algumas propriedades, como a diminuição da solubilidade, da força de gel e da viscosidade, e um aumento na hidrofobicidade, no índice de estabilidade e estabilidade térmica de emulsões (DJAGNY; WANG; XU, 2001b).

Toledano e Magdassi (1997) conduziram um estudo cujo objetivo era o aumento da atividade de superfície da gelatina através da ligação covalente com cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos de diferentes tamanhos. De acordo com o

estudo, o tamanho da cadeia ligada à proteína não teve efeito no grau de esterificação final da proteína (ou seja, na quantidade de cadeias hidrofóbicas ligadas à gelatina), porém, o grau de esterificação aumentou com o aumento da proporção de éster por grama de gelatina (TOLEDANO; MAGDASSI, 1997).

Em continuação a esse estudo, também foram avaliadas as propriedades de emulsificação e formação de espuma dessas gelatinas modificadas. Foi observada uma diminuição do tamanho de gota das emulsões produzidas com as gelatinas modificadas e conseqüentemente, maior estabilidade dessas emulsões. Além disso, também foi encontrada uma maior habilidade de formação e estabilidade de espuma (TOLEDANO; MAGDASSI, 1998). Em outro estudo, surfactantes derivados de gelatina foram preparados a partir da acilação ou da ligação covalente de grupos hidrofóbicos provenientes de anidrido succínico a moléculas de gelatina hidrolisada. Como resultado, foi encontrada uma maior atividade de superfície para as gelatinas modificadas e um aumento da capacidade emulsificante e de formação de espuma (LIN; CHEN, 2006a).

CAPÍTULO 3. Material e Métodos

3.1. Material

Os materiais utilizados para a produção das gelatinas aciladas foram a gelatina de origem bovina tipo B cedida pela Gelita do Brasil (Cotia, Brasil), o cloreto de lauroíla adquirido da Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça) e as resinas aniônica 4200 e catiônica 1200 Amberjet da Lapidágua (São Paulo, Brasil).

Para a produção das emulsões foram adquiridos o óleo de soja Soya da Bunge Alimentos S.A (Brasil), comprado em mercado local e a azida sódica (NaN_3), adquirida da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA).

Para a avaliação das gelatinas modificadas foram utilizados, o ácido trinitrobenzenosulfônico dihidratado p.a (TNBS) e o dodecil sulfato de sódio (SDS), adquiridos da Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça). Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Ensaios preliminares

Para determinação das condições ideais para o processo de acilação da gelatina foram conduzidos experimentos preliminares baseados nos trabalhos de TUROWSKI et al. (1991), SÁNCHEZ-VIOQUE et al. (2001 e 2004) e MALABAT et al. (2001). A quantidade do reagente de acilação, cloreto de lauroíla, a ser adicionada nos ensaios preliminares foi definida com base na estequiometria da reação, o que resultou em 6% (m/m) sobre a gelatina.

3.2.1.1. Avaliação do efeito do pH na reação de acilação

Foram avaliados os pHs de 8 a 11, e a reação, conduzida como mostra o fluxograma da Figura 3.1.

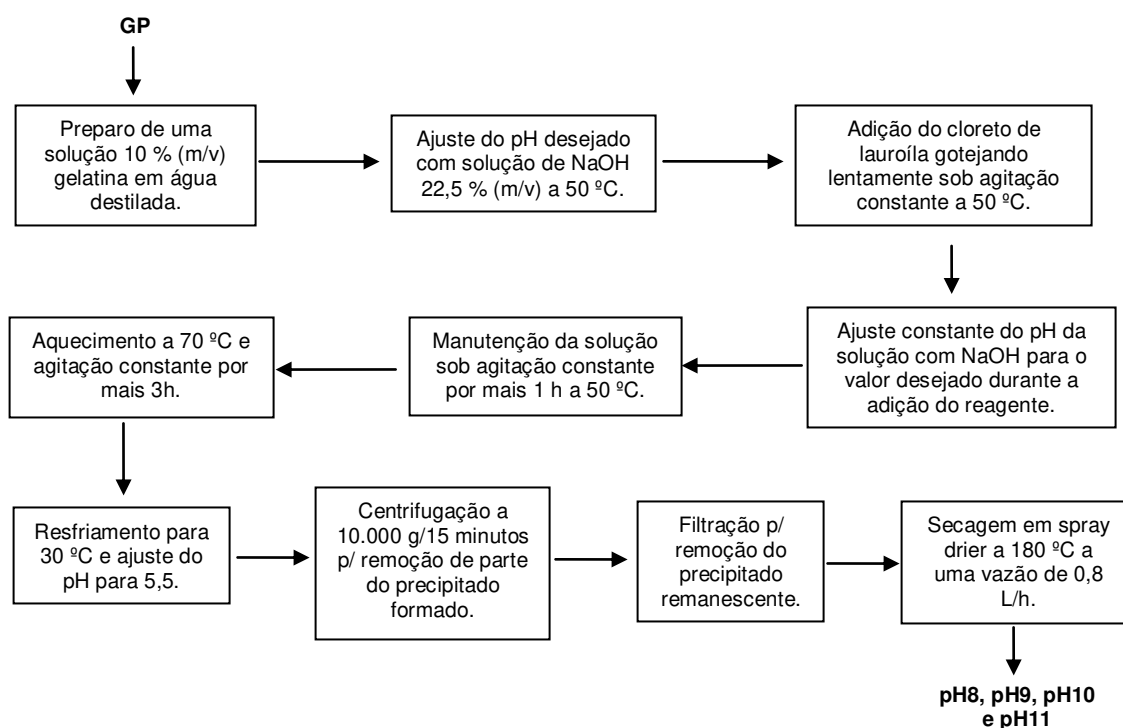


Figura 3.1. Fluxograma de processo para avaliação da reação em diferentes pHs.

GP: gelatina padrão não submetida à reação de acilação. **pH8; pH9; pH10 e pH11:** gelatinas aciladas em pH 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

As amostras foram caracterizadas quanto à força de gel (item 3.2.3.3) e atividade e estabilidade emulsificante (item 3.2.3.2).

3.2.1.2. Avaliação do balanço de massa da reação

Para avaliação do balanço de massa da reação, seguiu-se o procedimento descrito na Figura 3.2, cujas siglas em negrito referem-se às amostras que foram

caracterizadas para o balanço em relação a proteínas (item 3.2.3.5), cinzas (item 3.2.3.6), umidade (item 3.2.3.7) e cloretos (item 3.2.3.8).

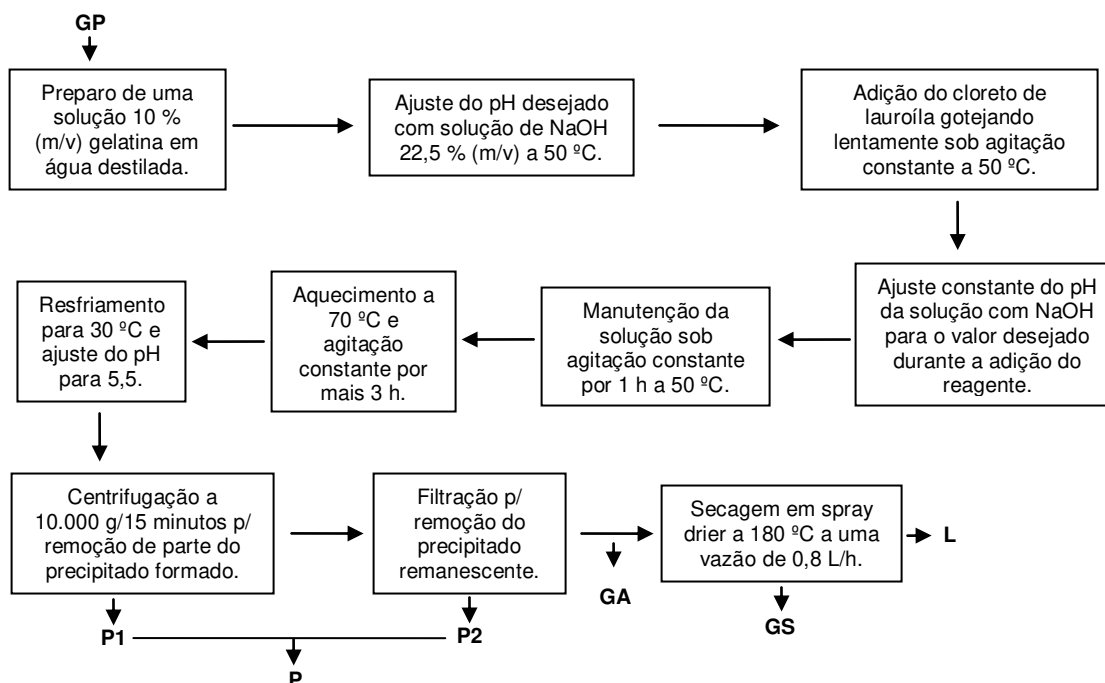


Figura 3.2. Fluxograma de processo para avaliação do balanço de massa da reação. **GP**: gelatina padrão; **GA**: gelatina acilada; **P**: precipitado formado durante a reação, formado por P1 e P2; **GS**: gelatina seca; **L**: perda de gelatina no ciclone do spray-drier.

3.2.1.3. Determinação do tempo de reação

Para avaliação da cinética de reação, amostras foram retiradas e caracterizadas em diferentes tempos durante a reação de acilação, conforme mostra a Figura 3.3. A concentração inicial da solução de gelatina foi aumentada para 30 % visando aumento do rendimento da reação. O pH foi fixado em 11 por ter levado à maior atividade emulsificante final da gelatina. Além do tempo definido para a reação de 4 horas (TUROWSKI et al., 1991), optou-se por seguir a reação

por mais duas horas a fim de verificar o término da reação, em um total de 6 horas.

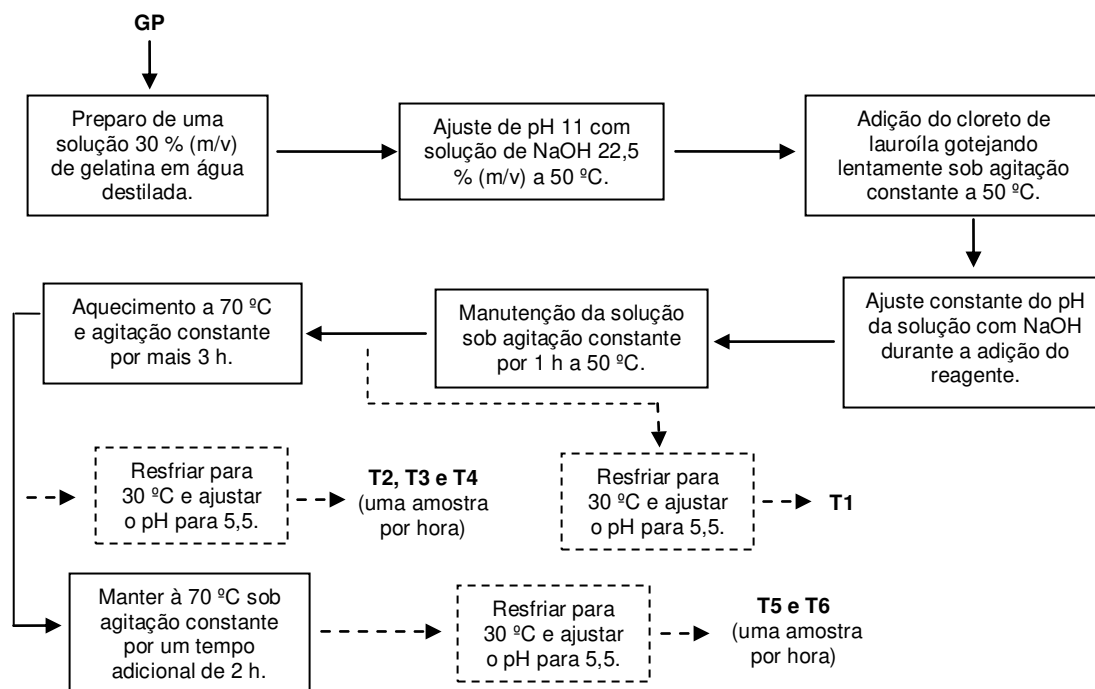


Figura 3.3. Fluxograma de processo para avaliação da cinética da reação. **GP:** gelatina padrão não submetida à reação de acilação; **T1, T2, T3, T4, T5 e T6:** gelatinas aciladas durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas de reação respectivamente.

As amostras foram caracterizadas quanto à força de gel (item 3.2.3.3), viscosidade (item 3.2.3.4), proteína (item 3.2.3.5), cinzas (item 3.2.3.6), umidade (item 3.2.3.7), atividade e estabilidade emulsificante (item 3.2.3.2), grau de hidrólise (item 3.2.3.1) e microscopia ótica para determinação do tamanho de gota (item 3.2.3.13) da emulsão formada com as gelatinas obtidas.

Com base nos resultados destes ensaios preliminares (itens 3.2.1.1, 3.2.1.2 e 3.2.1.3), definiu-se avaliar a reação de acilação a seco, visando prevenir a degradação do reagente e formação de precipitado.

3.2.1.4. Avaliação da reação conduzida a seco

Para a avaliação da reação conduzida a seco, foram seguidos dois procedimentos diferentes, que visavam escolher a gelatina a ser usada na reação e avaliar as condições da reação a seco.

A Figura 3.4 mostra o fluxograma para os testes de reação de acilação conduzida a seco sem ajuste de pH das gelatinas. Foram utilizados 3 diferentes tipos de gelatina, GP1, GP2 e GP3, sendo o GP1 e GP2 duas gelatinas padrão com diferentes características de força de gel ou “Bloom” (GP1 em torno de 260 g e GP2 de 290 g) e o GP3 uma gelatina hidrolisada, que não gelifica.

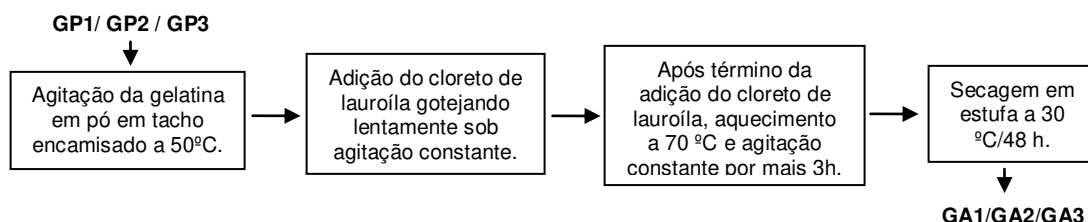


Figura 3.4. Fluxograma de processo para reação conduzida a seco sem ajuste de pH. **GP1, GP2 e GP3:** gelatinas padrão com diferentes forças de gel (260 g, 290 g e 0 g, respectivamente); **GA1, GA2 e GA3:** gelatinas aciladas provenientes das gelatinas padrão GP1, GP2 e GP3, respectivamente.

A Figura 3.5 mostra o fluxograma para os testes de reação de acilação conduzida a seco com ajuste de pH das gelatinas. Foram utilizadas apenas as gelatinas padrão, GP1 e GP2, não tendo sido feito o procedimento para a gelatina hidrolisada.

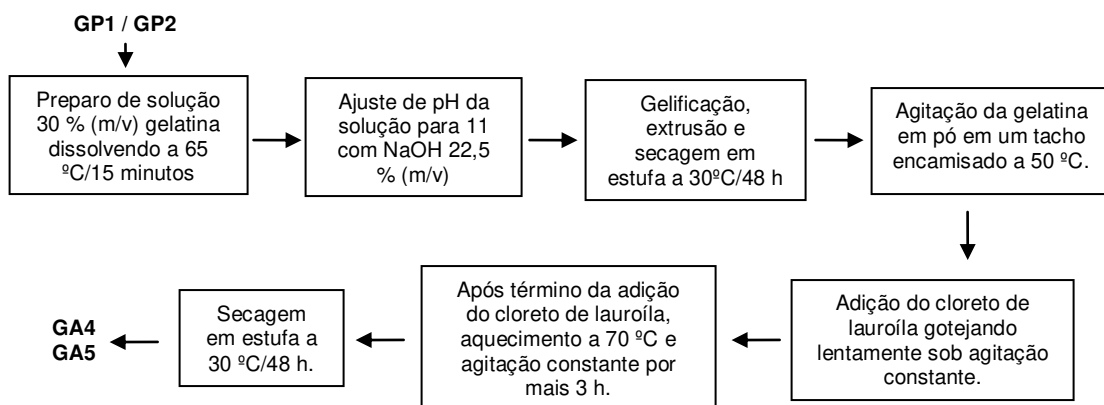


Figura 3.5. Fluxograma de processo para reação conduzida a seco com ajuste de pH. **GP1, GP2:** gelatinas padrão com diferentes forças de gel (260 g e 290 g, respectivamente); **GA4 e GA5:** gelatinas aciladas provenientes das gelatinas padrão GP1 e GP2, respectivamente.

As gelatinas antes e após a reação foram caracterizadas quanto à força de gel (item 3.2.3.3), viscosidade (item 3.2.3.4), proteína (item 3.2.3.5), cinzas (item 3.2.3.6), umidade (item 3.2.3.7), cloretos (item 3.2.3.8), distribuição de ponto isoelétrico (item 3.2.3.9), distribuição de massa molecular (item 3.2.3.10), grau de hidrólise (item 3.2.3.1), atividade emulsificante (item 3.2.3.2), além da microscopia ótica (item 3.2.3.13) e estabilidade visual das emulsões (item 3.2.3.12) preparadas com as gelatinas obtidas.

Com base nos resultados dos ensaios preliminares (item 3.2.1), definiu-se conduzir a reação de acilação a seco, além dos intervalos de pH da reação e de concentração do reagente a serem avaliados. Como a reação de acilação ocorre em meio básico, definiu-se um intervalo de pH de 8 a 11 para ser usado em um delineamento experimental (item 3.2.2.1). Os limites inferior e superior de

concentração de reagente foram, respectivamente, a quantidade calculada através da estequiometria da reação e o dobro desta concentração.

3.2.2. Preparo das gelatinas aciladas e das emulsões

3.2.2.1. Reação de acilação da gelatina

Inicialmente, foi preparada uma solução contendo 20 % (m/v) de gelatina em água deionizada, intumescida por 30 minutos e dissolvida a 65 °C. Após completa dissolução, o pH da solução foi ajustado com solução de NaOH 5 M para o valor determinado através de um planejamento experimental fatorial completo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, conforme mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Ensaios para o planejamento experimental da reação de acilação.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	pH da reação	Concentração de reagente (%)	pH da reação	Concentração de reagente (%)
MD01	-1	-1	8,4	6,9
MD02	1	-1	10,6	6,9
MD03	-1	1	8,4	11,1
MD04	1	1	10,6	11,1
MD05	-1,41	0	8,0	9,0
MD06	1,41	0	11,0	9,0
MD07	0	-1,41	9,5	6,0
MD08	0	1,41	9,5	12,0
MD09	0	0	9,5	9,0
MD10	0	0	9,5	9,0
MD11	0	0	9,5	9,0

Após o ajuste de pH, a solução foi gelificada a 10 °C por pelo menos 8 horas e, posteriormente, o gel foi extrusado e seco em estufa de convecção forçada a 30 °C por 48 horas. Após seca, a gelatina foi novamente moída e passada em peneira de 2 mm de abertura para garantir que a granulometria estivesse homogênea.

A gelatina seca e moída foi colocada em um reator encamisado com circulação de água a 50 °C. O cloreto de lauroíla, cuja concentração foi ajustada de acordo com o delineamento experimental mostrado na Tabela 3.1, foi adicionado lentamente (gotejando) à gelatina seca sob suave agitação constante. Após o final da adição do cloreto de lauroíla, a gelatina foi mantida sob agitação no reator por mais 1 hora a 50 °C. A temperatura foi então aumentada para 70 °C e ficou sob agitação por mais 3 horas. Ao final da reação, a gelatina acilada foi novamente seca em estufa de convecção forçada a 30 °C por 48 horas.

Amostras “controle” foram feitas para todos os pHs do delineamento, nas quais a gelatina foi submetida às mesmas etapas da reação de acilação, porém sem a adição do reagente cloreto de lauroíla. A Tabela 3.2 mostra as condições de pH e denominação das amostras “controle”.

Tabela 3.2. Amostras “controle” preparadas sob as mesmas condições das gelatinas aciladas, porém sem adição do reagente.

<i>Ensaio</i>	<i>pH da reação</i>
MD12	8,0
MD13	8,4
MD14	9,5
MD15	10,6
MD16	11,0

Todas as gelatinas foram submetidas a um processo de deionização para remoção de reagentes em excesso ou subprodutos da reação. Foi preparada uma solução contendo 20 % (m/v) da gelatina modificada em água deionizada, intumescida por 30 minutos e dissolvida a 65 °C. A solução foi deionizada a 50 °C utilizando resinas aniônicas e catiônicas até atingir condutividade inferior a 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (valor de referência para uma gelatina padrão). Posteriormente, a gelatina foi filtrada para remoção das resinas e do precipitado formado.

O pH da solução final foi ajustado para 5,5 utilizando solução NaOH 5 M ou HCl 1 M e a gelatina modificada foi resfriada a 10 °C por pelo menos 8 horas para gelificação. Posteriormente esta gelatina foi extrusada em moedor de carne e seca em estufa de convecção forçada a 30 °C por 48 horas novamente moída e passada em peneira de 2 mm de abertura. O fluxograma simplificado de todo o processo de acilação da gelatina pode ser visto na Figura 3.6.

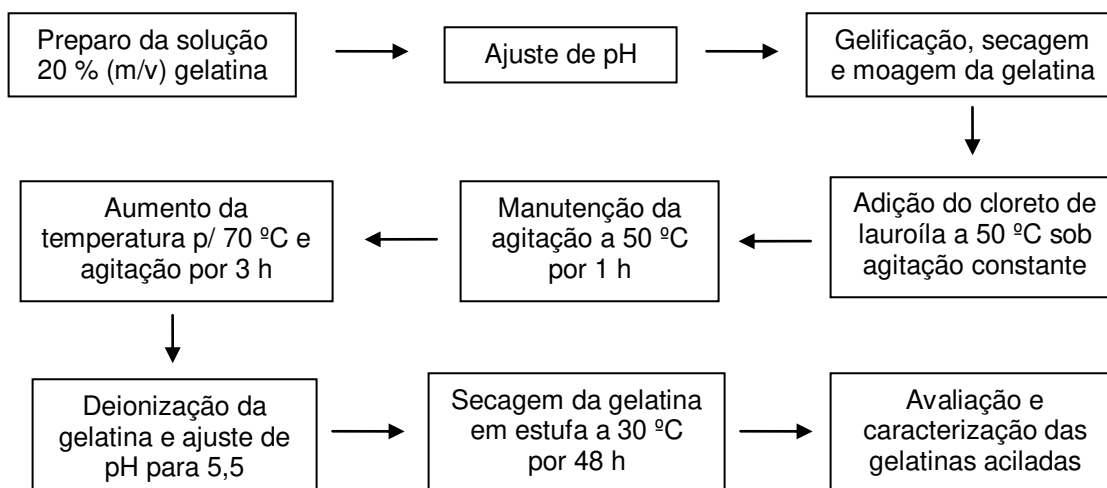


Figura 3.6. Fluxograma de processo da reação de acilação da gelatina.

As mesmas análises que foram feitas para as gelatinas modificadas (MD01 a MD11) e seus respectivos “controles” (MD12 a MD16) foram feitas também para a gelatina em sua forma original, sem nenhuma alteração, sendo chamada de gelatina padrão (GP).

Todas as gelatinas foram avaliadas quanto ao grau de acilação (item 3.2.3.1), atividade e estabilidade emulsificante (item 3.2.3.2), força de gel (item 3.2.3.3), viscosidade (item 3.2.3.4), proteína (item 3.2.3.5), cinzas (item 3.2.3.6), umidade (item 3.2.3.7), cloretos (item 3.2.3.8), distribuição de ponto isoelétrico (item 3.2.3.9), distribuição de massa molecular (item 3.2.3.10) e espectroscopia de infravermelho (item 3.2.3.11)

3.2.2.2. Preparo das emulsões

Para o preparo das emulsões, a gelatina padrão (1 % m/v de concentração) foi dissolvida em água destilada com adição de 0,02 % (m/v) de azida sódica para preservação microbiana. O pH da solução foi ajustado para 3,5 com solução de HCl 1 M. O óleo de soja foi corado com Sudam III para facilitar a visualização de separação de fases das emulsões e foi utilizado na concentração de 20 % (m/v), sendo adicionado aos poucos sob agitação constante utilizando o rotor - estator do tipo “Ultra Turrax” modelo T18 (Janke and Kunkel, Alemanha) a 14000 rpm por 4 minutos. Posteriormente foi feita a homogeneização em alta pressão utilizando-se o homogenizador de dois estágios Panda 2K NS1001L (Niro Soavi, Itália) com as condições da Tabela 3.3, sendo o 2º estágio fixo em 50 Bar. Estes ensaios foram feitos para a determinação da melhor condição de formação da emulsão com gelatina.

