



**UNICAMP**

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

**ALINE ÁLVARES DA SILVA COSTA**

---

---

**Emulsões estabilizadas com caseinato de sódio: efeito  
do pH e a reticulação com lacase**

---

---

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

**Profa. Dr<sup>a</sup>. Rosiane Lopes da Cunha/Dr<sup>a</sup>. Ana Carla Kawazoe Sato**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Aline Álvares da Silva Costa, aprovada pela comissão julgadora em 05/09/2011 e orientada pela Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha.

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C823e Costa, Aline Álvares da Silva, 1985-  
Emulsões estabilizadas com caseinato de sódio: efeito do pH e a reticulação com lacase / Aline Álvares da Silva Costa. – Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha.  
Co-orientador: Ana Carla Kawazoe Sato.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Emulsões. 2. Caseinato de sódio. 3. Lacase.  
4. Reticulação. 5. Estabilidade. I. Cunha, Rosiane Lopes da. II. Sato, Ana Carla Kawazoe. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em inglês: Emulsions stabilized by sodium caseinate: effect of pH and cross-linking with laccase

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Emulsions

Sodium caseinate

Laccase

Cross-linking

Stability

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Rosiane Lopes da Cunha [Orientador]

Renata Valeriano Tonon

Fernanda Yumi Ushikubo

Data da defesa: 05/09/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosiane Lopes da Cunha  
(Orientadora – DEA / FEA / UNICAMP)

---

Dr<sup>a</sup>. Renata Valeriano Tonon  
(Membro Titular – EMBRAPA / Agroindústria de Alimentos)

---

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Yumi Ushikubo  
(Membro Titular – DEA / FEA / UNICAMP)

---

Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri  
(Membro Suplente – EA / UFG)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Dupas Hubinger  
(Membro Suplente – DEA / FEA / UNICAMP)



*“Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final. Se insistirmos em permanecer nela mais do que o tempo necessário, perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver.*

*Encerrando ciclos, fechando portas, terminando capítulos. Não importa o nome que damos, o que importa é deixar no passado os momentos da vida que já se acabaram. Foi despedida do trabalho? Terminou uma relação? Deixou a casa dos pais? Partiu para viver em outro país? A amizade tão longamente cultivada desapareceu sem explicações? Você pode passar muito tempo se perguntando por que isso aconteceu. Pode dizer para si mesmo que não dará mais um passo enquanto não entender as razões que levaram certas coisas, que eram tão importantes e sólidas em sua vida, serem subitamente transformadas em pó. Mas tal atitude será um desgaste imenso para todos: seus pais, seus amigos, seus filhos, seus irmãos, todos estarão encerrando capítulos, virando a folha, seguindo adiante, e todos sofrerão ao ver que você está parado. Ninguém pode estar ao mesmo tempo no presente e no passado, nem mesmo quando tentamos entender as coisas que acontecem conosco.*

*O que passou não voltará: não podemos ser eternamente meninos, adolescentes tardios, filhos que se sentem culpados ou rancorosos com os pais, amantes que revivem noite e dia uma ligação com quem já foi embora e não tem a menor intenção de voltar.*

*As coisas passam, e o melhor que fazemos é deixar que elas realmente possam ir embora. Por isso é tão importante (por mais doloroso que seja!) destruir recordações, mudar de casa, dar muitas coisas para orfanatos, vender ou doar os livros que tem.*

*Tudo neste mundo visível é uma manifestação do mundo invisível, do que está acontecendo em nosso coração. e o desfazer-se de certas lembranças significa também abrir espaço para que outras tomem o seu lugar. Deixar ir embora. Soltar. Desprender-se. Ninguém está jogando nesta vida com cartas marcadas, portanto às vezes ganhamos, e às vezes perdemos. Não espere que devolvam algo, não espere que reconheçam seu esforço, que descubram seu gênio, que entendam seu amor. Pare de ligar sua televisão emocional e assistir sempre ao mesmo programa, que mostra como você sofreu com determinada perda: isso o estará apenas envenenando, e nada mais.*

*Não há nada mais perigoso que rompimentos amorosos que não são aceitos, promessas de emprego que não têm data marcada para começar, decisões que sempre são adiadas em nome do "momento ideal". Antes de começar um capítulo novo, é preciso terminar o antigo: diga a si mesmo que o que passou, jamais voltará! Lembre-se de que houve uma época em que podia viver sem aquilo, sem aquela pessoa - nada é insubstituível, um hábito não é uma necessidade. Pode parecer óbvio, pode mesmo ser difícil, mas é muito importante.*

*Encerrando ciclos. Não por causa do orgulho, por incapacidade, ou por soberba, mas porque simplesmente aquilo já não se encaixa mais na sua vida. Feche a porta, mude o disco, limpe a casa, sacuda a poeira. Deixe de ser quem era e se transforme em quem é."*

*(Fernando Pessoa)*

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende."*

*(Leonardo da Vinci)*

*Aos meus