Tabela 3.3. Condições de homogeneização para determinação das condições de preparo das emulsões com gelatina.

<i>Teste</i>	<i>Pressão (Bar)</i>	<i>Nº. de passagens</i>
GP1001	100	1
GP1002	100	2
GP1003	100	3
GP2501	250	1
GP2502	250	2
GP2503	250	3
GP5001	500	1
GP5002	500	2
GP5003	500	3
GP7501	750	1
GP7502	750	2
GP7503	750	3
GP10001	1000	1
GP10002	1000	2
GP10003	1000	3

Após a definição das condições ótimas de formação da emulsão com a gelatina padrão, utilizou-se estas condições de pressão e número de passagens para obtenção das emulsões de todas as gelatinas modificadas (MD01 a MD11) e suas respectivas amostras controle (MD12 a MD16). A forma de preparo foi a mesma utilizada para a gelatina padrão e as emulsões obtidas foram analisadas quanto à estabilidade visual (item 3.2.3.12), microscopia ótica e análise de imagens (item 3.2.3.13) para determinação do diâmetro médio de gota.

3.2.3. Análises

3.2.3.1. Grau de hidrólise (GH) e acilação (GA)

O grau de acilação foi avaliado através de metodologia TNBS proposta por Adler-Nissen (1979), a qual determina a concentração de grupos amino primários. Primeiramente foi preparada uma solução 0,5 % (m/v) de gelatina em solução de SDS 1 % (m/v). Pipetou-se 0,25 mL desta solução em frascos cobertos com alumínio. Em seguida, foi preparada uma solução tampão fosfato através da mistura de solução de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) 0,2125 M e de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,2125 M na proporção aproximada de 43:1000 até obtenção de pH 8,2. Adicionou-se 2 mL desta solução tampão aos frascos contendo a solução de gelatina em SDS.

Em paralelo foi preparada a solução de TNBS, a partir da dissolução de 2 mL de solução aquosa de TNBS 5 % (m/v) em água deionizada em balão volumétrico de 100 mL envolvido com papel alumínio, obtendo-se uma solução com 0,1 % (v/v) de concentração. Foram transferidos 2 mL desta solução para os frascos com a solução de gelatina. A análise foi feita em triplicata de acordo com o procedimento ilustrado na Figura 3.7.

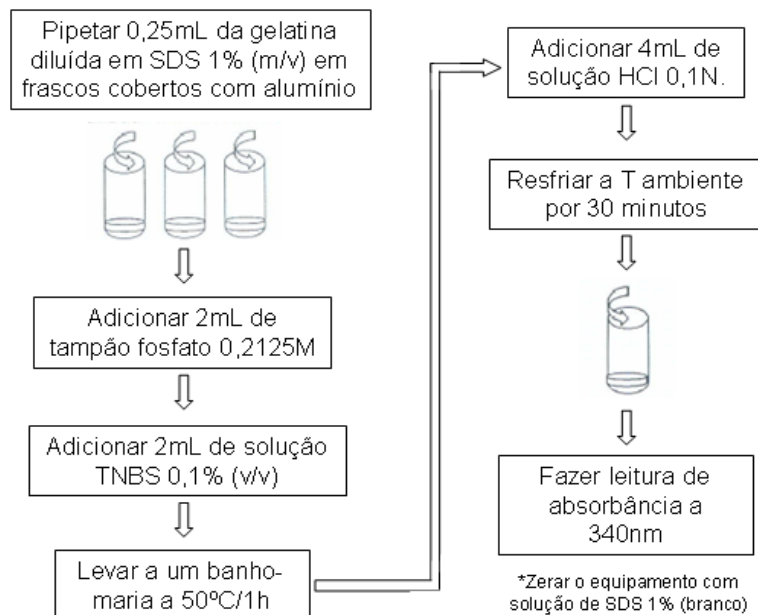


Figura 3.7. Procedimento para a análise de TNBS.

A leucina foi utilizada como padrão para essa análise. Para a obtenção da curva padrão de leucina, foi preparada uma solução 1,5 mM de leucina e foram feitas diluições entre 0,15 e 1,5 mM. A partir da curva padrão de leucina foi possível calcular os valores em concentração equivalente de leucina para as amostras em análise.

O número de grupos amino livre (GH) foi obtido de acordo com a Equação 3.1.

$$GH = \frac{mM_{Leu}}{H_{tot}} \times 100 \quad (3.1)$$

onde “mM Leu” são os grupos amino livres calculados a partir da curva padrão de leucina (mM Leu/g de proteína) e H_{tot} é o número equivalente de ligações

peptídicas por unidade de massa protéica cujo valor é 11,1 mM/g de proteína para a gelatina.

O grau de acilação (GA) das gelatinas aciladas foi calculado através da porcentagem de redução do número de grupos amino livres (GH) em comparação à gelatina controle (GH_C), conforme mostra a Equação 3.2.

$$GA = \frac{GH_c - GH}{GH_c} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3.2. Atividade e estabilidade emulsificante

A atividade emulsificante (EA) e a estabilidade emulsificante (ES) foram determinadas de acordo com o método descrito por Pearce e Kinsella (1978). Para o preparo da emulsão, 0,5 g de amostra de gelatina foi diluída em 100 mL de água destilada em banho-maria a 65 °C e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Foram transferidos 30 mL dessa solução a um recipiente plástico, adicionados 10 mL de óleo de soja e feita uma agitação em rotor - estator do tipo “Ultra Turrax” modelo T18 (Janke and Kunkel, Alemanha) a 13500 rpm durante 2 minutos. Uma alíquota de 1 mL desta emulsão foi retirada e diluída na proporção 1:500 em uma solução 0,1 % (m/v) de SDS em água destilada. A atividade emulsificante (AE) foi determinada pela leitura da absorbância logo após a formação da emulsão em espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) de 500 nm e calculada de acordo com a Equação 3.3.

$$EA = \frac{T}{M_{prot}} \times 100 \quad (3.3)$$

onde AE é a atividade emulsificante em g⁻¹, $T = 2,303 \times \text{Abs}_{(\lambda = 500\text{nm})}$ e M_{prot} é a massa de proteína presente na amostra em g.

Para a determinação da estabilidade emulsificante, a amostra foi submetida a uma temperatura de 80 °C sob agitação e a absorbância da mesma foi lida após 30 minutos nessa condição. A estabilidade emulsificante (ES) é dada pela diferença percentual da atividade emulsificante no tempo zero (AE_{t0}) e após 30 minutos a 80 °C (AE_{t30}) de acordo com a Equação 3.4.

$$ES = 1 - \left(\frac{AE_{t0} - AE_{t30}}{AE_{t0}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.3.3. Força de gel (Bloom)

Para determinação da força de gel (Bloom) foi utilizado o método oficial reconhecido pelo grupo GME, Gelatine Manufactures of Europe (GME, 2007). Foram pesadas 7,5 g da amostra de gelatina em um frasco contendo 105 mL de água destilada à temperatura ambiente e deixada intumescer durante 1 h. A dissolução foi feita a 65 °C durante 15 minutos, agitando periodicamente. O frasco foi resfriado a temperatura ambiente e mantido nesta condição durante 30 minutos com a tampa semi-aberta. Então, foi levado a um banho termostático a 10 °C, onde permaneceu por 18 horas.

A medida foi feita em equipamento TA-XT2 Texture Analyzer, da Stable Micro Systems (Godalming, UK), com célula de carga de 5 kg até alcançar 4 mm de profundidade de penetração (0,5 mm/s de velocidade). A geometria utilizada foi o “Bloom Gelometer Plunger” com todas as extremidades polidas e diâmetro de 0,5”. O resultado foi expresso em gramas e corresponde à força necessária para que o sensor penetre o gel nas condições definidas para o ensaio.

3.2.3.4. Viscosidade

Para determinação da viscosidade foi utilizado o método oficial reconhecido pelo grupo GME, Gelatine Manufacturers of Europe (GME, 2007). Para a determinação, 7,5 g da amostra de gelatina foi pesada e transferida para um frasco contendo 105 mL de água destilada à temperatura ambiente. O frasco foi tampado e deixado descansar por 1 hora até intumescimento completo. A solução foi dissolvida em banho-maria a 65 °C por 15 minutos.

Uma pipeta padrão foi lavada com esta solução e preenchida posteriormente até que o nível da solução ficasse cerca de 1 cm acima do menisco localizado na parte superior da pipeta (Figura 3.8). Após a amostra atingir a temperatura de 60 °C o fundo da pipeta foi destampado e o tempo que a solução levou para escoar do menisco superior ao inferior foi determinado com ajuda de um cronômetro.

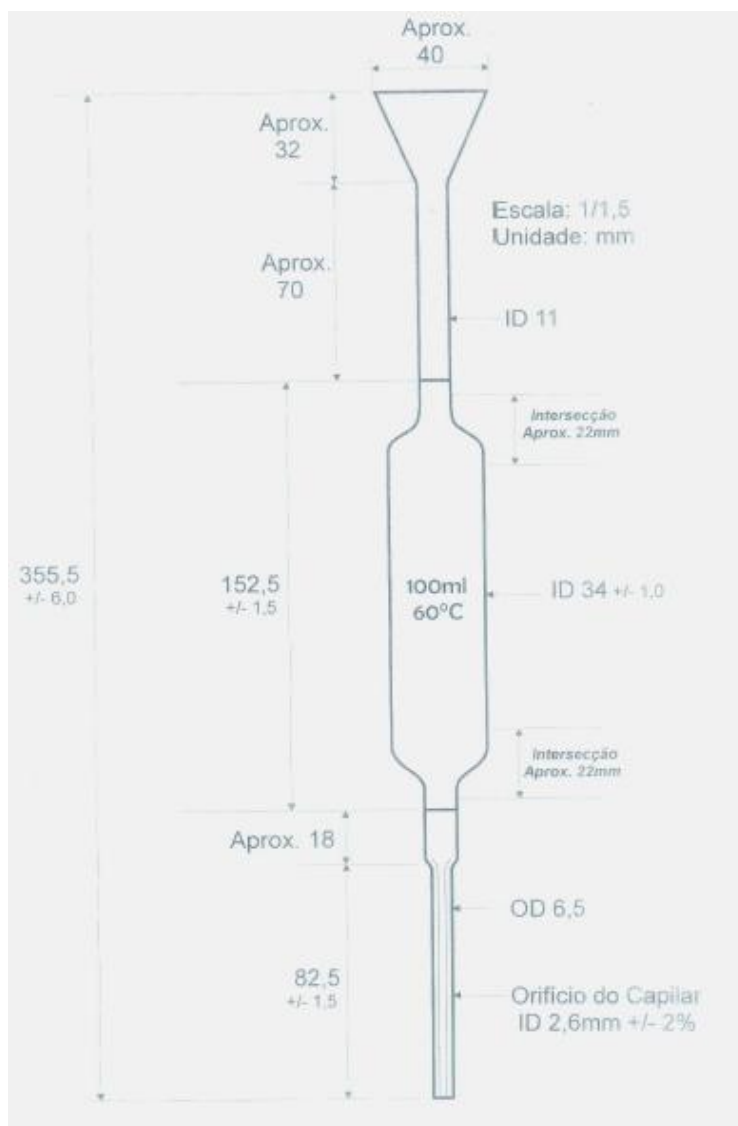


Figura 3.8. Desenho esquemático da pipeta padrão utilizada para análise de viscosidade.

O resultado foi expresso em miliPoise (mP) utilizando-se a Equação 3.5.

$$V = \left[(A \times t) - \left(\frac{B}{t} \right) \right] \times d \quad (3.5)$$

onde as constantes A e B são informadas no laudo de calibração da pipeta em cSt/s, t é o tempo em segundos e d é a densidade da solução de 6,67 % gelatina a 60 °C, que é de 1,001 g/cm³.

3.2.3.5. Proteína

A determinação de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1996) com um fator de correção proteína-nitrogênio de 5,55 para a gelatina.

3.2.3.6. Cinzas

A amostra de gelatina foi incinerada em um cadinho de porcelana, em um forno mufla da marca EDG (Brasil) a 550 °C com rampa de temperatura programável. O teor de cinzas foi determinado por diferença de massa antes e após a incineração, sendo o resultado expresso em porcentagem (%).

3.2.3.7. Umidade

A amostra de gelatina foi primeiramente pesada e mantida em estufa a 105 °C por 24 horas e então, novamente pesada. O teor de umidade foi determinado por diferença de massa e definido como a porcentagem de perda de massa da amostra.

3.2.3.8. Cloretos

A análise de cloretos foi feita utilizando cromatografia iônica em um Cromatógrafo Iônico IC Compacto 861 (Metrohm, Brasil), com coluna Metrosep A Supp-5-150 e pré-coluna A Supp 4/5 e fluxo de 0,7 mL/min. A fase móvel foi

composta por carbonato de sódio 3,2 mM e bicarbonato de sódio 1,0 mM. O tempo de corrida foi de 12 minutos e o tempo de retenção do cloreto de aproximadamente 8 minutos. O resultado de concentração de cloretos foi obtido através do software do equipamento que transforma os dados de condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) em ppm através da correlação com a curva de calibração.

3.2.3.9. Distribuição de ponto isoelétrico

A determinação do ponto isoelétrico foi obtida por eletrofocalização em gel de poliacrilamida pré-fabricado com faixa de resolução de pH 3 a 10 em equipamento modelo Multiphor II System EPS 3501XL da Amersham Biosciences (GE Healthcare, UK). Uma solução 0,5% de gelatina (m/v) foi preparada e um volume de 12,5 μL aplicado a 40 mm de distância do ânodo do equipamento. Após a migração dos componentes da amostra para as bandas onde a carga é zero (ponto isoelétrico) foi feita a coloração utilizando Coomassie Blue G-250 e as bandas analisadas visualmente em comparação a um marcador padrão de proteínas.

3.2.3.10. Distribuição de massa molecular

A determinação da distribuição de massa molecular da gelatina foi feita por permeação em gel (GPC) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento HPLC Waters 510 com detector de absorbância Waters 486 (Massachusetts, EUA). Para o cálculo da massa molecular relativa foi utilizado um padrão primário (poliestireno) com diferentes massas moleculares, a partir dos

quais foi elaborada uma curva de calibração (com 5 pontos) a fim de obter a massa molecular relativa das amostras de gelatina.

3.2.3.11. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho foi feita em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Spectrum One com transformada de Fourier, provido com o acessório UATR (atenuador de reflectância total universal). As gelatinas secas foram analisadas na região de 650 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , com 16 varreduras. O software Spectrum One B (versão 5.31) foi utilizado para o tratamento dos resultados.

3.2.3.12. Estabilidade visual das emulsões

Imediatamente após o preparo das emulsões coradas com Sudam III para melhor visualização, alíquotas de 25 mL foram transferidas a tubos cilíndricos graduados (diâmetro interno = 18 mm; altura = 165 mm), selados e estocados a temperatura ambiente, sendo o volume da fase aquosa inferior avaliado após 10 dias de produção das emulsões.

3.2.3.13. Microscopia ótica e análise de imagens

A microestrutura das emulsões foi avaliada imediatamente após o preparo utilizando-se microscópio ótico Scope A1 da Carl Zeiss (Alemanha). As amostras foram colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e observadas com aumento de 100x. Foram preparadas duas lâminas de cada emulsão e para cada uma foram obtidas dez fotografias de regiões aleatórias.

As imagens foram analisadas utilizando-se o software Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Primeiramente as imagens foram convertidas em escala de cinza 8-bit, apresentando níveis de cinza entre 0 a 255. Foi feito então o ajuste de brilho e contraste automaticamente e posteriormente a imagem foi binarizada. A escala das imagens foi determinada e a área, circularidade e perímetro das gotas das emulsões foram medidos. O diâmetro médio superficial das gotas (d_{32}) foi então calculado a partir da Equação 3.6, onde n_i é o número de gotas com diâmetro d_i .

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (3.6)$$

3.2.4. Avaliação estatística dos dados

Os resultados dos planejamentos experimentais foram analisados com auxílio do software Minitab 15.1.1.0 (2007) para a realização da análise de variância (ANOVA) em que diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram determinadas pelo teste de Tukey. Através da utilização deste software, foi possível a geração de modelos que representassem a influência das variáveis estudadas em cada caso.

CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaios preliminares

Foram testadas diferentes formas de se conduzir a reação na tentativa de obter um maior rendimento. Para isso, variou-se a concentração da solução de gelatina (solução 10% (m/v), 30% (m/v) e reação a seco), o pH e o tempo de reação. Ainda, para melhor entendimento da reação foi feita uma avaliação do balanço de massa da reação e da cinética da reação.

4.1.1. Determinação da quantidade de reagente para a reação de acilação

A quantidade de reagente necessária foi calculada a partir da estequiometria da reação. Como mencionado anteriormente, os aminoácidos disponíveis para a reação (com grupo terminal amino) e presentes em quantidades significativas na gelatina são: a arginina (7,18 g/100 g proteína), a lisina (3,24 g/100 g proteína) e a hidroxilisina (1,0 g/100 g proteína). Considerando-se que em média, a gelatina possui cerca de 85 g de proteína/100 g gelatina, foi possível calcular a quantidade total de aminoácidos disponível para a reação (NH_{2disp}) e a quantidade de reagente a ser adicionado ($Reag_{reac}$), conforme mostram as Equações 4.1 e 4.2 e a Tabela 4.1.

$$NH_{2disp} = NH_{2pres} \times Prot \times AA \quad (4.1)$$

$$Sendo \quad NH_{2pres} = \frac{MM_{NH_2}}{MM_{AA}} \quad (4.2)$$

onde **NH_{2disp}**: quantidade de NH₂ disponível para a reação em g NH₂/100 g gelatina; **NH_{2pres}**: quantidade de NH₂ presente no aminoácido em g NH₂/g do

aminoácido; **Prot.**: quantidade média de proteína presente na gelatina, que é de 85 g proteína/100 g gelatina; **AA**: quantidade do aminoácido em g aminoácido/100 g de proteína; **MM_{NH₂}**: massa molar do grupo amino, que é de 16 g; **MM_{AA}**: massa molar do aminoácido em g, sendo 174 g, 146 g e 162 g para arginina, lisina e hidroxilisina, respectivamente.

Tabela 4.1. Quantidade de grupos NH₂ disponível para a reação de acilação da gelatina com cloreto de lauroíla calculado a partir do NH₂ presente em cada aminoácido (NH_{2pres}).

	<i>Arginina</i>	<i>Lisina</i>	<i>Hidroxilisina</i>
NH_{2pres} (g/g aminoácido)	0,09	0,11	0,10
NH_{2disp} (g/100 g de gelatina)	0,56	0,30	0,09

Somando-se as quantidades obtidas para os três aminoácidos, temos em torno de 0,95 g de NH₂ disponível para a reação em 100 g de gelatina. Como a estequiometria da reação é 1:1, a mesma quantidade de íons cloro (Cl) deve ser adicionada a partir do reagente cloreto de lauroíla e dessa forma temos que a quantidade de reagente a ser utilizada na reação é de 5,95 g/100 g de gelatina.

Com base no descrito acima, foram definidas as concentrações inferior e superior de concentração do reagente cloreto de lauroíla a serem utilizadas no delineamento experimental para a reação, que foram respectivamente, de 6% (m/m) e o dobro disso, ou seja, 12% (m/m).

4.1.2. Avaliação do efeito do pH na reação de acilação

A taxa de acilação é altamente reduzida ou até mesmo suprimida quando o pH está significativamente abaixo do pKa do grupo funcional disponível para a reação. Desta forma, os grupos amino tendem a tornarem-se mais reativos quando em pH altos (MAGDASSI, 1996). A Figura 4.1 mostra a correlação entre os resultados de Bloom e atividade emulsificante das gelatinas aciladas em diferentes pHs, enquanto que a Figura 4.2 mostra os resultados obtidos nas análises de estabilidade emulsificante para os diferentes pHs de reação ao longo de 60 minutos mantendo-se a emulsão à 80°C.

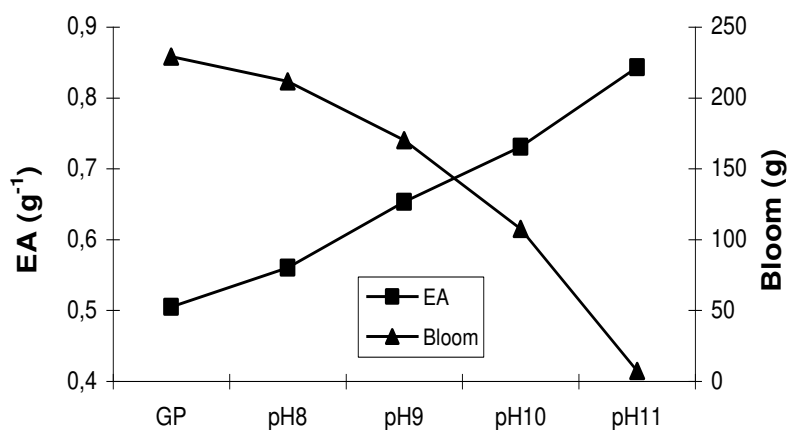


Figura 4.1. Bloom e atividade emulsificante final das gelatinas aciladas em diferentes pHs. **GP:** gelatina padrão não submetida à reação de acilação; **pH8, pH9, pH10 e pH11:** gelatinas aciladas nos pHs 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

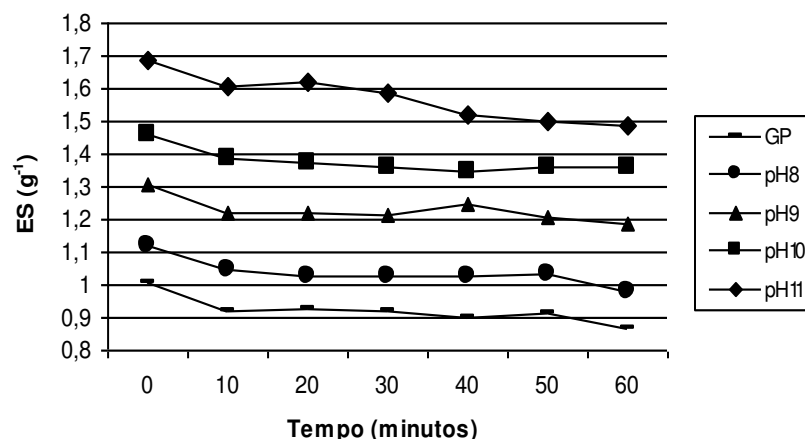


Figura 4.2. Estabilidade emulsificante das gelatinas aciladas em diferentes pHs.

GP: gelatina padrão não submetida à reação de acilação; **pH8, pH9, pH10 e pH11:** gelatinas aciladas nos pHs 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

Os resultados mostram que, quanto maior o pH da reação, maior a atividade e estabilidade emulsificante final da gelatina modificada, o que condiz com o fato de os aminoácidos disponíveis à reação terem um alto valor de pKa e portanto serem mais reativos em pHs extremamente alcalinos, resultando em maior grau de acilação nestas condições. A gelatina padrão (GP) foi a que apresentou piores resultados, o que mostra que a reação realmente altera a capacidade emulsificante da gelatina. No entanto, o aumento do pH da reação também acarretou em uma grande perda de força de gel da gelatina, chegando próximo a zero quando em pH 11. Dessa forma, torna-se interessante avaliar gelatinas aciladas em pHs extremamente alcalinos mas também em pHs um pouco mais baixos uma vez que a força de gel também apresenta papel importante na estabilização de emulsões através do aumento da viscosidade da fase contínua.

4.1.3. Avaliação do balanço de massa da reação

O objetivo dessa avaliação foi o de entender melhor o que estava ocorrendo durante a reação e principalmente, caracterizar os produtos da reação. A Figura 4.3 mostra a composição das amostras avaliadas e as massas obtidas em cada etapa do processo, em base seca. Na figura, o material referente à perda (L) é a massa de gelatina que ficou retida no ciclone do spray-drier.

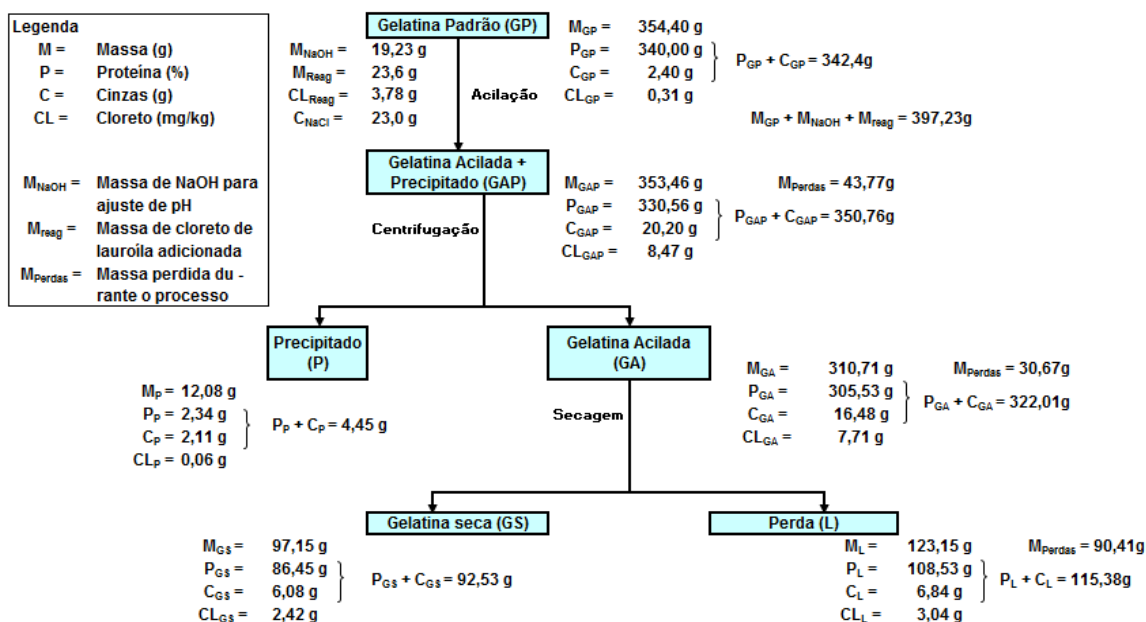


Figura 4.3. Resultados finais do balanço de massa e composição dos produtos da reação em base seca.

A análise de proteína mostra que o precipitado (P) contém pequena quantidade de gelatina. Além disso, o precipitado (P) contém pequena quantidade de cloreto nas cinzas, enquanto que as gelatinas após a acilação (GA, GS e L) possuem alto teor de cloretos. Estes resultados mostram que o precipitado não é

composto predominantemente do sal (NaCl) que teoricamente seria formado durante a reação. No entanto, vale ressaltar que a massa de cloreto (Cl^-) encontrada na amostra GAP foi muito acima da esperada (cerca do dobro), o que poderia ser explicado devido ao cloro presente na água destilada. Outra observação importante é que a soma das massas de cinzas e proteína do precipitado (P) é muito menor do que a massa de precipitado obtida. Uma possibilidade para explicar esta diferença seria o da formação de um subproduto da reação, como um ácido carboxílico, que através das análises feitas não seria identificado. A formação desse ácido carboxílico pode ocorrer devido à competição da reação com a água do meio.

A Figura 4.4 ilustra um possível mecanismo de reação para a formação do ácido carboxílico durante a reação de acilação da gelatina.

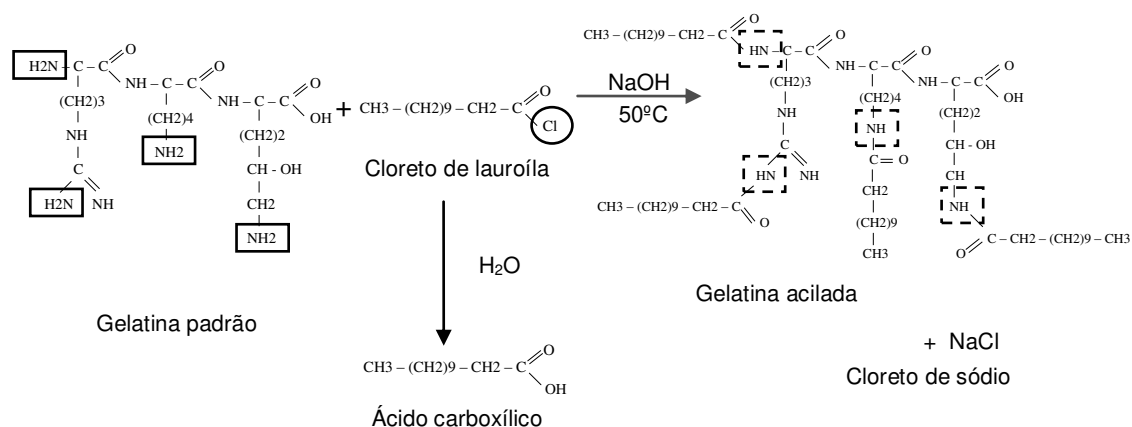


Figura 4.4. Mecanismo de formação do ácido carboxílico durante a reação.

Com base nos resultados apresentados acima, uma opção para a eliminação da formação de ácido carboxílico e conseqüente aumento do

rendimento da reação seria conduzir a reação a seco ou em outros meios orgânicos como DMSO, DMF ou acetona. Por se tratar de uma gelatina cujo objetivo final é seu uso alimentício, optou-se por conduzir testes com reação a seco, conforme descrito a seguir.

4.1.4. Determinação do tempo de reação

A Tabela 4.2 mostra a composição e as características físicas do produto de reação de acilação obtido em diferentes tempos de processo.

Tabela 4.2. Caracterização do produto em diferentes tempos de reação.

<i>Amostra</i>	<i>Bloom (g)</i>	<i>Viscosidade (mP)</i>	<i>Proteína (%)</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Cinzas (%)</i>
GP	229,0 ± 0,4 ^a	33,0 ± 0,9 ^b	86,4 ± 4,3 ^a	12,8 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,1 ^b
T1	113,7 ± 4,0 ^b	30,4 ± 1,1 ^{b,c}	74,6 ± 0,5 ^a	12,8 ± 0,6 ^a	4,9 ± 0,1 ^a
T2	103,3 ± 1,3 ^b	29,5 ± 0,4 ^c	70,5 ± 4,5 ^a	13,2 ± 0,3 ^a	5,4 ± 0,6 ^a
T3	79,6 ± 6,4 ^c	28,6 ± 0,7 ^c	75,1 ± 12,1 ^a	12,7 ± 0,6 ^a	5,0 ± 0,1 ^a
T4	78,0 ± 0,3 ^c	36,3 ± 0,6 ^a	72,8 ± 2,4 ^a	12,6 ± 0,6 ^a	5,5 ± 0,1 ^a
T5	69,8 ± 1,7 ^{c,d}	22,9 ± 1,1 ^d	84,7 ± 4,3 ^a	12,8 ± 0,4 ^a	5,5 ± 0,1 ^a
T6	64,7 ± 0,5 ^d	30,1 ± 0,4 ^{b,c}	73,5 ± 7,9 ^a	12,2 ± 0,3 ^a	5,5 ± 0,2 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). **GP**: gelatina padrão não submetida à reação de acilação; **T1, T2, T3, T4, T5 e T6**: gelatinas aciladas durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas de reação, respectivamente.

Nota-se que ocorreu uma redução da força de gel da gelatina (Bloom) com o aumento do tempo de reação, enquanto que a concentração de proteína, a umidade e a viscosidade, não mostraram clara tendência de comportamento em função do tempo de reação. Em relação ao teor de cinzas, observou-se um aumento já na primeira hora de reação devido à adição do reagente e

neutralização com NaOH. Já entre os diferentes tempos de reação (T1 a T6) não foi possível notar diferenças significativas no teor de cinzas.

Foram avaliadas a atividade e estabilidade emulsificante das gelatinas obtidas em diferentes tempos de reação, bem como seu grau de hidrólise através da análise de TNBS. A Figura 4.5 mostra os resultados de atividade (AE) e estabilidade (ES) emulsificante das amostras, sendo AE correspondente ao valor de ES no tempo zero. Nota-se que para as amostras T1 a T6 houve um aumento da AE e ES quando comparadas à amostra padrão (GP), porém não foi possível observar diferenças significativas entre as amostras retiradas entre 1 e 6 horas.

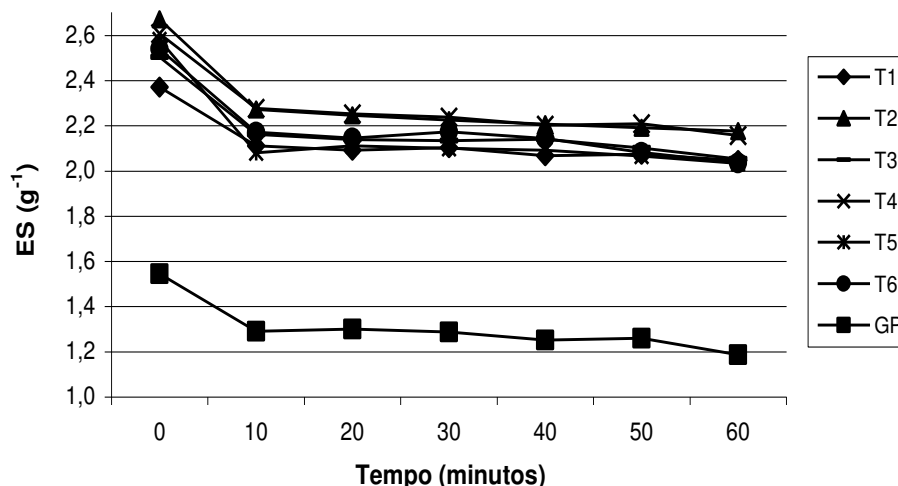


Figura 4.5. Atividade e estabilidade emulsificante das gelatinas obtidas em diferentes tempos de reação. **GP:** gelatina padrão não submetida à reação de acilação; **T1, T2, T3, T4, T5 e T6:** gelatinas aciladas durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas de reação, respectivamente.

A Figura 4.6 mostra os resultados de grau de hidrólise das amostras de gelatinas aciladas, através da análise de TNBS. Os resultados mostraram uma

tendência de diminuição do grau de hidrólise com o aumento do tempo de reação até o tempo 3 horas, confirmando as condições de processo adotadas inicialmente (TUROWSKI et al, 1991). A diminuição do grau de hidrólise está associada com a menor quantidade de grupos amino (NH_2) disponível, ou seja, maior o grau de acilação da gelatina.

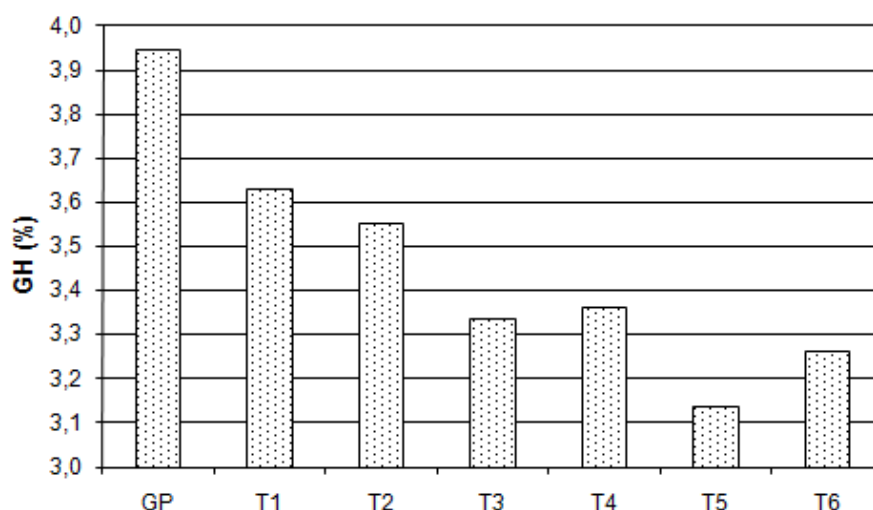


Figura 4.6. Grau de hidrólise (GH) das gelatinas obtidas em diferentes tempos de reação. **GP:** gelatina padrão não submetida à reação de acilação; **T1, T2, T3, T4, T5 e T6:** gelatinas aciladas durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas de reação, respectivamente.

Foram realizadas análises de tamanho de gota das emulsões produzidas com a gelatina padrão (GP) e as amostras T1 a T6. Os resultados do diâmetro médio de gota podem ser vistos na Tabela 4.3 e mostram diminuição do diâmetro entre a gelatina padrão e as amostras submetidas à acilação, assim como observado para a atividade emulsificante.

Tabela 4.3. Diâmetro médio de gota das emulsões estabilizadas com as gelatinas obtidas em diferentes tempos de reação.

<i>Amostra</i>	<i>d₃₂ (μm)</i>
GP	3,78 ± 1,09 ^a
T1	2,57 ± 0,38 ^b
T2	1,87 ± 0,25 ^b
T3	1,62 ± 0,16 ^b
T4	2,07 ± 0,25 ^b
T5	1,67 ± 0,25 ^b

GP: gelatina padrão não submetida à reação de acilação; **T1, T2, T3, T4, T5 e T6:** gelatinas aciladas durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas de reação, respectivamente.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05).

Os resultados de todas as avaliações, principalmente em relação ao grau de hidrólise (GH), indicam tendências de maior efetividade para reação com 3 horas de duração, sendo que depois disso não se notam melhorias significativas nos parâmetros desejados para a gelatina acilada, como redução do GH e conseqüentemente aumento do grau de acilação, redução do tamanho de gota das emulsões e aumento da atividade emulsificante.

4.1.5. Avaliação da reação conduzida a seco

Foram produzidas amostras de gelatinas aciladas com e sem ajuste de pH da gelatina antes da reação, provenientes de diferentes tipos de gelatina. As gelatinas padrão e aciladas foram caracterizadas quanto à força de gel (Bloom), viscosidade, proteína, umidade, cinzas e cloretos, conforme mostra a Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Resultados de caracterização das gelatinas utilizadas na reação a seco.

<i>Amostra</i>	<i>Bloom (g)</i>	<i>Viscosidade (mP)</i>	<i>Cinzas (%)</i>	<i>Proteína (%)</i>	<i>Cloretos (mg/kg)</i>
GP1	265,2 ± 0,7 ^c	40,6 ± 0,7 ^e	0,68 ± 0,11 ^b	95,9 ± 3,5 ^a	886,5 ± 11,2 ^d
GA1	237,2 ± 3,7 ^d	35,3 ± 0,3 ^g	1,00 ± 0,18 ^b	95,7 ± 5,4 ^a	7400,6 ± 16,3 ^e
GA4	176,5 ± 2,0 ^e	40,6 ± 0,1 ^e	2,86 ± 0,52 ^a	90,4 ± 2,4 ^a	9482,4 ± 6,4 ^a
GP2	293,5 ± 3,7 ^a	50,8 ± 0,3 ^b	1,02 ± 0,21 ^b	98,9 ± 2,6 ^a	1239,3 ± 15,6 ^f
GA2	276,7 ± 1,7 ^b	44,2 ± 0,3 ^d	0,36 ± 0,07 ^b	94,8 ± 4,5 ^a	7686,3 ± 9,8 ^d
GA5	228,4 ± 5,5 ^d	73,5 ± 0,4 ^a	3,62 ± 0,16 ^a	92,8 ± 3,4 ^a	9154,0 ± 77,2 ^b
GP3	0,0 ± 0,0 ^f	38,3 ± 0,3 ^f	0,97 ± 0,04 ^b	97,1 ± 3,8 ^a	1128,4 ± 25,5 ^f
GA3	0,0 ± 0,0 ^f	46,7 ± 0,3 ^c	0,75 ± 0,07 ^b	97,6 ± 0,3 ^a	7860,5 ± 23,8 ^c

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). **GP1 e GP2:** gelatinas padrão com diferentes valores de força de gel; **GP3:** gelatina padrão hidrolisada; **GA1, GA2 e GA3:** gelatinas aciladas sem ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1, GP2 e GP3, respectivamente; **GA4 e GA5:** gelatinas aciladas com ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente.

É possível notar que, para as gelatinas padrão GP1 e GP2, ocorre uma queda na força de gel após a reação com e sem ajuste de pH, sendo esta queda mais pronunciada no caso da reação com ajuste de pH (GA4 e GA5). No entanto, as gelatinas GA4 e GA5 mostraram um aumento de viscosidade após a reação quando comparadas com as gelatinas obtidas sem ajuste de pH (GA1 e GA2) e este aumento de viscosidade foi mais intenso no caso da gelatina de maior Bloom (GA5).

O teor de cinzas aumentou para as gelatinas que passaram pela reação com ajuste de pH, devido ao ajuste de pH com NaOH e possível formação de NaCl. Da mesma forma, notou-se um aumento do teor de cloretos para todas as

gelatinas que passaram pela reação, sendo maior para as que tiveram ajuste de pH.

O ponto isoelétrico (pI) de uma molécula de gelatina é dependente da proporção entre o número de resíduos de aminoácidos com grupos ácidos ou básicos nas cadeias laterais e seus valores de pKa. Gelatinas obtidas através de tratamento alcalino, como é o caso das gelatinas padrão em questão, costumam apresentar pI médio entre 4,8 a 5,5, devido à presença de uma menor quantidade de grupos amida do que por exemplo uma gelatina obtida através de tratamento ácido, cujo pI médio é normalmente maior que 8,5 (MAXEY; PALMER, 1976). A Figura 4.7 mostra os resultados de pI obtidos através da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida para as amostras de reação a seco. Comparando-se as amostras GP3 e GA3 pode-se notar que a amostra acilada (GA3) apresenta uma pequena redução na distribuição de moléculas de menor pI. Uma vez que a reação promove a ligação das moléculas através do grupo amino livre, esperava-se mesmo observar uma redução do pI na amostra modificada. Já para as amostras GP1 em comparação com GA1 e GP2 em comparação com GA2, não foi possível observar diferenças significativas na distribuição de pI. Essa diferença entre os resultados para GA3 em relação a GA1 e GA2 provavelmente ocorreu devido à maior quantidade de grupos amino disponível à reação na gelatina hidrolisada (GP3) quando em comparação com as outras gelatinas padrão (GP1 e GP2). No entanto, quando se compara as amostras GA4 e GA5 a suas respectivas amostras de origem (GP1 e GP2) observa-se um aumento de intensidade nas bandas de menor pI, sendo mais evidente para a amostra GA4. No caso da reação de acilação, um grupo funcional é ligado à cadeia de gelatina

através dos aminoácidos disponíveis à reação (arginina, lisina e hidroxilisina) que apresentam grupos laterais básicos. Quanto maior o grau de acilação da gelatina, menor será a quantidade de grupos laterais básicos e conseqüentemente, menor o pI da gelatina.

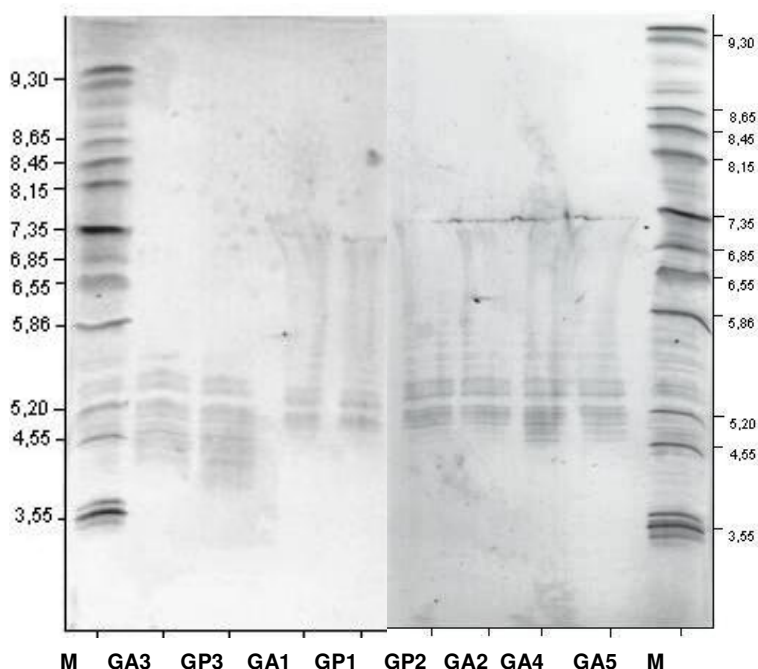


Figura 4.7. Perfil de eletroforese para as gelatinas submetidas à reação a seco. **M:** Marcador de proteínas; **GP1 e GP2:** gelatinas padrão com diferentes valores de força de gel; **GP3:** gelatina padrão hidrolisada; **GA1, GA2 e GA3:** gelatinas aciladas sem ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1, GP2 e GP3, respectivamente; **GA4 e GA5:** gelatinas aciladas com ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente.

A Tabela 4.5 e a Figura 4.8 mostram os resultados obtidos através da análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) para o perfil de distribuição de massa molecular das amostras de reação a seco para o grupo de gelatinas aciladas provenientes da gelatina padrão GP1.

Tabela 4.5. Distribuição de massa molecular, massa molecular média e polidispersão das gelatinas aciladas provenientes da gelatina GP1.

<i>Amostra</i>	<i>Mw (kDa)</i>	<i>Polidispersão</i>	<i>% Mw < 100kDa</i>	<i>100kDa < % Mw < 300kDa</i>	<i>% Mw > 300kDa</i>
GP1	99,38	29,70	68,42	19,78	11,80
GA1	97,85	27,75	68,76	19,78	11,46
GA4	108,46	36,98	66,57	19,20	14,24

GP1: gelatina padrão; **GA1:** gelatina acilada sem ajuste de pH, proveniente da gelatina GP1; **GA4:** gelatina acilada com ajuste de pH, proveniente da gelatina GP1.

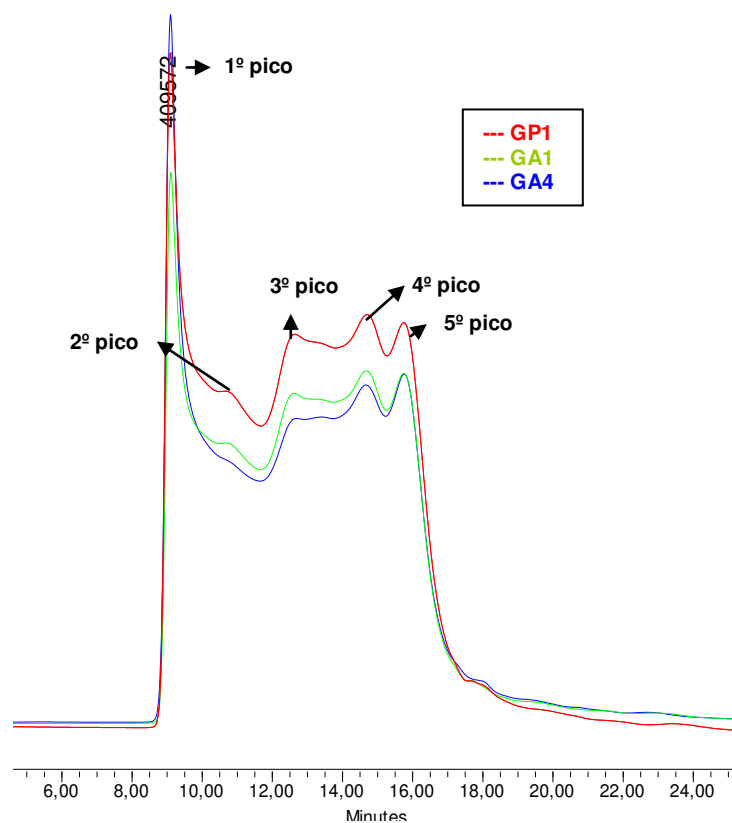


Figura 4.8. Análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) para as gelatinas submetidas à reação a seco provenientes da gelatina GP1. **GP1:** gelatina padrão; **GA1:** gelatina acilada sem ajuste de pH, proveniente da gelatina GP1; **GA4:** gelatina acilada com ajuste de pH, proveniente da gelatina GP1.

A Figura 4.8 mostra cinco picos para cada curva. A amostra GA4 mostra maior intensidade no primeiro pico do que as demais gelatinas, enquanto que os outros picos são menores, ou seja, a gelatina acilada com ajuste de pH (GA4) apresentou maior quantidade de material de alta massa molecular do que as outras duas gelatinas. Nota-se também que a amostra GA4 apresentou menor porcentagem de cadeias menores que 100 kDa e maior porcentagem de cadeias maiores que 300 kDa, corroborado pela maior massa molecular média (M_w), apesar de apresentar menor valor de Bloom (força de gel) que as outras duas amostras.

A Tabela 4.6 e a Figura 4.9 mostram os resultados obtidos através da análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) para o perfil de distribuição de massa molecular das gelatinas submetidas à reação a seco para o grupo de gelatinas aciladas provenientes da gelatina padrão GP2.

Tabela 4.6. Distribuição de massa molecular, massa molecular média e polidispersão das gelatinas aciladas provenientes da gelatina GP2.

<i>Amostra</i>	<i>M_w (kDa)</i>	<i>Polidispersão</i>	<i>% M_w < 100kDa</i>	<i>100kDa < % M_w < 300kDa</i>	<i>% M_w > 300kDa</i>
GP2	123,19	38,07	61,31	22,58	16,12
GA2	117,58	24,33	63,10	21,71	15,19
GA5	120,53	35,75	63,14	20,30	16,56

GP2: gelatina padrão; **GA2:** gelatina acilada sem ajuste de pH, proveniente da gelatina GP2; **GA5:** gelatina acilada com ajuste de pH, proveniente da gelatina GP2.

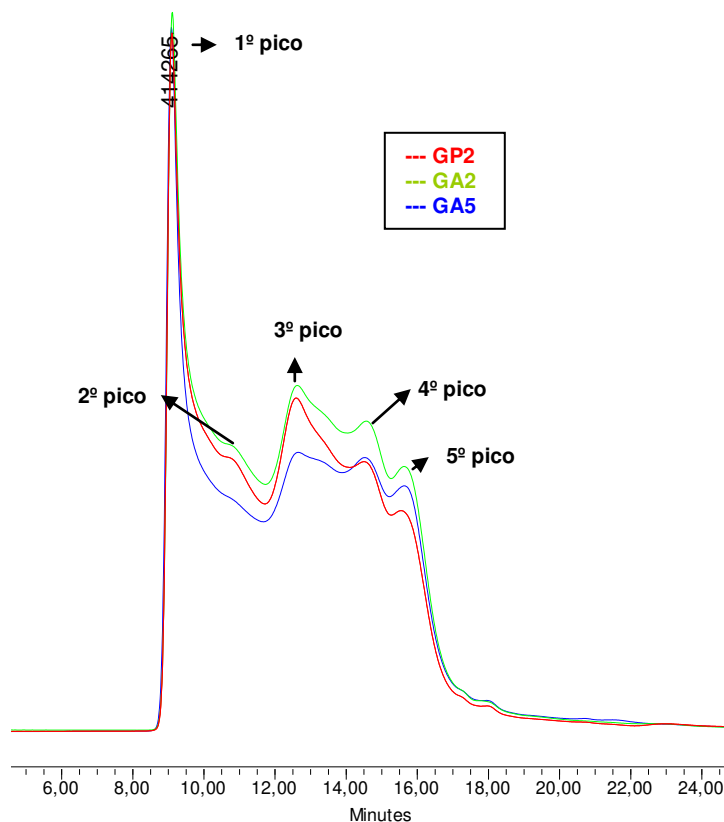


Figura 4.9. Análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) para as gelatinas submetidas à reação a seco provenientes da gelatina GP2. **GP2:** gelatina padrão; **GA2:** gelatina acilada sem ajuste de pH, proveniente da gelatina GP2; **GA5:** gelatina acilada com ajuste de pH, proveniente da gelatina GP2.

A análise dos picos da Figura 4.9 mostra que a amostra GA5 apresenta o segundo e o terceiro picos das curvas menos pronunciados que as demais amostras. Já para o quarto e quinto pico ocorre uma inversão com a amostra GP2.

Gelatinas de maior massa molecular, normalmente apresentam maior força de gel (WARD; COURTS, 1977), porém esta tendência não foi observada para as gelatinas aciladas. As gelatinas aciladas a partir da GP1 mostraram tendência inversa, ou seja, aumento de Mw e queda de Bloom, enquanto que as aciladas a partir da GP2 não mostraram clara correlação do Mw com a redução de Bloom.

A Tabela 4.7 mostra os resultados obtidos para a análise de atividade emulsificante das amostras de gelatina reagidas a seco. Os resultados de atividade emulsificante mostram que a amostra GA5 apresentou a maior atividade emulsificante enquanto a amostra GA1 apresentou o menor valor. Já a amostra GA4, apesar de apresentar melhor resultado que a GA1, não apresentou diferença significativa em relação à GP1. Estes resultados mostram que apenas a reação com ajuste de pH foi eficaz para o aumento da atividade emulsificante das gelatinas, principalmente no caso da gelatina acilada a partir da gelatina padrão GP2, cuja força de gel (Bloom) foi maior que para a outra gelatina.

Tabela 4.7. Atividade emulsificante (AE) das gelatinas submetidas à reação a seco.

Amostra	AE (g⁻¹)
GP1	1,72 ± 0,07 ^b
GA1	1,50 ± 0,02 ^c
GA4	1,80 ± 0,03 ^b
GP2	1,55 ± 0,07 ^c
GA2	1,56 ± 0,07 ^c
GA5	2,31 ± 0,04 ^a

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). **GP1 e GP2:** gelatinas padrão com diferentes valores de força de gel; **GA1 e GA2:** gelatinas aciladas sem ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente; **GA4 e GA5:** gelatinas aciladas com ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente.

Para a análise de tamanho de gota e estabilidade visual das emulsões produzidas com concentração de 1% de gelatina, foi feita uma avaliação no tempo zero (T0), ou seja, logo após o preparo da emulsão, e após 12 dias (T12) do

preparo das mesmas. As Figuras 4.10 e 4.11 e a Tabela 4.8 mostram os resultados obtidos.

Tabela 4.8. Diâmetro de gota médio (d_{32}) no tempo zero (T0) e 12 dias (T12) de estocagem das emulsões produzidas a partir das gelatinas submetidas à reação a seco.

<i>Amostra</i>	<i>d_{32} T0 (μm)</i>	<i>d_{32} T12 (μm)</i>
GP1	$2,6 \pm 0,2^{a,c}$	$2,69 \pm 0,15^a$
GA1	$4,2 \pm 0,6^b$	$3,33 \pm 0,23^b$
GA4	$2,3 \pm 0,2^a$	$2,63 \pm 0,24^{a,c}$
GP2	$2,9 \pm 0,2^c$	$2,68 \pm 0,24^a$
GA2	$2,9 \pm 0,2^c$	$2,77 \pm 0,14^a$
GA5	$2,5 \pm 0,5^a$	$2,39 \pm 0,05^c$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

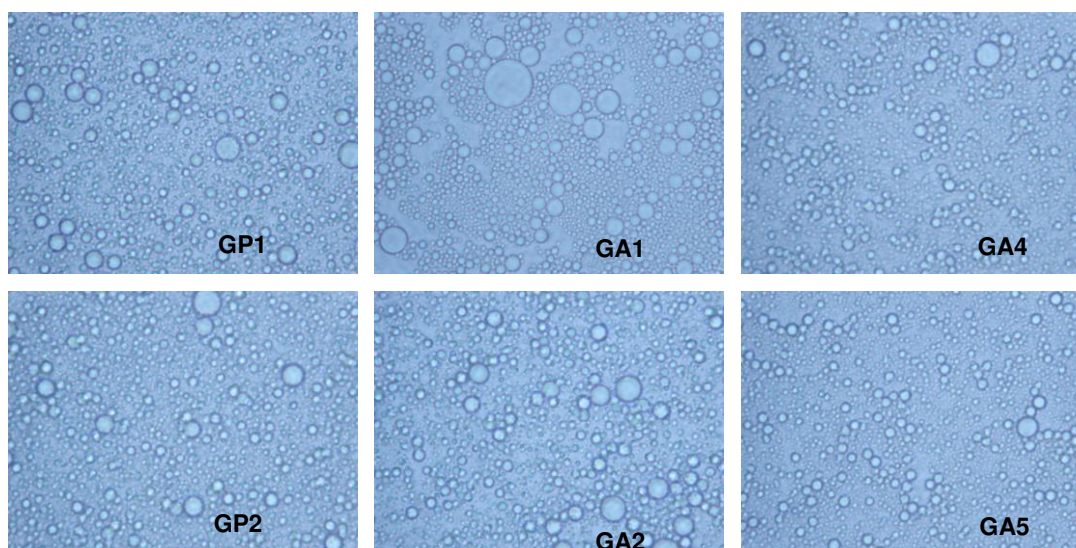


Figura 4.10. Distribuição de gotas no tempo zero (T0) de estocagem. **GP1 e GP2:** gelatinas padrão com diferentes valores de força de gel; **GA1 e GA2:** gelatinas aciladas sem ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente; **GA4 e GA5:** gelatinas aciladas com ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente.

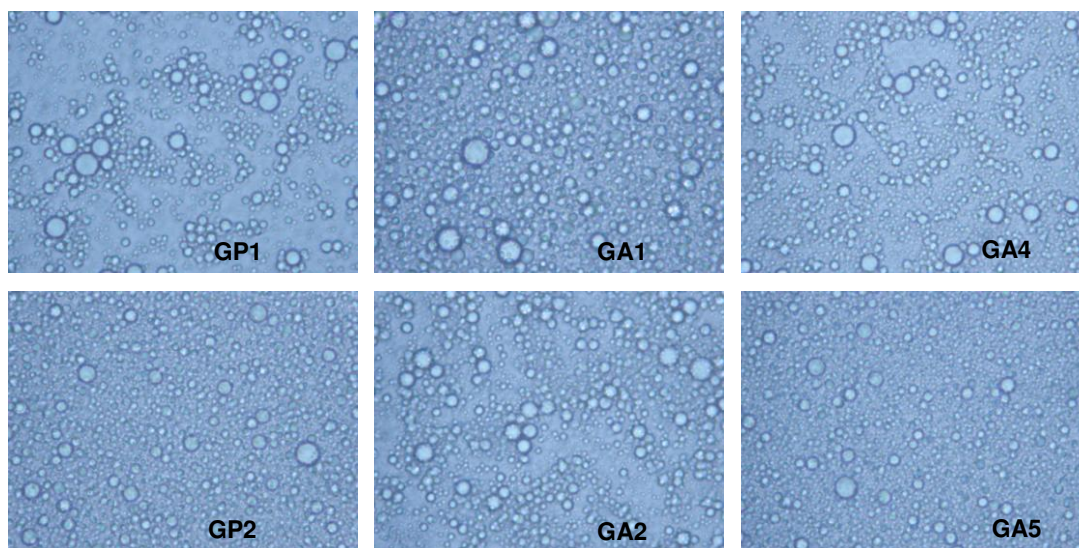


Figura 4.11. Distribuição de gotas após 12 dias (T12) de estocagem. **GP1 e GP2:** gelatinas padrão com diferentes valores de força de gel; **GA1 e GA2:** gelatinas aciladas sem ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente; **GA4 e GA5:** gelatinas aciladas com ajuste de pH, provenientes das gelatinas GP1 e GP2, respectivamente.

Pode-se notar que, no tempo zero após a produção das emulsões, a amostra GA1 apresentou o maior tamanho médio de gota. Já a amostra GA4 (gelatina acilada com ajuste de pH) apresentou o valor de diâmetro médio estatisticamente igual à amostra da gelatina padrão GP1 e da outra gelatina acilada com ajuste de pH (GA5). Após 12 dias de estocagem, nota-se que, a amostra GA1 continuou apresentando maior tamanho médio de gota, enquanto que as amostras de gelatina acilada com ajuste de pH (GA4 e GA5) apresentaram os menores valores de diâmetro médio das gotas.

A Figura 4.12 mostra a separação de fases das emulsões após 12 dias de estocagem. Para o tempo zero de estocagem, nenhuma das amostras apresentou separação de fases visual.

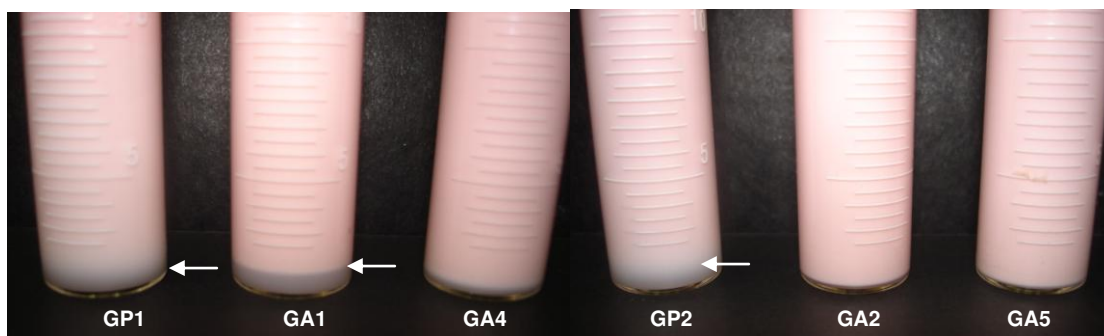


Figura 4.12. Ilustração da separação de fases após 12 dias de estocagem.

A separação de fases de uma emulsão pode ser diretamente correlacionada ao diâmetro médio das gotas, uma vez que a coalescência acarreta na formação de gotas de tamanhos maiores e conseqüentemente leva à separação de fases da emulsão. Conforme já havia sido concluído através da avaliação do diâmetro médio de gota, a amostra GA1 foi a que apresentou pior resultado, com maior separação de fases que as demais amostras. Já a amostra GA5 (gelatina acilada com ajuste de pH), pareceu ser a mais homogênea, sem qualquer sinal de separação de fases.

Os testes preliminares mostraram que os melhores resultados obtidos foram através da reação a seco da gelatina com ajuste de pH, pois dessa forma, existe uma menor competição da gelatina pela água do meio de reação e também menor hidrólise do reagente de acilação. O ajuste do pH da gelatina para a reação é importante para que os grupos terminais da cadeia de gelatina se tornem mais reativos, ou seja, o pH deve estar próximo ou acima do pKa dos grupos funcionais disponíveis para a reação. No entanto, o aumento do pH da gelatina acarreta em

perda de força de gel, característica que também pode mostrar influência na estabilização de emulsões.

4.2. Definição das melhores condições para a reação de acilação a seco da gelatina

Para a definição das melhores condições para a reação de acilação, foi feito um delineamento experimental DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2^2 , para as variáveis: pH da reação e concentração do reagente da reação (cloreto de lauroíla). Foram avaliadas cinco respostas: grau de acilação (GA), atividade (AE) e estabilidade emulsificante (ES), força de gel (Bloom) e viscosidade. A gelatina utilizada como padrão foi a gelatina GP2, cujos resultados obtidos foram melhores do que para a gelatina GP1 (item 4.1.5). A partir deste momento ela será tratada apenas como gelatina padrão “GP”.

As tabelas dos coeficientes de regressão para cada resposta do planejamento se encontram no Anexo 1. Devido à grande variabilidade inerente ao processo de modificação da gelatina, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$).

4.2.1. Grau de hidrólise (GH) e de acilação (GA)

Os resultados obtidos para o número de grupos amino livres ou grau de hidrólise (GH) e o grau de acilação (GA) das gelatinas aciladas e seus respectivos “controles”, assim como para a gelatina padrão (GP) são mostrados na Tabela 4.9. As gelatinas “controle” (sem adição do reagente) e a gelatina padrão não apresentam resultado de GA uma vez que este é calculado através da diferença

relativa entre o GH da gelatina acilada e seu respectivo “controle” obtidos no mesmo pH de reação.

Tabela 4.9. Grau de hidrólise (GH) e grau de acilação (GA) para as gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>GH (%)</i>	<i>GA (%)</i>
GP	5,7	0,0	$3,57 \pm 0,19^c$	-
MD12	8,0	0,0	$4,47 \pm 0,19^b$	-
MD05	8,0	9,0	$4,21 \pm 0,10^{b,c}$	$5,6 \pm 1,7^{b,c,d}$
MD13	8,4	0,0	$4,27 \pm 0,21^{b,c}$	-
MD01	8,4	6,9	$4,24 \pm 0,13^{b,c}$	$0,6 \pm 6,7^{c,d}$
MD03	8,4	11,1	$4,14 \pm 0,25^{b,c}$	$3,2 \pm 2,5^{b,c,d}$
MD14	9,5	0,0	$4,41 \pm 0,35^b$	-
MD07	9,5	6,0	$4,53 \pm 0,38^b$	$0,0 \pm 0,0^d$
MD09	9,5	9,0	$4,49 \pm 0,30^b$	$0,0 \pm 0,0^d$
MD10	9,5	9,0	$4,35 \pm 0,31^b$	$1,3 \pm 2,9^{b,c,d}$
MD11	9,5	9,0	$4,29 \pm 0,24^b$	$2,5 \pm 2,7^{b,c,d}$
MD08	9,5	12,0	$4,19 \pm 0,39^{b,c}$	$5,1 \pm 1,7^{b,c,d}$
MD15	10,6	0,0	$4,80 \pm 0,17^b$	-
MD02	10,6	6,9	$4,31 \pm 0,14^b$	$10,1 \pm 2,0^b$
MD04	10,6	11,1	$4,38 \pm 0,06^b$	$8,6 \pm 2,9^{b,c}$
MD16	11,0	0,0	$5,95 \pm 0,10^a$	-
MD06	11,0	9,0	$4,74 \pm 0,09^b$	$21,1 \pm 1,1^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

O grau de hidrólise representa a quantidade de grupos NH_2 livres presentes na gelatina, ou seja, quanto maior o grau de hidrólise, maior a quantidade de grupos NH_2 livres na amostra. No caso das gelatinas aciladas, era esperado que o valor de GH encontrado fosse menor do que o valor encontrado para seu respectivo “controle”, uma vez que a reação de acilação ocorre no grupamento amino da cadeia de gelatina. Já na comparação entre os pHs da reação sem

adição do reagente, quanto mais alto o pH da mesma, maior o GH devido à hidrólise da proteína em condições alcalinas.

Avaliando-se primeiramente os resultados de GH obtidos para as repetições no ponto central, vemos que os três ensaios (MD09, MD10 e MD11) apresentaram valores estatisticamente iguais entre si, o que mostra boa repetibilidade do método. Além disso, comparando-se o GH para cada grupo de amostras no mesmo valor de pH de reação, pode-se observar que apenas os ensaios MD16 e MD06, ocorridos em pH 11,0 mostraram diferenças significativas entre si, sendo o valor encontrado para MD06 menor que o MD16.

Observando-se os resultados do grau de acilação (GA) das gelatinas aciladas, vemos que apenas a gelatina MD06, obtida no maior pH de reação, apresentou resultado significativamente maior do que os demais. A Equação 4.3 mostra o sentido e o efeito de cada variável no grau de acilação da gelatina. Conforme pode ser visto, apenas os termos linear e quadrático do pH da reação tiveram influência significativa e positiva sobre o grau de acilação.

A Tabela 4.10 mostra a análise de variância ANOVA para o grau de acilação da gelatina.

$$GA = 4,61 * \text{pH reação} + 5,96 * \text{pH reação}^2 \quad (4.3)$$

Tabela 4.10. Análise de variância (ANOVA) para o grau de acilação.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F_{calc}</i>
Regressão	1	414,40	414,40	108,21
Resíduos	9	34,47	3,83	
Total	10	448,87		
% de variação explicada (R^2) = 92,32		$F_{\text{tab } 1;9;0.1} = 10,56$		

O valor de F_{calc} encontrado é cerca de 10 vezes maior que o F_{tab} e a porcentagem de variação explicada pelo modelo bastante alta ($R^2 = 92,32$), mostrando que este pode ser utilizado para representar os dados experimentais para essa resposta.

Observando-se os resultados de p-valor mostrados na Tabela A do Anexo I, vemos que, apesar do valor encontrado para a variável de concentração do reagente ser maior que 0,1, ele é ainda bastante baixo, mostrando que existe certa influência desta variável no grau de acilação das gelatinas. A Figura 4.13 mostra a superfície de resposta e a curva de contorno para o grau de acilação. Apesar de a concentração do reagente não ter apresentado influência significativa com 90% de confiança, nota-se que os maiores valores de grau de acilação são obtidos para gelatinas cuja reação ocorreu nos pHs mais altos e com a maior concentração de reagente.

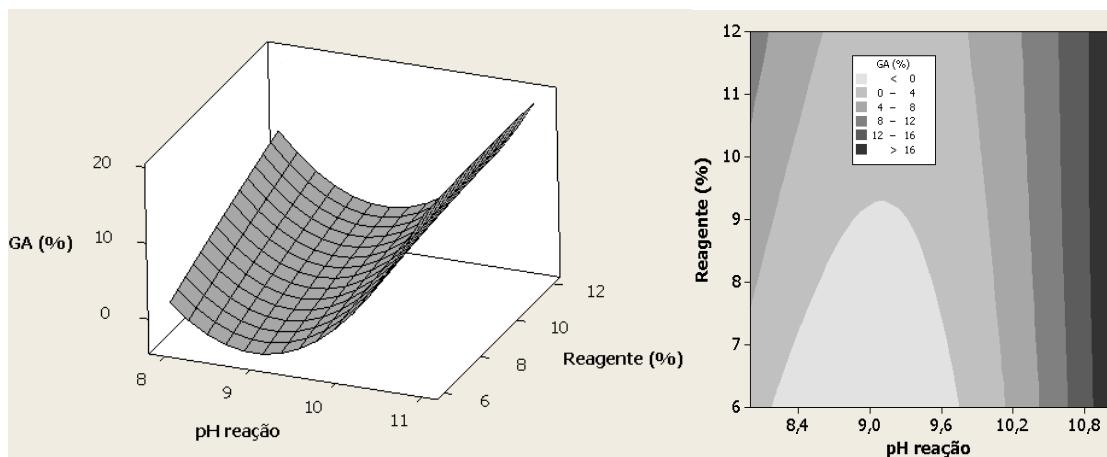


Figura 4.13. Superfícies de resposta para o grau de acilação das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.

Os resultados obtidos mostram que, possivelmente, a reação de acilação apenas tornou-se efetiva quando ocorrida em pH extremamente alcalino (pH 11,0). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de os aminoácidos que possuem grupo terminal amino e por isso estão disponíveis para a reação (arginina, lisina e hidroxilisina), apresentam altos valores de pK_a , o que indica que possuem maior reatividade em meio com alto pH (DAMODARAN, 1996).

4.2.2. Atividade e estabilidade emulsificante

Os resultados obtidos para a atividade emulsificante (AE) e estabilidade emulsificante (ES) das gelatinas aciladas e seus respectivos “controles”, assim como a gelatina padrão (GP) são mostrados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Atividade (AE) e estabilidade emulsificante (ES) para as gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.

<i>Amostra</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>AE (g⁻¹)</i>	<i>ES (%)</i>
GP	5,7	0,0	1,60 ± 0,06 ^{a,b}	56,3 ± 11,7 ^a
MD12	8,0	0,0	1,30 ± 0,02 ^{c,d}	65,0 ± 6,8 ^a
MD05	8,0	9,0	1,50 ± 0,03 ^{b,c,d}	66,1 ± 12,0 ^a
MD13	8,4	0,0	1,25 ± 0,07 ^d	61,4 ± 9,4 ^a
MD01	8,4	6,9	1,39 ± 0,19 ^{b,c,d}	70,1 ± 4,9 ^a
MD03	8,4	11,1	1,48 ± 0,17 ^{b,c,d}	65,3 ± 11,3 ^a
MD14	9,5	0,0	1,36 ± 0,04 ^{b,c,d}	57,3 ± 11,1 ^a
MD07	9,5	6,0	1,46 ± 0,10 ^{b,c,d}	66,7 ± 6,2 ^a
MD09	9,5	9,0	1,45 ± 0,08 ^{b,c,d}	64,0 ± 10,3 ^a
MD10	9,5	9,0	1,42 ± 0,05 ^{b,c,d}	63,0 ± 12,4 ^a
MD11	9,5	9,0	1,47 ± 0,03 ^{b,c,d}	61,9 ± 4,7 ^a
MD08	9,5	12,0	1,57 ± 0,18 ^{a,b}	61,1 ± 10,2 ^a
MD15	10,6	0,0	1,37 ± 0,02 ^{b,c,d}	56,0 ± 6,0 ^a
MD02	10,6	6,9	1,43 ± 0,19 ^{b,c,d}	63,0 ± 10,8 ^a
MD04	10,6	11,1	1,56 ± 0,31 ^{a,b,c}	64,8 ± 6,2 ^a
MD16	11,0	0,0	1,36 ± 0,02 ^{b,c}	58,3 ± 15,3 ^a
MD06	11,0	9,0	1,77 ± 0,13 ^a	66,3 ± 9,6 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Avaliando-se primeiramente os resultados obtidos para as repetições no ponto central, vemos que os três ensaios (MD09, MD10 e MD11) apresentaram valores estatisticamente iguais entre si, mostrando novamente boa repetibilidade do método. Verificou-se também que a atividade emulsificante (AE) para cada grupo de amostras no mesmo valor de pH de reação, mostrou uma tendência de maiores valores de AE quanto maior a quantidade de reagente adicionado, apesar de que boa parte dos resultados não foi estatisticamente diferente. O maior

resultado de AE foi obtido para a amostra MD06, cuja reação foi conduzida em pH 11,0 com 9% de reagente.

Para a estabilidade emulsificante (ES), os resultados encontrados foram estatisticamente iguais para todas as amostras, não sendo possível obter nenhuma conclusão quanto à tendência dos resultados. Talvez a condição de tempo e temperatura utilizada (80°C/30 minutos) tenha sido muito drástica levando a que todas as amostras se comportassem de forma similar. No entanto, é interessante notar que, observando os grupos de amostras cuja reação ocorreu no mesmo pH, houve uma tendência de obtenção de piores resultados para as amostras “controle”.

A Equação 4.4 mostra o sentido e o efeito de cada variável na atividade emulsificante (AE) da gelatina. Conforme pode ser visto, apenas o termo linear do pH da reação teve influência significativa e positiva sobre a AE.

$$AE = 1,447 + 0,064 * \text{pH reação} \quad (4.4)$$

Tabela 4.12. Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F_{calc}</i>
Regressão	1	0,076	0,076	20,500
Resíduos	9	0,033	0,004	
Total	10	0,109		
% de variação explicada (R ²) = 69,49				F _{tab 1;9;0.1} = 10,56

O valor de F_{calc} encontrado é apenas 2 vezes maior que o F_{tab} e a porcentagem de variação explicada pelo modelo não é satisfatória (R² = 69,49),

mostrando que não há um bom ajuste dos valores experimentais ao modelo proposto. No entanto, observando-se os resultados de p-valor mostrados na Tabela B do Anexo I, vemos que, apesar do valor encontrado para a variável de concentração do reagente ser maior que 0,1, ele é ainda bastante baixo, mostrando que existe certa influência desta variável na atividade emulsificante das gelatinas. Observando a Figura 4.14, que mostra a superfície de resposta e a curva de contorno para a EA, vemos que existe uma tendência de obtenção de maiores valores de AE quanto maior o pH da reação e maior a quantidade de reagente utilizado.

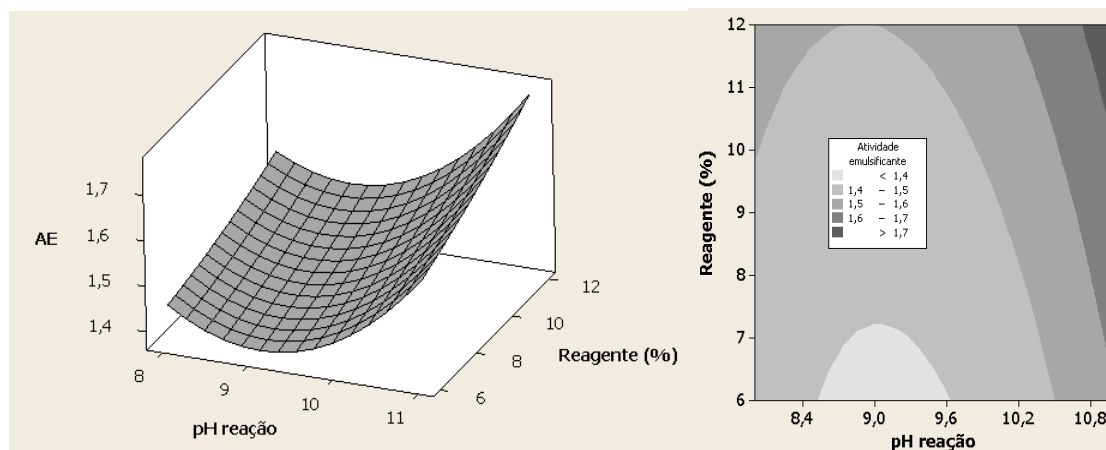


Figura 4.14. Superfícies de resposta para a atividade emulsificante das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.

Novamente nota-se que os resultados obtidos mostram que a reação de acilação apenas tornou-se efetiva para o aumento da atividade emulsificante quando em condições de pH altamente alcalino (pH 11,0).

4.2.3. Força de gel (Bloom)

Os resultados de força de gel das gelatinas aciladas e seus respectivos “controles”, assim como a gelatina padrão (GP) são mostrados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13. Força de gel para as gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.

<i>Amostra</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>Bloom (g)</i>
GP	5,7	0,0	260,00 ± 2,83 ^b
MD12	8,0	0,0	272,40 ± 0,28 ^a
MD05	8,0	9,0	214,50 ± 0,00 ^e
MD13	8,4	0,0	247,95 ± 0,35 ^c
MD01	8,4	6,9	228,75 ± 1,20 ^d
MD03	8,4	11,1	233,10 ± 0,28 ^d
MD14	9,5	0,0	213,15 ± 0,78 ^e
MD07	9,5	6,0	198,85 ± 0,78 ^g
MD09	9,5	9,0	230,00 ± 1,70 ^d
MD10	9,5	9,0	204,10 ± 1,70 ^f
MD11	9,5	9,0	200,30 ± 0,28 ^{t,g}
MD08	9,5	12,0	199,40 ± 1,41 ^{t,g}
MD15	10,6	0,0	158,10 ± 0,14 ⁱ
MD02	10,6	6,9	162,90 ± 1,41 ⁱ
MD04	10,6	11,1	146,95 ± 1,77 ^j
MD16	11,0	0,0	168,70 ± 2,12 ⁿ
MD06	11,0	9,0	136,00 ± 0,14 ^k

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05).

A avaliação dos resultados das gelatinas “controle” mostra claramente que quanto maior o pH da reação, menor a força de gel da gelatina. Esses resultados são coerentes com os dados de literatura que mostram os efeitos do aumento do pH na hidrólise das cadeias de gelatina e conseqüente redução da força de gel das mesmas (WARD; COURTS, 1977). É interessante observar que as gelatinas

“controle” em comparação com as aciladas no mesmo pH mostraram que a adição do reagente também levou a uma redução do Bloom. No entanto, observando-se os resultados de p-valor mostrados na Tabela C do Anexo I, vemos que, o valor encontrado para a variável de concentração do reagente é bem maior que 0,1, mostrando que não existe influência desta variável na força de gel das gelatinas.

A Equação 4.5 mostra o sentido e o efeito de cada variável na força de gel da gelatina. Conforme pode ser visto, apenas os termos linear e quadrático do pH da reação tiveram influência significativa e negativa sobre a força de gel da gelatina.

$$\text{Bloom} = 211,47 - 32,88 * \text{pH reação} - 16,67 * \text{pH reação}^2 \quad (4.5)$$

Tabela 4.14. Análise de variância (ANOVA) para a força de gel.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F_{calc}</i>
Regressão	2	10335,0	5167,5	50,57
Resíduos	8	817,4	102,18	
Total	10	11152,4		

% de variação explicada (R^2) = 92,67

$F_{\text{tab } 2;8;0.1} = 8,65$

O valor de F_{calc} encontrado é cerca de 6 vezes maior que o F_{tab} e a porcentagem de variação explicada pelo modelo é boa ($R^2 = 92,67$), mostrando que há um bom ajuste dos valores experimentais ao modelo proposto.

Observando a Figura 4.15, que mostra a superfície de resposta e a curva de contorno para a força de gel, vemos os menores valores de Bloom são obtidos com maiores valores de pH da reação. Já a concentração do reagente não afetou significativamente a força de gel da gelatina.

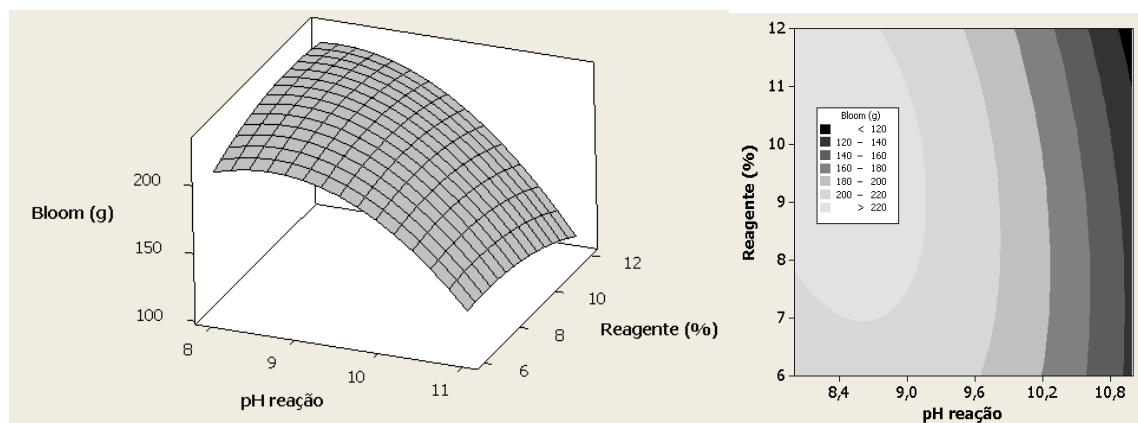


Figura 4.15. Superfícies de resposta para a força de gel das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.

4.2.4. Viscosidade

Os resultados obtidos para a viscosidade das gelatinas aciladas, seus respectivos “controles” e da gelatina padrão (GP) são mostrados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15. Viscosidade das gelatinas aciladas, padrão (GP) e “controle”.

<i>Amostra</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>Viscosidade (mP)</i>
GP	5,7	0,0	45,00 ± 0,14 ^b
MD12	8,0	0,0	54,40 ± 0,14 ^a
MD05	8,0	9,0	29,30 ± 0,99 ^{h,i}
MD13	8,4	0,0	43,45 ± 0,07 ^b
MD01	8,4	6,9	34,20 ± 0,28 ^e
MD03	8,4	11,1	28,95 ± 0,07 ^{h,i}
MD14	9,5	0,0	41,55 ± 0,07 ^c
MD07	9,5	6,0	34,05 ± 0,07 ^e
MD09	9,5	9,0	29,80 ± 0,28 ^{g,h}
MD10	9,5	9,0	31,05 ± 0,07 ^{t,g}
MD11	9,5	9,0	29,60 ± 0,85 ^{g,h,i}
MD08	9,5	12,0	28,15 ± 0,21 ⁱ
MD15	10,6	0,0	33,15 ± 0,21 ^e
MD02	10,6	6,9	31,50 ± 0,71 [†]
MD04	10,6	11,1	23,15 ± 0,21 ^j
MD16	11,0	0,0	36,00 ± 0,14 ^d
MD06	11,0	9,0	28,050 ± 0,071 ⁱ

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05).

Observando-se os resultados de viscosidade, parece que existe uma influência tanto do pH da reação quanto da concentração de reagente, pois o aumento destas variáveis levou à redução do valor de viscosidade final obtido. A análise dos resultados de p-valor mostrados na Tabela D do Anexo I mostra que os valores encontrados tanto para a variável pH da reação quanto para a concentração do reagente são menores que 0,1, mostrando que existe influência destas variáveis na viscosidade das gelatinas.

A Equação 4.6 mostra o sentido e o efeito de cada variável na viscosidade das gelatinas aciladas. Conforme pode ser visto, apenas os termos lineares do pH da reação e da concentração do reagente tiveram influência significativa e negativa sobre a viscosidade da gelatina.

$$\text{Viscosidade} = 30,15 - 1,28 * \text{pH reação} - 2,74 * \text{Reagente (\%)} \quad (4.6)$$

Tabela 4.16. Análise de variância (ANOVA) para a viscosidade.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F_{calc}</i>
Regressão	2	82,16	41,08	30,61
Resíduos	8	10,74	1,34	
Total	10	92,90		
% de variação explicada (R^2) = 88,44				$F_{\text{tab } 2;8;0.1} = 8,65$

O valor de F_{calc} encontrado é apenas 3,5 vezes maior que o F_{tab} , porém a porcentagem de variação explicada pelo modelo é satisfatória ($R^2 = 88,44$), mostrando que os valores experimentais se ajustam ao modelo proposto.

Observando a Figura 4.16, que mostra a superfície de resposta e a curva de contorno para a viscosidade, vemos que existe uma tendência de obtenção de menores valores de viscosidade quanto maior o pH da reação e a concentração do reagente.

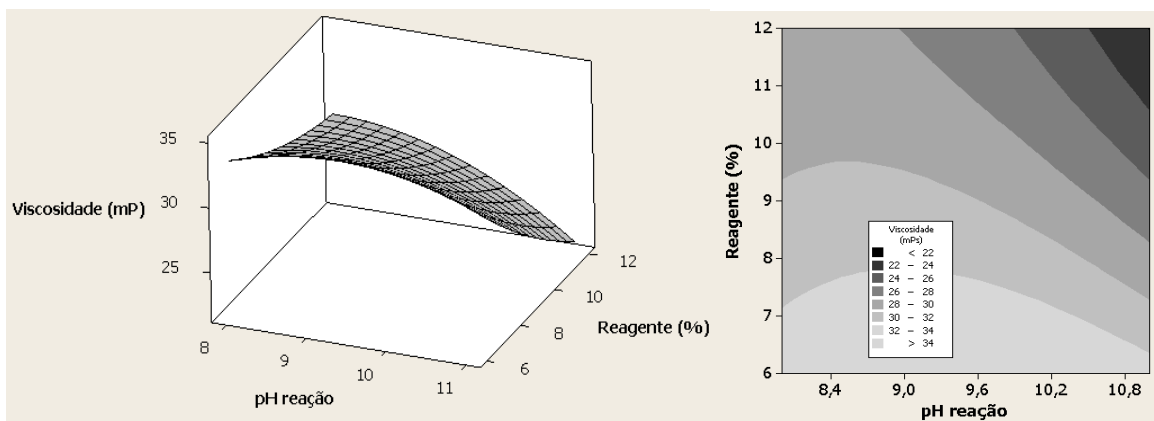


Figura 4.16. Superfícies de resposta para a viscosidade das gelatinas aciladas em diferentes condições de reação.

Os resultados obtidos para as 4 respostas do delineamento experimental indicam que a reação de acilação teve uma maior efetividade quando ocorrida em pH extremamente alcalino. A concentração do reagente cloreto de acila não teve efeito significativo sobre as respostas do delineamento, exceto a viscosidade, no entanto, a combinação da condição extremamente alcalina (pH 11,0) com uma alta quantidade de reagente (9,0%), correspondente à amostra MD06, foi a que resultou em maior grau de acilação e atividade emulsificante da gelatina submetida à acilação.

4.3. Caracterização físico-química das gelatinas aciladas

As amostras foram avaliadas quanto aos teores de proteína, cinzas, umidade e cloretos. Os resultados obtidos podem ser observados nas Tabelas 4.17 e 4.18.

Tabela 4.17. Teor de proteína e cinzas para as gelatinas aciladas.

<i>Amostra</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>Proteína (%)</i>	<i>Cinzas (%)</i>
GP	5,7	0,0	87,70 ± 0,85 ^{b,c,d}	0,900 ± 0,028 ^a
MD12	8,0	0,0	91,56 ± 1,39 ^a	0,610 ± 0,028 ^b
MD05	8,0	9,0	80,18 ± 0,26 ^g	0,015 ± 0,007 ^e
MD13	8,4	0,0	88,10 ± 0,98 ^{a,b,c}	0,205 ± 0,021 ^d
MD01	8,4	6,9	81,78 ± 0,83 ^{f,g}	0,025 ± 0,021 ^e
MD03	8,4	11,1	80,22 ± 0,45 ^g	0,035 ± 0,007 ^e
MD14	9,5	0,0	85,75 ± 1,32 ^{b,c,d,e}	0,250 ± 0,042 ^{c,d}
MD07	9,5	6,0	82,46 ± 0,62 ^{e,f,g}	0,013 ± 0,010 ^e
MD09	9,5	9,0	81,88 ± 1,22 ^{f,g}	0,030 ± 0,014 ^e
MD10	9,5	9,0	84,87 ± 0,42 ^{c,d,e,f}	0,010 ± 0,001 ^e
MD11	9,5	9,0	82,40 ± 5,19 ^{e,f,g}	0,015 ± 0,008 ^e
MD08	9,5	12,0	79,25 ± 0,26 ^g	0,025 ± 0,007 ^e
MD15	10,6	0,0	86,21 ± 0,89 ^{b,c,d}	0,295 ± 0,021 ^c
MD02	10,6	6,9	84,39 ± 0,40 ^{c,d,e,f}	0,020 ± 0,014 ^e
MD04	10,6	11,1	79,25 ± 0,08 ^g	0,020 ± 0,014 ^e
MD16	11,0	0,0	89,32 ± 1,61 ^{a,b}	0,195 ± 0,021 ^d
MD06	11,0	9,0	84,30 ± 0,25 ^{d,e,f}	0,015 ± 0,007 ^e

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Avaliando-se as gelatinas aciladas em relação a seus respectivos “controles”, observa-se que, estas apresentaram menor o teor final de proteína do que as “controles”, diferença explicada pela massa de reagente adicionada durante a reação de acilação da gelatina.

Para as cinzas, é possível observar um maior valor para a gelatina padrão (GP), que não passou pelo mesmo processo de deionização feito para as gelatinas modificadas e seus respectivos “controles”. Por outro lado, avaliando as gelatinas para cada grupo de pH onde a reação ocorreu, observa-se que as gelatinas “controle” apresentaram sempre valores mais altos de cinzas do que as

respectivas gelatinas modificadas. Isso pode ser explicado pela possível formação do sal NaCl nas gelatinas aciladas, que foi quase totalmente removido na deionização. No caso das gelatinas “controle”, parte do Na⁺ proveniente do hidróxido de sódio utilizado para o ajuste de pH poderia estar ligado à cadeia de gelatina e não ter sido removido na deionização, mostrando maior valor de cinzas.

Tabela 4.18. Teor de umidade e cloretos para as gelatinas aciladas.

<i>Amostra</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Cloretos (ppm)</i>
GP	5,7	0,0	12,80 ± 0,42 ^e	1098,0 ± 11,3 ^g
MD12	8,0	0,0	7,75 ± 0,35 ^g	31,2 ± 7,5 ^j
MD05	8,0	9,0	17,45 ± 0,07 ^a	710,3 ± 10,1 ⁱ
MD13	8,4	0,0	10,40 ± 0,28 ⁱ	24,9 ± 0,3 ^j
MD01	8,4	6,9	14,65 ± 0,07 ^{c,d}	2315,4 ± 17,1 ^a
MD03	8,4	11,1	15,35 ± 0,07 ^{b,c}	1804,5 ± 0,6 ^b
MD14	9,5	0,0	12,65 ± 0,21 ^e	19,1 ± 2,4 ^j
MD07	9,5	6,0	15,75 ± 0,07 ^b	1666,3 ± 6,7 ^c
MD09	9,5	9,0	15,85 ± 0,07 ^b	1320,2 ± 6,6 ⁱ
MD10	9,5	9,0	14,35 ± 0,21 ^d	831,4 ± 3,8 ^h
MD11	9,5	9,0	14,70 ± 0,14 ^{c,d}	856,7 ± 5,6 ^h
MD08	9,5	12,0	15,95 ± 0,07 ^b	1429,5 ± 12,2 ^e
MD15	10,6	0,0	12,80 ± 0,14 ^e	28,6 ± 8,6 ^j
MD02	10,6	6,9	12,80 ± 0,14 ^e	2326,0 ± 6,7 ^a
MD04	10,6	11,1	15,80 ± 0,00 ^b	1509,0 ± 7,7 ^d
MD16	11,0	0,0	10,00 ± 0,14 ⁱ	20,6 ± 3,4 ^j
MD06	11,0	9,0	14,15 ± 0,21 ^d	1479,6 ± 20,7 ^d

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05).

No caso da umidade, não foi possível observar nenhuma tendência em relação ao pH da reação ou quantidade de reagente adicionado. Como todas as gelatinas foram secas em estufas de convecção forçada, as variações

encontradas podem ser explicadas por diferenças na umidade relativa do ar durante a secagem.

Para o teor de cloretos, nota-se que todas as gelatinas “controle” apresentaram menores teores em relação a suas respectivas gelatinas aciladas. No caso das gelatinas “controle”, o cloreto que aparece é proveniente do próprio processo de fabricação da gelatina, como pode ser visto também no valor encontrado para a gelatina padrão, que não foi deionizada. Para as gelatinas aciladas, o cloreto detectado é proveniente do reagente de acilação, cloreto de lauroíla, cujo resíduo também não foi totalmente eliminado no processo de deionização, aparecendo em concentração similar a da gelatina padrão.

4.3.1. Distribuição de ponto isoelétrico

A Figura 4.17 mostra os géis obtidos para as gelatinas aciladas cuja reação ocorreu em pH 8,4 e 9,5 e a Figura 4.18 mostra os géis para as amostras cuja reação ocorreu em pHs 8, 10,6 e 11, além de uma amostra da repetição do ponto central do delineamento. Uma vez que a reação de acilação promove a ligação das moléculas através do grupo amino livre, esperava-se observar uma redução do *pI* na amostra modificada. No entanto, não foi possível detectar diferenças entre as amostras. A distribuição de ponto isoelétrico foi muito similar para todas as gelatinas, sendo a faixa de maior intensidade em torno de 5,2, assim como da gelatina padrão (GP).

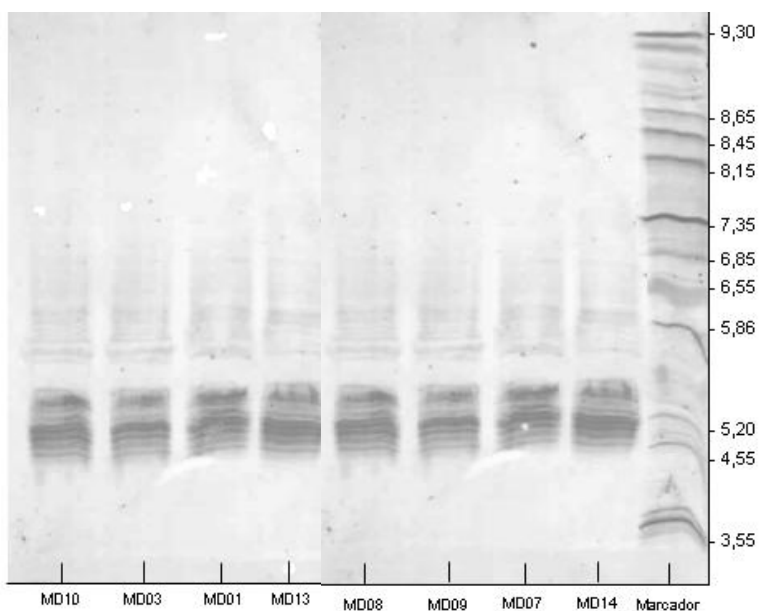


Figura 4.17. Perfil de distribuição de ponto isoelétrico das gelatinas aciladas em pH 8,4 e 9,5.

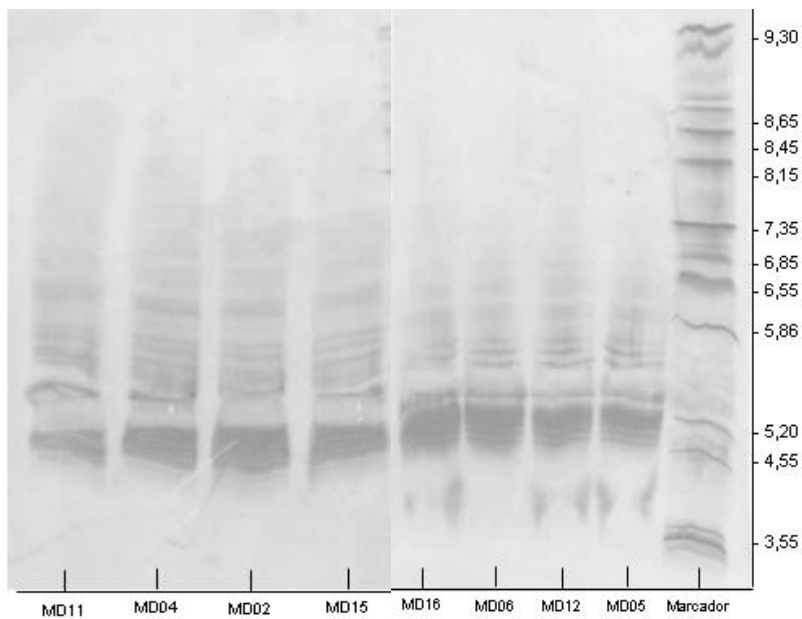


Figura 4.18. Perfil de distribuição de ponto isoelétrico das gelatinas aciladas em pH 8, 10,6 e 11.

4.3.2. Distribuição de massa molecular

A distribuição de massa molecular das amostras foi feita através da análise de cromatografia de permeação em gel (GPC), que é realizada por exclusão de acordo com o tamanho molecular das substâncias a serem analisadas. O tempo de retenção é relacionado com o tamanho e massa molecular através da integração da área do pico, sendo que maior massa molecular apresenta menor tempo de retenção. Os resultados obtidos para todas as amostras podem ser vistos no Anexo 2 e na Tabela 4.19, que mostra os percentuais de distribuição em cada faixa de massa molecular em intervalos de 100 kDa.

Tabela 4.19. Distribuição de massa molecular das gelatinas aciladas.

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>Massa molecular (% kDa)</i>					
			<i><100</i>	<i>100-200</i>	<i>200-300</i>	<i>300-400</i>	<i>400-500</i>	<i>>500</i>
GP	5,7	0,0	62	13	9	9	7	0
MD12	8,0	0,0	63	14	10	10	3	0
MD05	8,0	9,0	63	13	8	9	7	0
MD13	8,4	0,0	63	15	9	11	2	0
MD01	8,4	6,9	63	12	9	9	6	1
MD03	8,4	11,1	67	12	8	8	5	0
MD14	9,5	0,0	66	14	10	9	1	0
MD07	9,5	6,0	66	14	9	8	3	0
MD09	9,5	9,0	67	14	8	9	2	0
MD10	9,5	9,0	68	13	9	8	2	0
MD11	9,5	9,0	68	13	8	9	2	0
MD08	9,5	12,0	69	12	8	9	2	0
MD15	10,6	0,0	69	13	9	8	1	0
MD02	10,6	6,9	64	12	8	8	8	0
MD04	10,6	11,1	68	12	7	9	4	0
MD16	11,0	0,0	69	13	9	8	1	0
MD06	11,0	9,0	67	13	7	8	5	0

Através da Tabela 4.19 é possível observar a influência do ajuste de pH no perfil de distribuição de massa molecular das gelatinas. Nota-se claramente que conforme se aumenta o pH em que ocorreu a reação de acilação, aumenta-se o percentual de massa molecular menor que 100 kDa e diminui-se entre 400 e 500 kDa. Já a gelatina padrão (GP) possui um percentual mais elevado de massa entre 400 e 500 kDa e menos elevado para massa molecular menor que 100kDa. O aumento do pH da gelatina causa hidrólise da molécula e consequentemente aumenta a quantidade de moléculas de menor massa molecular.

No entanto, a acilação parece reverter este processo. As gelatinas aciladas apresentaram redução no percentual entre 100 e 200 kDa e aumento dos percentuais maior que 400 kDa. Com a reação de acilação, um grupo acila (no caso do cloreto de lauroíla, de tamanho de cadeia C12) é introduzido à cadeia da gelatina e com isso aumenta-se o tamanho da mesma e consequentemente aumenta-se o percentual de massa molecular maior para a gelatina acilada (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Outro indicativo dessa teoria pode ser visto através da análise dos valores de massa molecular média (M_w) e polidispersão das gelatinas aciladas, mostrados na Tabela 4.20. Para os grupos de gelatinas cujo pH de reação foram os mais altos, e provavelmente onde a reação de acilação foi mais efetiva (pH 10,6 e 11), os valores de massa molecular média mostraram uma diminuição para as gelatinas “controle” quando comparadas à gelatina padrão e um aumento para as gelatinas aciladas quando comparadas com seus respectivos “controles”.

A polidispersão da gelatina é uma medida da homogeneidade de distribuição das cadeias moleculares. Quanto maior a polidispersão, menor a

homogeneidade da amostra. A gelatina padrão apresentou o maior percentual de polidispersão enquanto as gelatinas “controle” apresentaram os menores valores. Já as gelatinas aciladas apresentaram um aumento da polidispersão quando comparadas a seus respectivos “controles”. Isso corrobora que, o aumento do pH das gelatinas levou à hidrólise da molécula resultando em cadeias menores de massas moleculares mais similares (WARD; COURTS, 1977). Com a reação de acilação e conseqüente ligação dos grupamentos acila à molécula de gelatina, obteve-se tamanhos de cadeias menos homogêneos.

Tabela 4.20. Massa molecular média (Mw) e polidispersão das gelatinas aciladas.

<i>Amostra</i>	<i>pH</i>	<i>Reagente (%)</i>	<i>Mw (kDa)</i>	<i>Polidispersão</i>
GP	5,7	0,0	123,19	38,07
MD12	8,0	0,0	112,78	8,67
MD05	8,0	9,0	122,26	12,07
MD13	8,4	0,0	112,08	8,83
MD01	8,4	6,9	121,09	12,07
MD03	8,4	11,1	108,94	17,88
MD14	9,5	0,0	103,53	8,44
MD07	9,5	6,0	105,35	7,83
MD09	9,5	9,0	101,11	11,80
MD10	9,5	9,0	98,30	12,83
MD11	9,5	9,0	99,13	13,38
MD08	9,5	12,0	97,53	11,94
MD15	10,6	0,0	94,10	7,99
MD02	10,6	6,9	123,68	8,88
MD04	10,6	11,1	105,08	10,47
MD16	11,0	0,0	94,58	8,68
MD06	11,0	9,0	107,31	9,20

4.3.3. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção de infravermelho é uma análise capaz de determinar os grupos funcionais de um material desconhecido através das diferenças nas frequências de vibração na região do infravermelho que é específica de cada ligação química da substância. Dessa forma, através da relação entre intensidade de radiação e frequência, é possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido.

O espectro FTIR da gelatina exibe algumas bandas características como: estiramentos N–H a 3320 cm^{-1} para a região amida A, estiramentos C–H a 2970 cm^{-1} para a amida B, estiramentos C=O a 1670 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} para amida I, deformações N–H a 1560 cm^{-1} para amida II, e outras bandas associadas com estiramentos C–N e deformações N–H para amida III, em torno de $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (MOZAFARI et al., 2010). Existem também bandas correspondentes a vibrações de cadeias de aminoácidos, como por exemplo, a tirosina em torno de 1515 cm^{-1} , a fenilalanina 1498 cm^{-1} , a prolina $1454\text{-}1438\text{ cm}^{-1}$ (KHER et al., 2007).

A Figura 4.19 mostra os espectros obtidos para as gelatinas “controle” obtidas em diferentes pHs de reação.

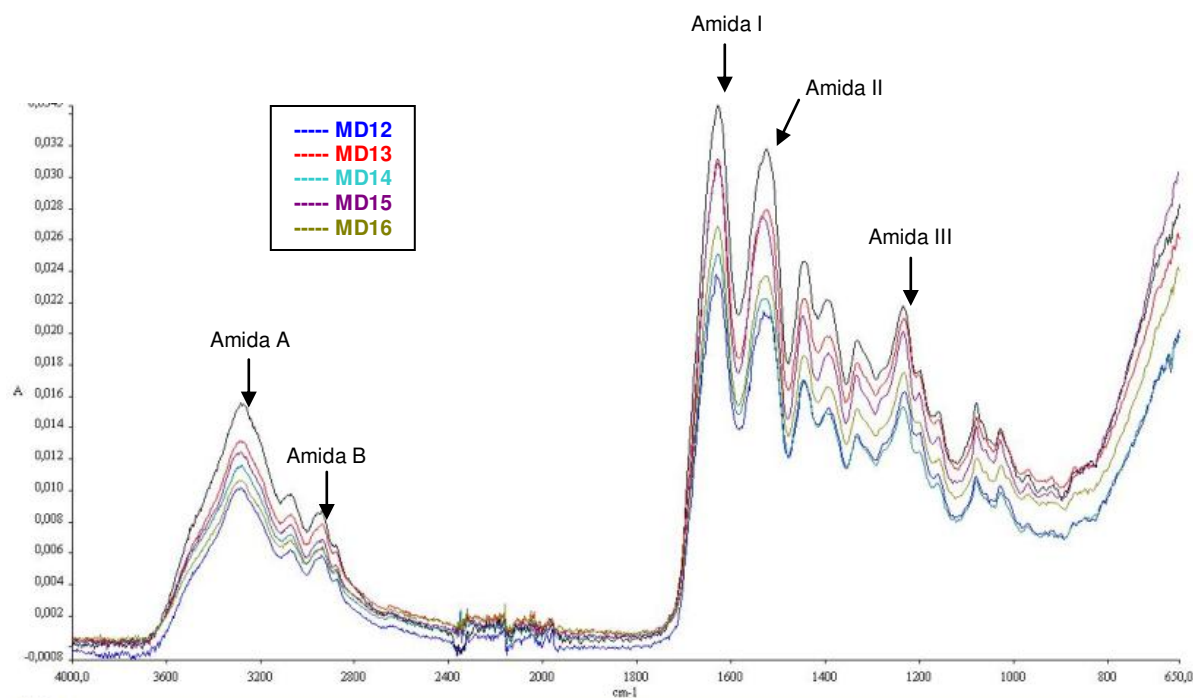


Figura 4.19. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas “controle” obtidas em diferentes pHs.

Os espectros obtidos para as gelatinas “controle” indicam que não houve variação entre as gelatinas obtidas nos diferentes pHs de reação, uma vez que as curvas obtidas foram muito similares, apresentando picos com valores muito semelhantes. Nota-se um deslocamento entre as curvas, que pode ter ocorrido devido a diferenças na quantidade de amostra utilizada ou também devido a diferenças na granulometria final das gelatinas, uma vez que o processo de moagem foi feito manualmente. A heterogeneidade das amostras pode ter levado a diferenças no momento de acondicionar as mesmas no equipamento de análise.

As Figuras 4.20 a 4.24 mostram os espectros obtidos para as gelatinas aciladas obtidas em diferentes pHs de reação.

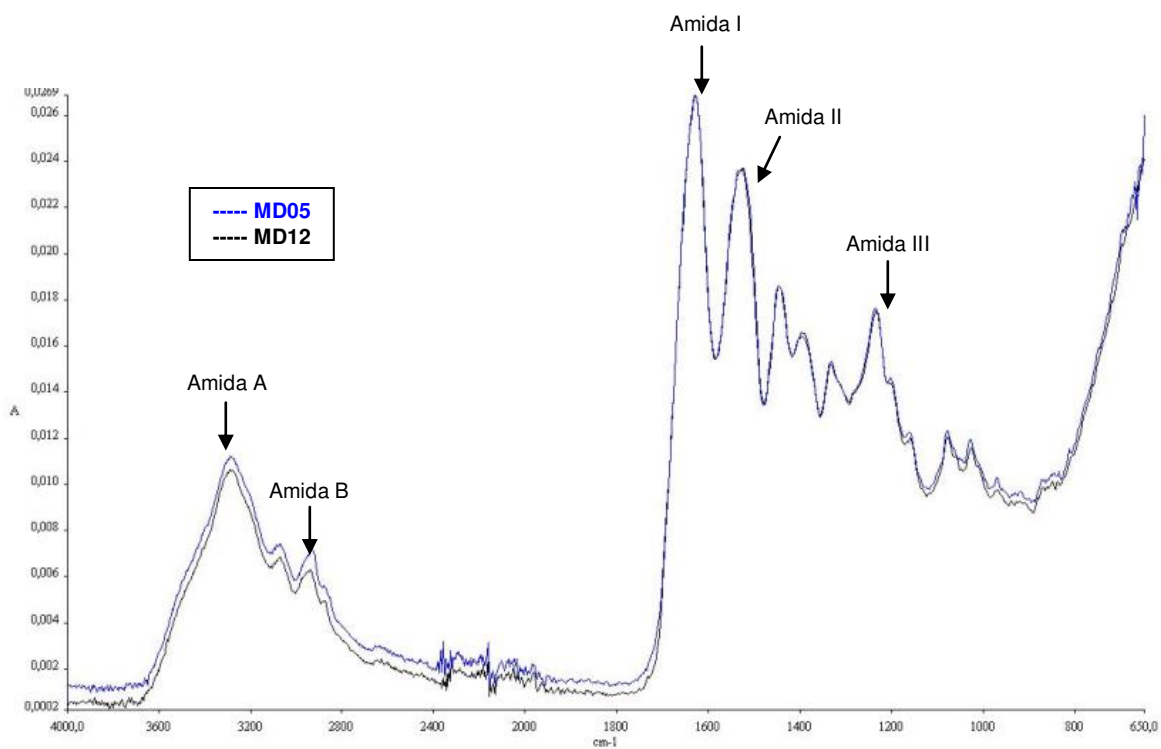


Figura 4.20. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 8,0.

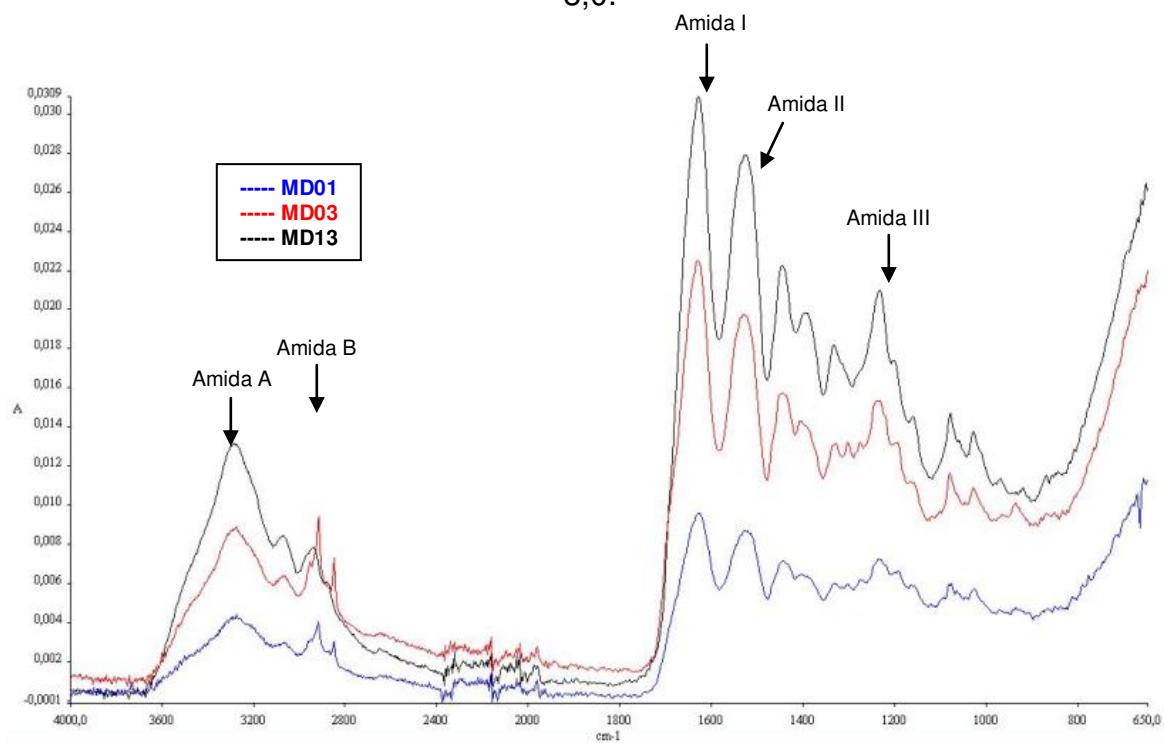


Figura 4.21. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 8,4.

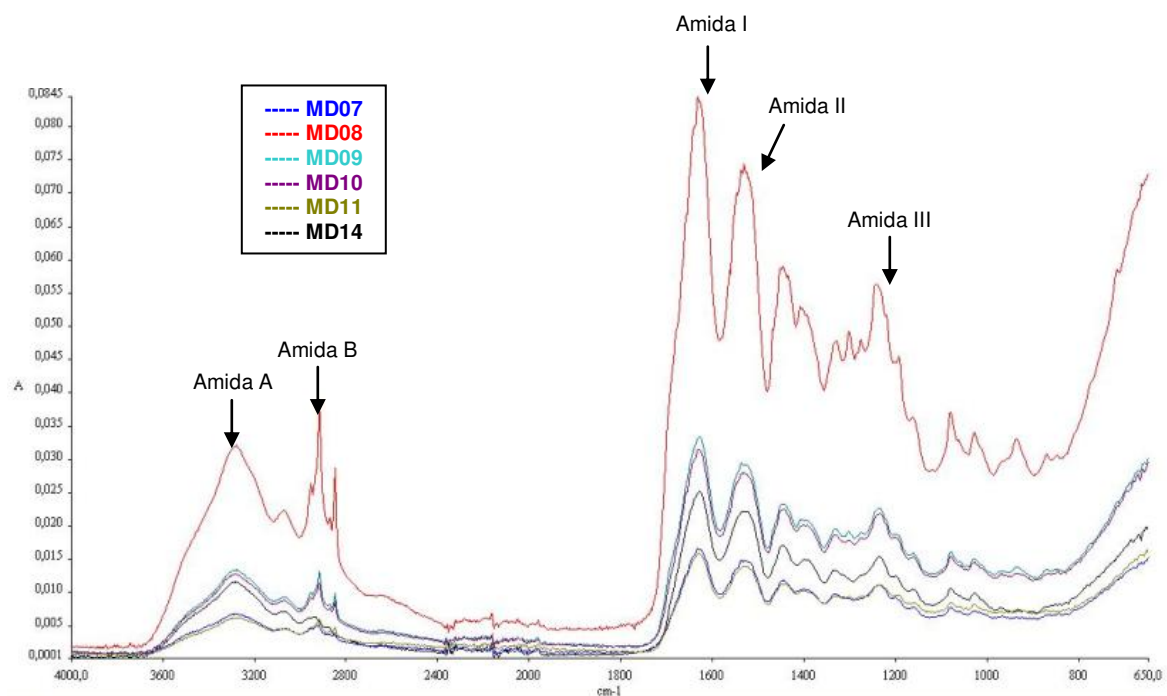


Figura 4.22. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 9,5.

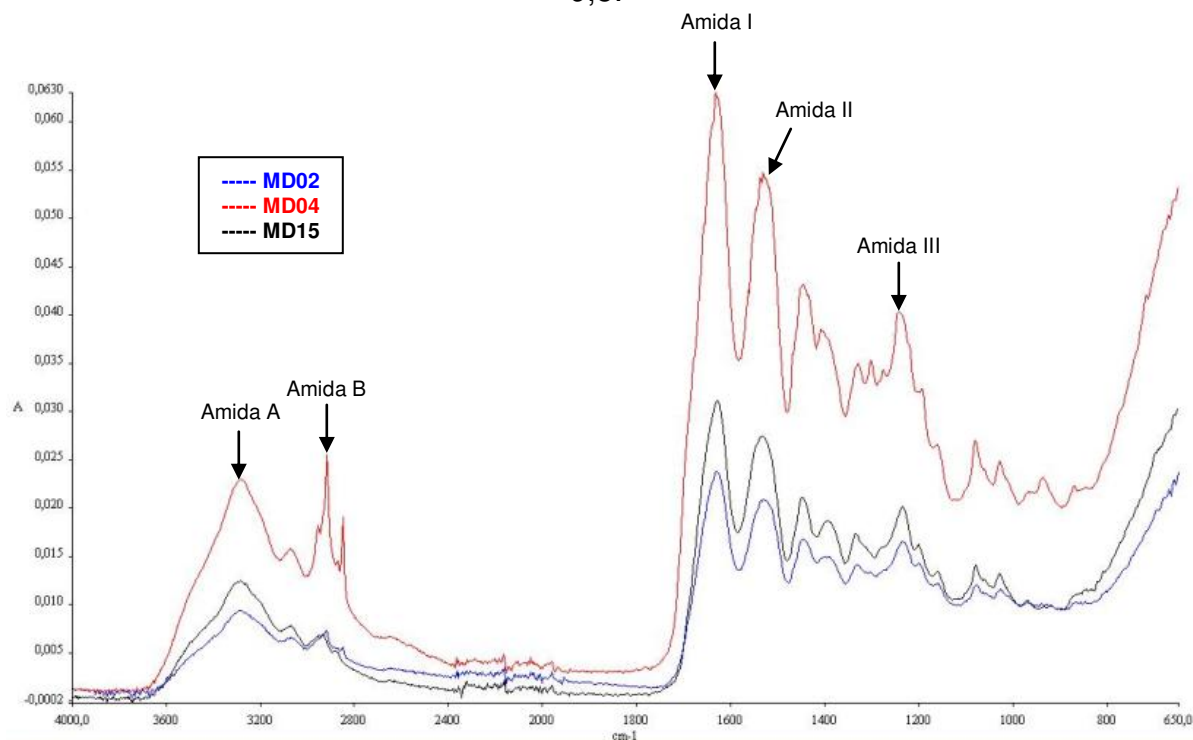


Figura 4.23. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 10,6.

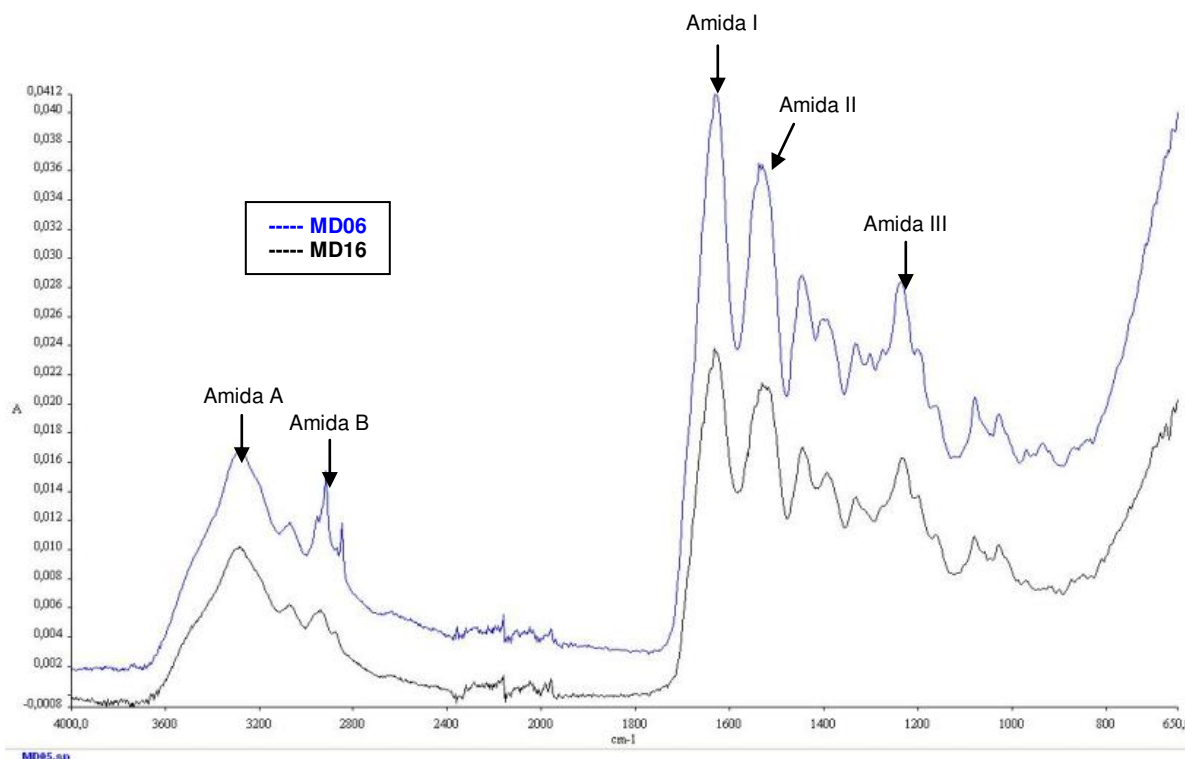


Figura 4.24. Espectro de infravermelho obtido para as gelatinas aciladas em pH 11,0.

Os espectros foram agrupados de acordo com o pH da reação da gelatina e comparados à gelatina “controle”, mostrando que não houve grande variação entre as gelatinas aciladas nos diferentes pHs de reação. As curvas obtidas se mostraram muito parecidas apresentando os mesmos sinais e picos com valores semelhantes. Pode-se notar apenas uma pequena diferença na região Amida B, em torno de 2900 cm^{-1} para as amostras de gelatina acilada com maior concentração do reagente cloreto de lauroíla. Como esta região se refere a estiramentos C-H, essa diferença na intensidade do pico pode ser explicada pelo aumento na concentração desse tipo de ligação referente à estrutura do cloreto de

lauroíla, cujo espectro de absorção apresenta maior intensidade na região de 2800 a 3000 cm^{-1} (Fonte: Sigma-Aldrich).

4.4. Avaliação do desempenho das gelatinas aciladas na estabilização de emulsões

4.4.1. Definição das condições de preparo das emulsões

Uma varredura de pressão de homogeneização e número de passagens pelo homogeneizador foi feita com a gelatina padrão (GP) visando determinar as condições ideais para a formação da emulsão. Foram utilizadas pressões variando de 100 a 700 Bar e número de passagens de até três vezes. Não foi possível produzir emulsões utilizando 1000 Bar de pressão devido ao alto aquecimento da emulsão após a passagem pelo homogenizador.

A Figura 4.25 mostra o acompanhamento visual da estabilidade das emulsões obtidas em diferentes condições de homogeneização após 10 dias de produção.

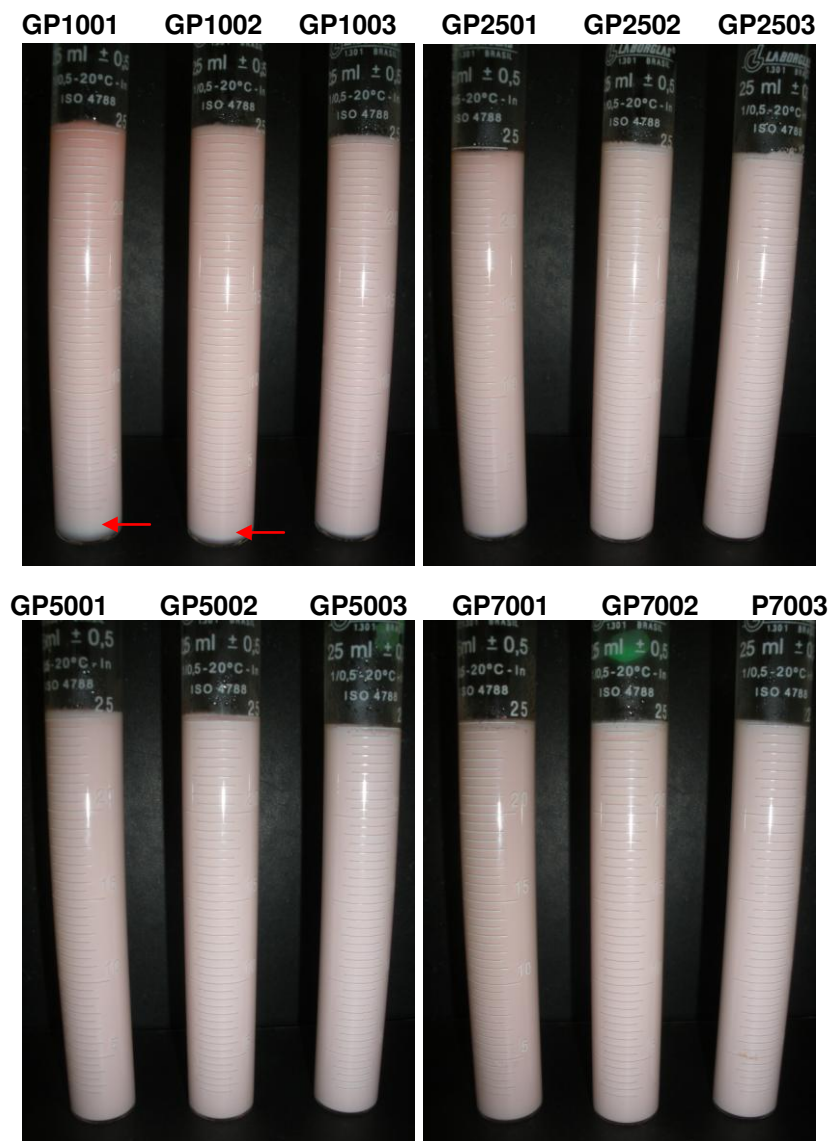


Figura 4.25. Avaliação visual das emulsões após 10 dias da produção das mesmas. **GP1001, 1002 e 1003:** emulsões obtidas a 100 bar de pressão; **GP2501, 2502 e 2503:** emulsões obtidas a 250 bar de pressão; **GP5001, 5002 e 5003:** emulsões obtidas a 500 bar de pressão; **GP7001, 7002 e 7003:** emulsões obtidas a 700 bar de pressão.

A Tabela 4.21 mostra os resultados de diâmetro de gota no tempo inicial (T0) e após 10 dias (T10) de produção das emulsões.

Tabela 4.21. Diâmetro de gota para as emulsões obtidas em diferentes condições de homogeneização.

<i>Amostra</i>	<i>Pressão (bar)</i>	<i>Nº. de passes</i>	<i>Diâmetro (µm)</i>	
			<i>T0</i>	<i>T10</i>
GP1001	100	1	4,40 ± 0,92 ^d	5,12 ± 0,85 ^c
GP1002	100	2	3,08 ± 0,36 ^{a,c}	4,47 ± 0,94 ^{b,c}
GP1003	100	3	2,71 ± 0,19 ^{a,b}	3,37 ± 0,88 ^{a,b,c}
GP2501	250	1	3,28 ± 0,84 ^{a,d}	3,29 ± 0,26 ^{a,b,c}
GP2502	250	2	2,43 ± 0,66 ^{a,b}	2,11 ± 0,34 ^a
GP2503	250	3	1,91 ± 0,15 ^{b,c}	1,98 ± 0,32 ^a
GP5001	500	1	2,64 ± 0,24 ^{a,b}	2,78 ± 0,47 ^{a,b}
GP5002	500	2	2,72 ± 1,03 ^{a,b}	1,89 ± 0,20 ^a
GP5003	500	3	1,78 ± 0,24 ^b	1,77 ± 0,338 ^a
GP7001	700	1	2,46 ± 0,62 ^{a,b}	2,91 ± 0,44 ^{a,b}
GP7002	700	2	1,90 ± 0,09 ^{b,c}	1,80 ± 0,33 ^a
GP7003	700	3	3,32 ± 1,21 ^{a,d}	2,43 ± 2,72 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os resultados mostram uma tendência de redução do tamanho de gota com o aumento da pressão de homogeneização até 500 bar e aumento do número de passagens. Não foram notadas diferenças significativas quando se aumentou a pressão de homogeneização de 500 para 700 bar. A mesma tendência foi observada após 10 dias de produção das emulsões.

Na Figura 4.26 pode-se observar a diminuição do tamanho de gota das emulsões de acordo com a pressão de homogeneização e o número de passagens.

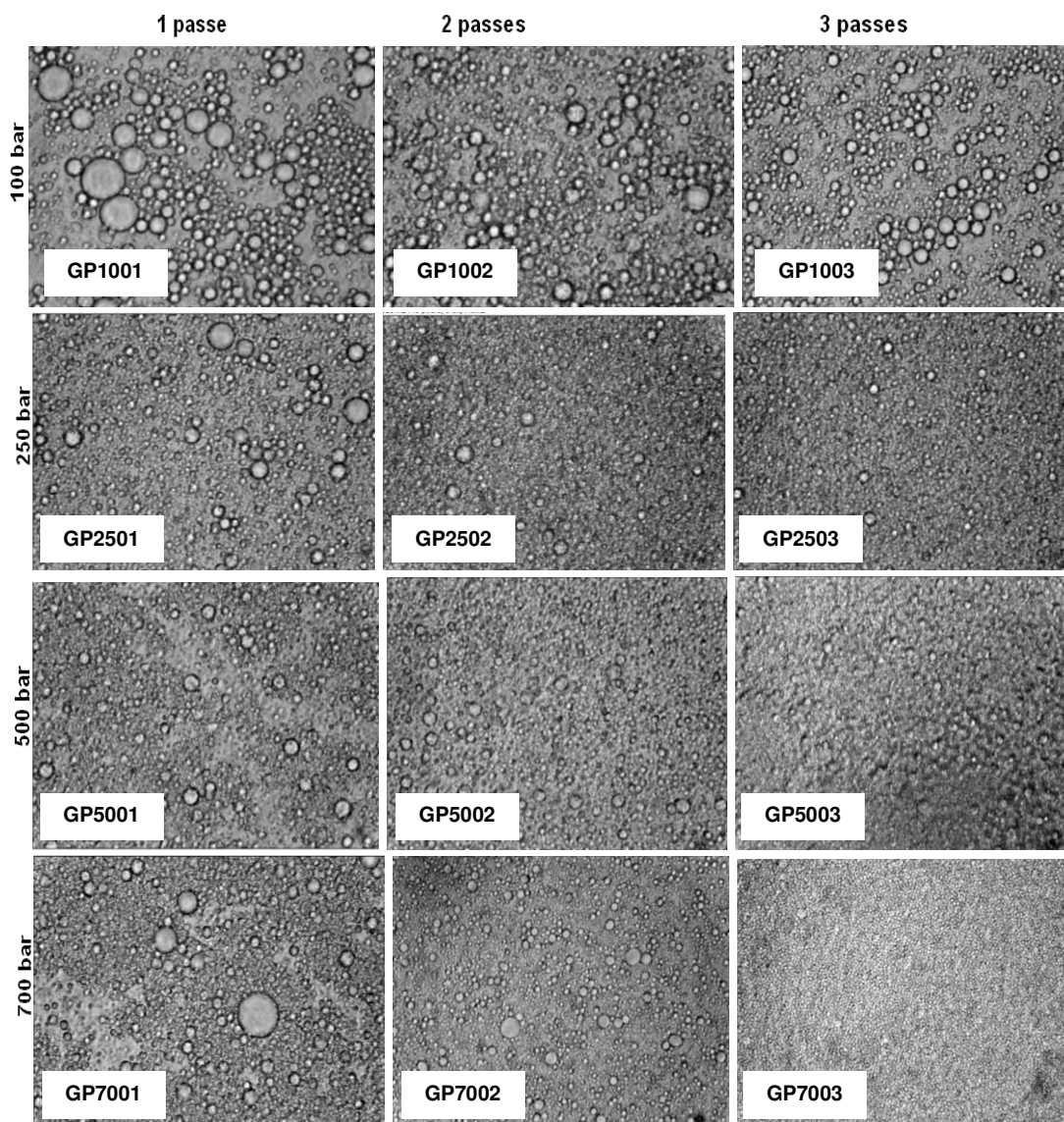


Figura 4.26. Microscopia das emulsões após 10 dias da produção das mesmas.

Com base nos resultados apresentados, definiu-se como a melhor condição de homogeneização a pressão de 500 bar e três passagens, pois correspondeu a obtenção de menor tamanho de gota, sem separação de fases durante o tempo de observação.

4.4.2. Avaliação das gelatinas aciladas nas emulsões

Utilizando-se as condições de homogeneização pré-definidas no item 4.4.1., foram produzidas as emulsões utilizando a gelatina padrão, as gelatinas aciladas e seus respectivos “controles”. A Tabela 4.22 mostra os resultados obtidos para o diâmetro médio da gota no tempo zero (T0) e após 30 dias (T30) da produção das emulsões.

Tabela 4.22. Diâmetro de gota para as emulsões obtidas a partir das gelatinas aciladas.

<i>Amostra</i>	<i>pH da reação</i>	<i>Reagente (%)</i>	Diâmetro (µm)	
			T0	T30
GP	5,70	0,00	$1,78 \pm 0,24^b$	$1,77 \pm 0,33^{e,f}$
MD12	8,00	0,00	$0,80 \pm 0,13^{d,e}$	$1,27 \pm 0,16^{a,c,d,f}$
MD05	8,00	9,00	$1,82 \pm 0,12^b$	$1,87 \pm 0,25^e$
MD13	8,40	0,00	$0,74 \pm 0,06^d$	$0,86 \pm 0,01^d$
MD01	8,40	6,90	$1,81 \pm 0,13^b$	$1,58 \pm 0,15^{a,c,e}$
MD03	8,40	11,10	$1,28 \pm 0,07^{a,c}$	$1,33 \pm 0,18^{a,c,d,e}$
MD14	9,50	0,00	$1,09 \pm 0,06^a$	$1,11 \pm 0,12^{a,d}$
MD07	9,50	6,00	$1,44 \pm 0,13^c$	$1,72 \pm 0,12^{c,e}$
MD09	9,50	9,00	$1,27 \pm 0,09^{a,c}$	$1,17 \pm 0,05^{a,c,d}$
MD10	9,50	9,00	$1,17 \pm 0,06^{a,c}$	$1,23 \pm 0,04^{a,c,d}$
MD11	9,50	9,00	$1,31 \pm 0,06^{a,c}$	$1,76 \pm 0,18^{c,e}$
MD08	9,50	12,00	$1,28 \pm 0,16^{a,c}$	$1,51 \pm 0,26^{a,c,e}$
MD15	10,60	0,00	$1,02 \pm 0,08^{a,e}$	$1,24 \pm 0,05^{a,c,d}$
MD02	10,60	6,90	$1,75 \pm 0,13^b$	$3,08 \pm 0,36^b$
MD04	10,60	11,10	$1,61 \pm 0,20^{b,c}$	$1,46 \pm 0,09^{a,c,d,e}$
MD16	11,00	0,00	$1,23 \pm 0,08^{a,c}$	$1,04 \pm 0,06^{a,d}$
MD06*	11,00	9,00	$8,45 \pm 2,44$	$7,83 \pm 1,73$

*Amostra MD06 não foi considerada nas análises estatísticas por apresentar separação de fases logo após ser produzida e conseqüentemente diâmetro de gota muito maior que as outras amostras. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Para tornar mais fácil a visualização, as Figuras 4.27 a 4.31 foram feitas agrupando as gelatinas aciladas obtidas no mesmo pH de reação, juntamente com a gelatina padrão (GP) e as respectivas gelatinas “controle” nos tempos zero (T0) e após 30 dias (T30) de produção das emulsões.

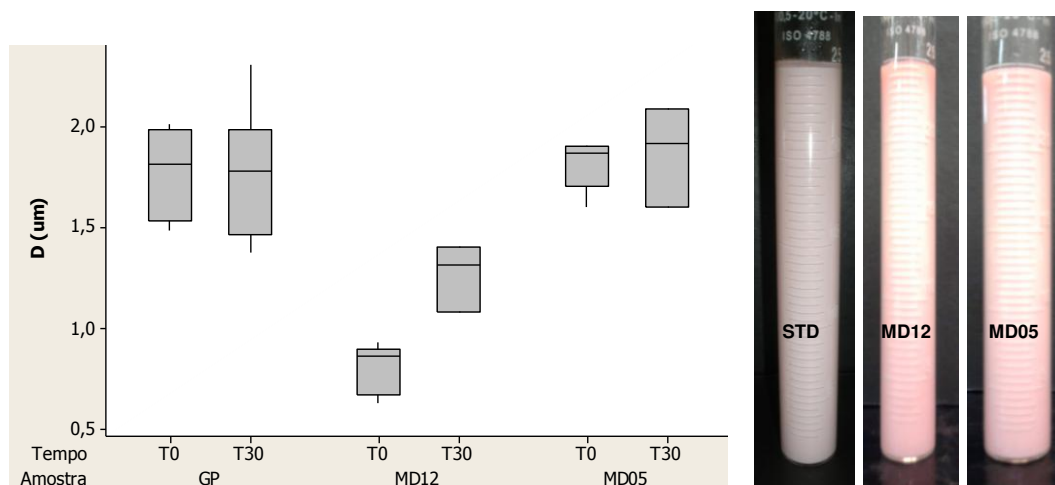


Figura 4.27. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 8,0. **GP:** gelatina padrão; **MD12:** gelatina “controle” em pH8; **MD05:** gelatina acilada em pH8.

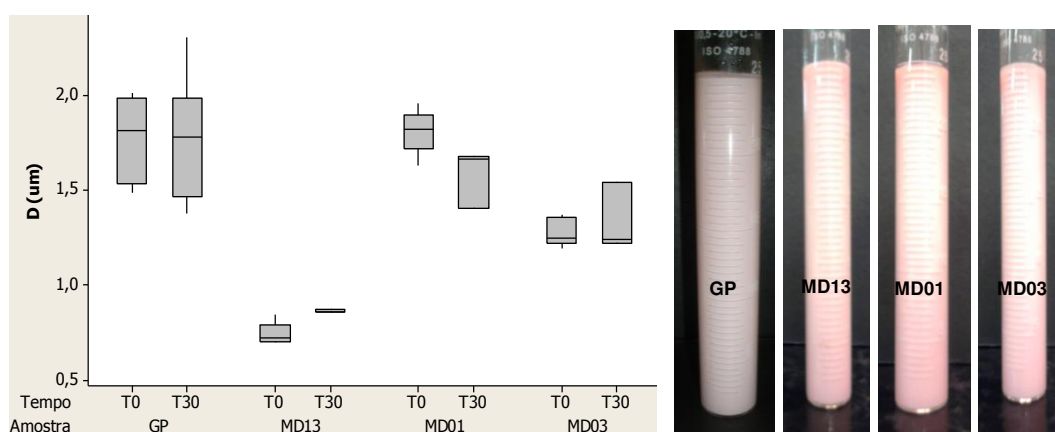


Figura 4.28. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 8,4. **GP:** gelatina padrão; **MD13:** gelatina “controle” em pH8,4; **MD01 e MD03:** gelatinas aciladas em pH8,4.

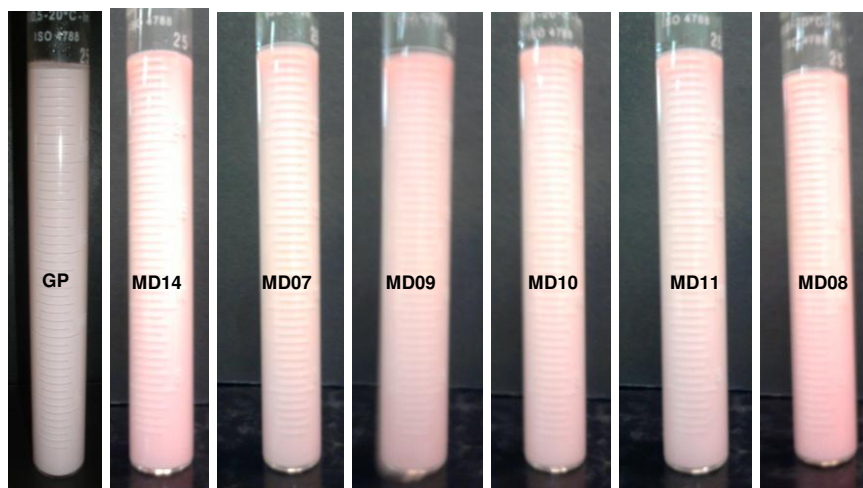
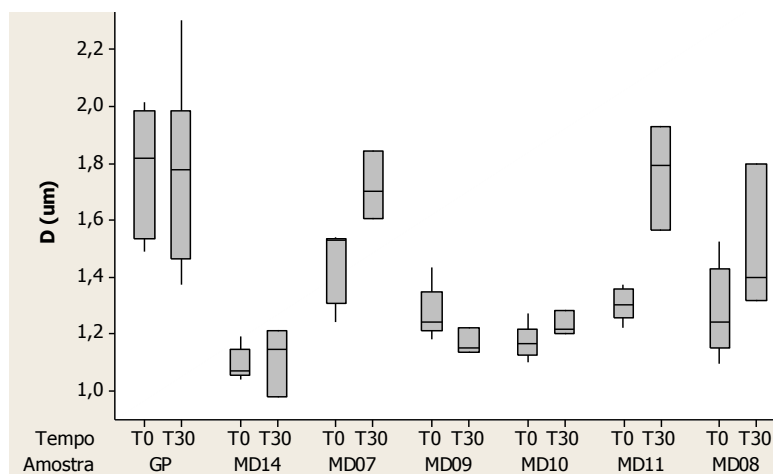


Figura 4.29. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 9,5. **GP:** gelatina padrão; **MD14:** gelatina “controle” em pH9,5; **MD07, MD08, MD09, MD10 e MD11:** gelatinas aciladas em pH9,5.

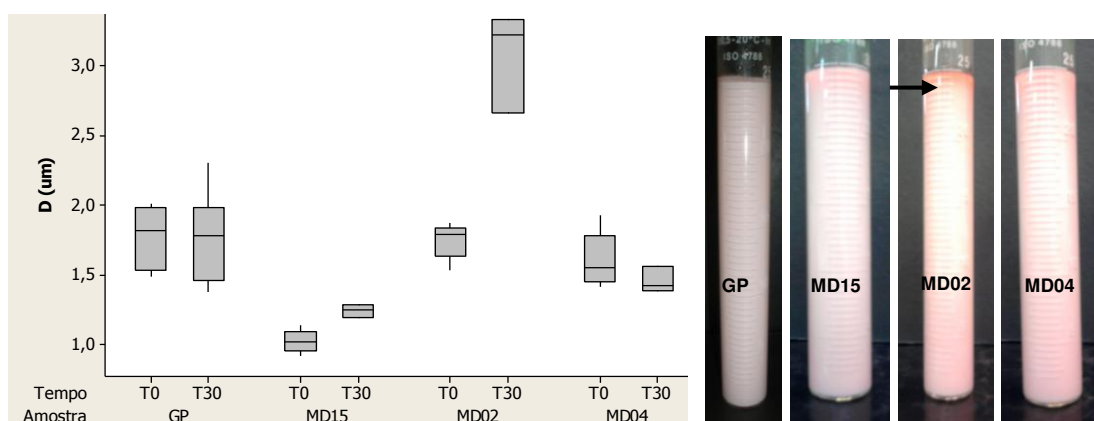


Figura 4.30. Diâmetro de gotas e separação visual das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 10,6. **GP:** gelatina padrão; **MD15:** gelatina “controle” em pH10,6; **MD02 e MD04:** gelatinas aciladas em pH10,6.

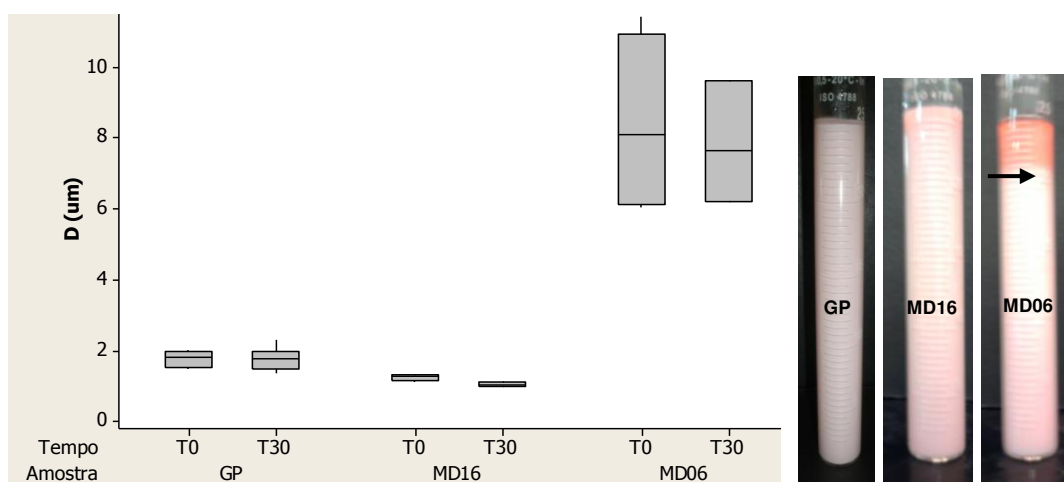


Figura 4.31. Resultados das emulsões utilizando as gelatinas aciladas em pH 11,0. **GP:** gelatina padrão; **MD16:** gelatina “controle” em pH11; **MD06:** gelatina acilada em pH11.

Para todos os pHs foi possível notar que os melhores resultados de diâmetro de gota, ou seja, os menores valores, foram obtidos para as gelatinas “controle”. Pode-se notar que as amostras MD02 e MD06 apresentaram

separação de fases imediatamente após a produção das emulsões, sendo a MD06 a que apresentou maior volume de separação e também diâmetro de gota. Para as outras gelatinas avaliadas, não foi notada separação visual de fases.

Esse resultado contradiz ao que era esperado, ou seja, uma melhoria da estabilização das emulsões para as gelatinas aciladas em relação à gelatina padrão e as gelatinas “controle”. No caso das gelatinas aciladas em pHs mais baixos (8, 8,4 e 9,5), os resultados anteriores já haviam mostrado pouca efetividade da reação de acilação devido principalmente à pouca reatividade dos grupos disponíveis, cujos valores de pKa são bastante altos (DAMODARAN, 1996). Dessa forma, as condições de reação e a adição do reagente apenas tiveram como efeito a queda na força de gel das gelatinas, e conseqüentemente, uma diminuição do poder estabilizante das mesmas.

No caso das gelatinas aciladas em maiores pHs de reação (10,6 e 11), principalmente em relação à gelatina MD06, que apresentou os maiores indicativos de efetividade para a reação de acilação e melhor resultado de atividade emulsificante, era esperada uma melhor estabilização das emulsões, no entanto, isso não foi observado. Estes resultados mostram que, apesar de terem sido notadas diferenças significativas na maioria dos parâmetros avaliados para estas gelatinas reagidas em alto pH, o grau de acilação atingido não foi suficiente para superar a drástica perda na força de gel destas gelatinas, ou seja, o mecanismo de estabilização da emulsão através do aumento da viscosidade da fase contínua foi predominante para as emulsões preparadas nas condições utilizadas neste projeto. Possivelmente, a quantidade de reagente utilizado não foi

suficiente ou a condição de reação não foi adequada para obtenção de um maior grau de acilação.

Por outro lado, as condições de preparo das emulsões, em especial o baixo pH da emulsão (3,5), pode não ser a condição ideal para utilização da gelatina acilada obtida. Nota-se que, nos ensaios preliminares, foi possível obter uma boa estabilização das emulsões produzidas com gelatinas aciladas de forma semelhante, no entanto, o pH da emulsão foi mantido em torno de 5,5, ou seja, próxima ao ponto isoelétrico das gelatina obtidas (MAXEY; PALMER, 1976).

Outra possível explicação para o pior desempenho das gelatinas aciladas é o da formação de uma cadeia maior devido à ligação do grupo acila e conseqüente diminuição da velocidade de difusão das moléculas para a interface, o que pode promover um aumento no tamanho das gotas e separação de fases da emulsão (MCCLEMENTS, 2005).

CAPÍTULO 5. Conclusões

Os resultados mostraram que a reação de acilação apenas tornou-se efetiva quando realizada em pH extremamente alcalino (pH 11,0), uma vez que, os aminoácidos que possuem grupo terminal amino e por isso estão disponíveis para a reação (arginina, lisina e hidroxilisina), apresentam altos valores de pKa, indicando que possuem maior reatividade em meio com alto pH. No entanto, a força de gel e a viscosidade diminuíram quando a reação ocorreu em altos pHs.

A condição mais adequada para obtenção das emulsões estabilizadas com gelatina e com tamanho de gota reduzido foi utilizando 500 bar de pressão e passando as amostras três vezes através do homogeneizador. As gelatinas aciladas com maior força de gel e viscosidade mostraram maior efeito na estabilização das emulsões ácidas do que o grau de acilação. Como consequência, as gelatinas cuja reação ocorreu em pH mais baixo e com menor quantidade de reagente, ou seja, as que apresentaram menor grau de acilação, apresentaram melhor atuação na estabilização das emulsões. Isso mostra que, apesar de terem sido notadas diferenças significativas na maioria dos parâmetros avaliados para as gelatinas aciladas em alto pH, o grau de acilação atingido não foi suficiente para superar a drástica perda na força de gel destas gelatinas, o que pode ter ocorrido devido a quantidade insuficiente de reagente utilizado ou ao uso de uma condição de reação inadequada para obtenção de grau de maior acilação.

Outro fator a ser considerado, é a condição de preparo das emulsões, em especial o baixo pH da emulsão produzida (abaixo do pI da gelatina), que pode não ser a condição ideal para utilização da gelatina acilada obtida.

Ainda, outra possível explicação para o pior desempenho das gelatinas aciladas é o da formação de uma cadeia maior devido à ligação do grupo acila e conseqüente diminuição da velocidade de difusão das moléculas para a interface, o que pode promover um aumento no tamanho das gotas e separação de fases da emulsão.

Estes resultados mostram que apesar de ter sido possível atingir maior grau de acilação para as gelatinas que reagiram em altos pHs, estas gelatinas não apresentaram a melhoria esperada como estabilizantes de emulsões. De acordo com a literatura, o processo de acilação melhoraria a ação da gelatina como agente emulsificante devido ao aumento da repulsão eletrostática. No entanto, os resultados mostraram que o mecanismo de estabilização das emulsões através do aumento da viscosidade da fase contínua pareceu ser mais efetivo.

CAPÍTULO 6. Referências Bibliográficas

- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1256-1262, 1979.
- AOAC. Dairy Products. In: **Official Method of Analysis of AOAC International**, 16th edition, v.2, 1996.
- BELITZ, H.-d., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4th edition. Berlin: Springer, 2009.
- DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3rd edition. New York: Marcel Dekker Inc, Cap. 6, p. 321-429, 1996.
- DICKINSON, E. **An introduction to food hydrocolloids**. Oxford, Uk: University Press, 1992.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Leeds, Uk, p. 25-39, 2003.
- DJAGNY, K.B., WANG, Z., XU, S. Chemical modification of pigskin gelatin: factors affecting the esterification of gelatin with fatty acid. **Journal of Food Science**, China, v. 66, nº09, p. 1326-1330, 2001a.
- DJAGNY, K.B., WANG, Z., XU, S. Conformational changes and some functional characteristics of gelatin esterified with fatty acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, China, v. 49, p. 2987-2991, 2001b.
- DJAGNY, K.B., WANG, Z., XU, S. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, China, v. 46, nº06, p. 481-492, 2001c.

- GARTI, N., LESER, M.E. Emulsification properties of hydrocolloids. **Polymers for Advanced Technologies**, v.12, p.123-135, 2001.
- GELITA DO BRASIL LTDA, Indústria química situada em Cotia - Brasil, R. Phillip Leiner, 200. Site: www.gelita.com.
- GME. Gelatine Monograph. In: **Standardized methods for the testing of edible gelatine**, v.5, 2007.
- KHER, A. et al. FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. **Elsevier: Vibrational Spectroscopy**, Werrabee, p. 375-381, 2007.
- KINSELLA, J.E., WHITEHEAD, D.M. Emulsifying and foaming properties of chemically modified proteins. In: DICKINSON, E.; STAINSBY, G. **Advances in food emulsions and foams**. London: Elsevier Applied Science, Cap. 5, p. 163-188, 1988.
- LIN, L.-h., CHEN, K.-m. Preparation and surface activity of gelatin derivative surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Taiwan, p. 8-13, 2006a.
- LIN, L.-h., CHEN, K.-m. Preparation and surface activity of modified soy protein. **Journal of Applied Polymer Science**, Taiwan, p. 3498-3503, 2006b.
- MAGDASSI, S. **Surface Activity of Proteins: Chemical and physicochemical modifications**. Jerusalém, Israel: Marcel Dekker, 1996.
- MALABAT, C. et al. Emulsifying and foaming properties of native and chemically modified peptides from the 2S and 12S proteins of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, France, v. 78, nº03, p. 235-242, 2001.

- MAXEY, C. R., PALMER, M. R. **The isoelectric point distribution of gelatin.** In: RJ Cox, Editor, Proceedings of the 3rd Symposium 1974, Photographic Gelatin 2, Academic Press, London, p. 27–36, 1976.
- MCCLEMENTS, D.J. **Food emulsions: principles, practice and techniques.** Washington: CRC Press, 2005.
- MOZAFARI, M. et al. Biomimetic formation of apatite on the surface of porous gelatin/bioactive. **Applied Surface Science**, Tehran, v. 257, p. 1740-1749, 2010.
- PEARCE, K. N., KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, v.26, nº03, p. 716-723, 1978.
- SÁNCHEZ-VIOQUE, R. et al. Foaming properties of acylated rapeseed (Brassica napus L.) hydrolysates. **Journal of Colloid and Interface Science**, France, v. 244, p. 386-393, 2001.
- SÁNCHEZ-VIOQUE, R. et al. Emulsifying properties of acylated rapessed (Brassica napus L.) peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, France, v. 271, p. 220-226, 2004.
- SCHRIEBER, R., GAREIS, H. **Gelatine Handbook:** Theory and Industrial Practice. Weinheim: Wiley-vch, 334 p, 2007.
- SIKORSKI, Z. E. Proteins. In: SIKORSKI, Z. E. **Chemical and Functional Properties of food components.** 2. ed. Poland: CRC Press, Cap. 7, p. 133-177, 2002.

TOLEDANO, O., MAGDASSI, S. Formation of surface active gelatin by covalent attachment of hydrophobic chains. **Journal of Colloid and Interface Science**, Jerusalem, v. 193, p. 172-177, 1997.

TOLEDANO, O., MAGDASSI, S. Emulsification and foaming properties of hydrophobically modified gelatin. **Journal of Colloid and Interface Science**, Jerusalem, v. 200, p. 235-240, 1998.

TUROWSKI et al., Eberbach. **High molecular weight protein/fatty acid condensation products which are very well tolerated by the skin and mucosa**. Int Cl⁵, Germany, patent number 5071960. 07 sep, 1989, 10 dec, 1991. US Patent, disponível em <http://www.freepatentsonline.com/5071960.html>

WARD, A.g.; COURTS, A. **The science and technology of gelatin**. London: Academic Press, 1977.

Anexo 1. Coeficientes de regressão do planejamento experimental

Tabela A. Coeficientes de regressão para o Grau de Acilação (GA).

<i>Termo</i>	<i>Coeficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t (5)</i>	<i>p-valor</i>
Constante	0,621	1,516	0,409	0,699
pH reação	4,606	0,928	4,962	0,004
Reagente (%)	1,513	0,928	1,630	0,164
pH reação * pH reação	5,958	1,105	5,392	0,003
Reagente (%) * Reagente (%)	-0,132	1,105	-0,120	0,909
pH reação * Reagente (%)	-0,996	1,313	-0,759	0,482

Tabela B. Coeficientes de regressão para a Atividade Emulsificante (AE).

<i>Termo</i>	<i>Coeficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t (5)</i>	<i>p-valor</i>
Constante	1,447	0,047	30,751	0,000
pH reação	0,064	0,029	2,234	0,076
Reagente (%)	0,046	0,029	1,589	0,173
pH reação * pH reação	0,065	0,034	1,906	0,115
Reagente (%) * Reagente (%)	0,005	0,034	0,143	0,892
pH reação * Reagente (%)	0,009	0,041	0,219	0,835

Tabela C. Coeficientes de regressão para o Bloom.

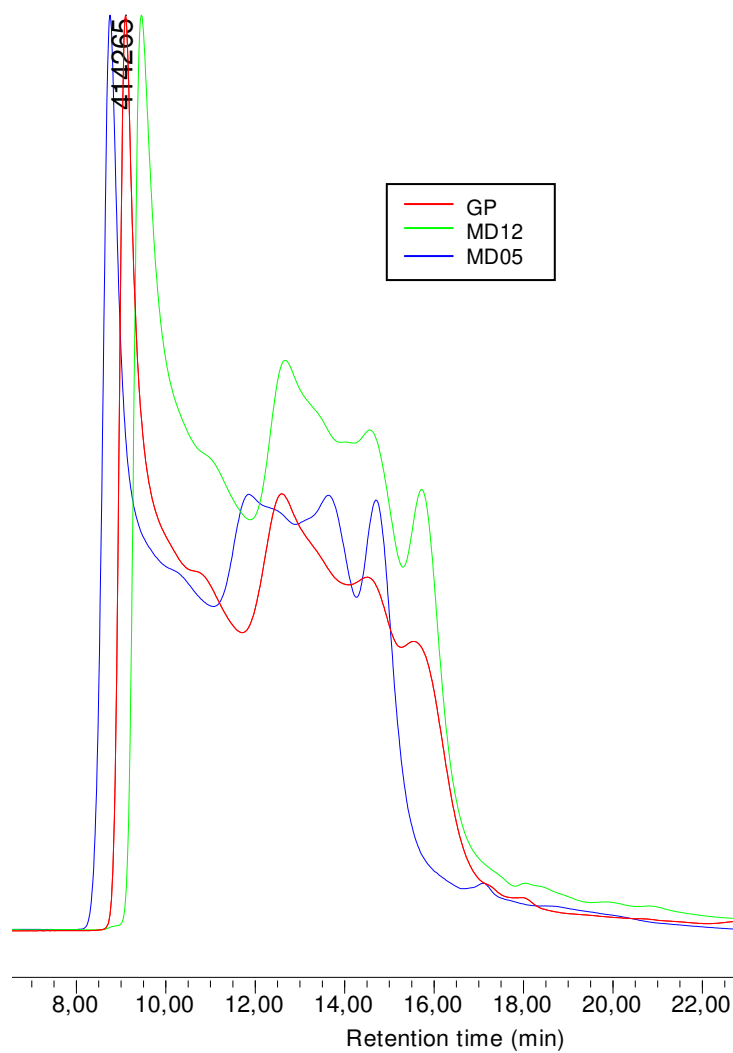
<i>Termo</i>	<i>Coeficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t (5)</i>	<i>p-valor</i>
Constante	211,467	7,382	28,646	0,000
pH reação	-32,877	4,521	-7,273	0,001
Reagente (%)	-1,353	4,521	-0,299	0,777
pH reação * pH reação	-16,674	5,380	-3,099	0,027
Reagente (%) * Reagente (%)	-4,736	5,380	-0,880	0,419
pH reação * Reagente (%)	-5,075	6,393	-0,794	0,463

Tabela D. Coeficientes de regressão para a Viscosidade.

<i>Termo</i>	<i>Coeficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t (5)</i>	<i>p-valor</i>
Constante	30,150	0,846	35,637	0,000
pH reação	-1,284	0,518	-2,477	0,056
Reagente (%)	-2,743	0,518	-5,294	0,003
pH reação * pH reação	-0,847	0,617	-1,373	0,228
Reagente (%) * Reagente (%)	0,366	0,617	0,593	0,579
pH reação * Reagente (%)	-0,775	0,733	-1,058	0,339

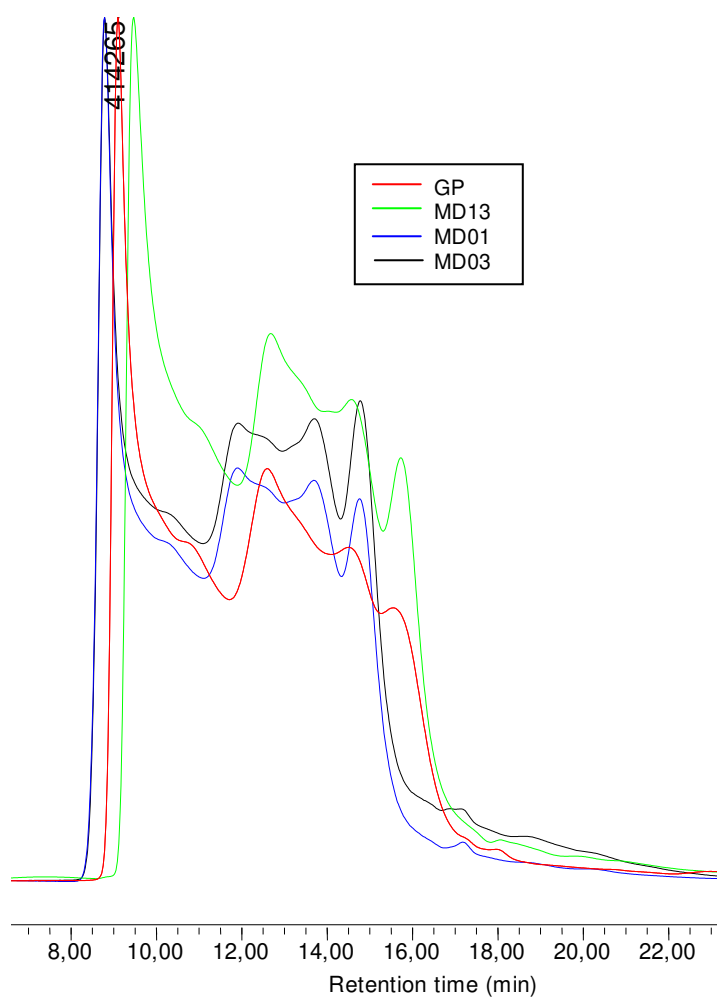
Anexo 2. Gráficos da distribuição de massa molecular das gelatinas

Gráfico A. Perfil de distribuição de massa molecular das gelatinas modificadas em pH 8,0.



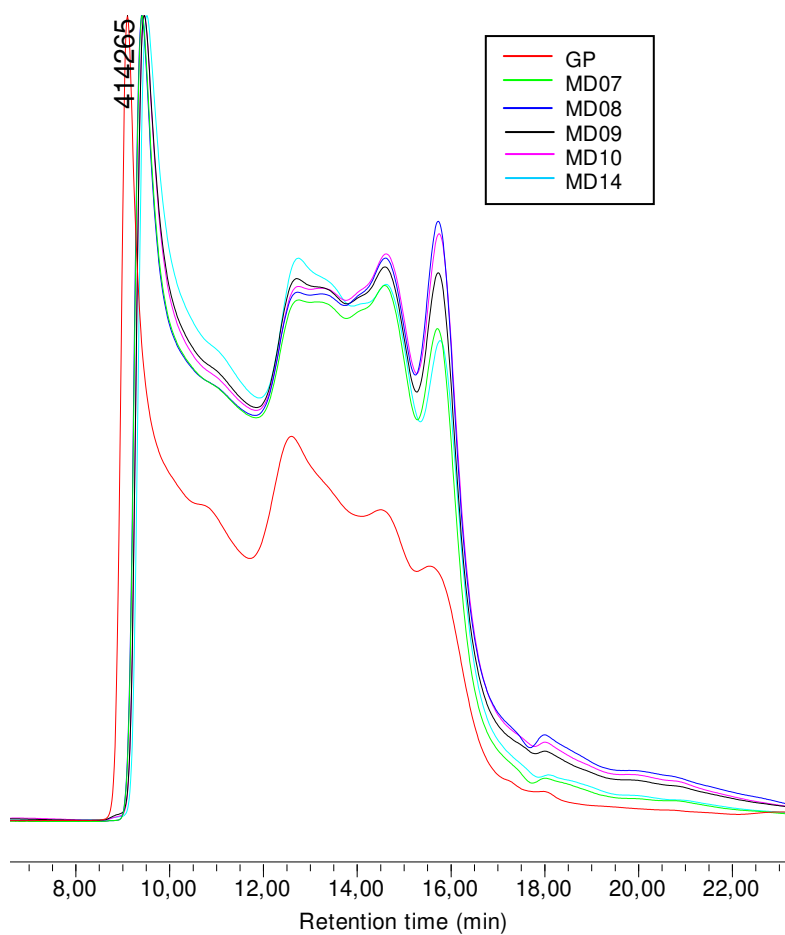
Amostra	Mw (kDa)	Polidispersividade
MD05	122,26	12,07
MD12	112,78	8,67
GP	123,19	38,07

Gráfico B. Perfil de distribuição de massa molecular das gelatinas modificadas em pH 8,4.



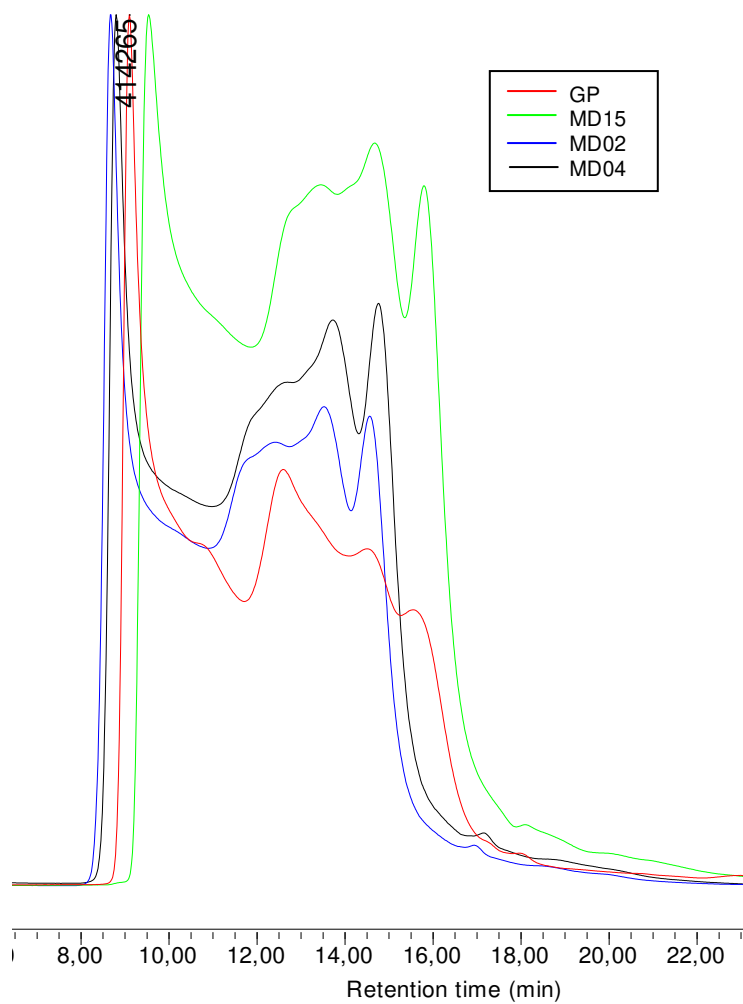
Amostra	Mw (kDa)	Polidispersividade
MD01	121,09	12,07
MD03	108,94	17,88
MD13	112,08	8,83
GP	123,19	38,07

Gráfico C. Perfil de distribuição de massa molecular das gelatinas modificadas em pH 9,5.



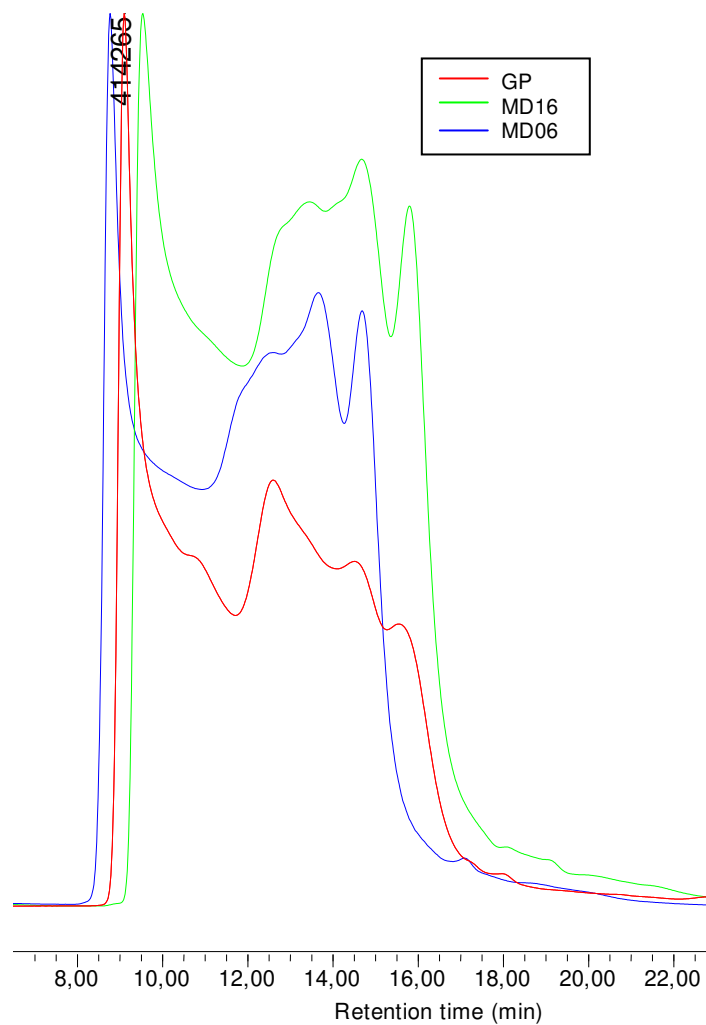
Amostra	Mw (kDa)	Polidispersividade
MD07	105,35	7,83
MD08	97,53	11,94
MD09	101,11	11,80
MD10	98,30	12,83
MD14	103,53	8,44
GP	123,19	38,07

Gráfico D. Perfil de distribuição de massa molecular das gelatinas modificadas em pH 10,6.



Amostra	Mw (kDa)	Polidispersividade
MD02	123,68	8,88
MD04	105,08	10,47
MD15	94,10	7,99
GP	123,19	38,07

Gráfico E. Perfil de distribuição de massa molecular das gelatinas modificadas em pH 11,0.



Amostra	Mw (kDa)	Polidispersividade
MD06	107,31	9,20
MD16	94,58	8,68
GP	123,19	38,07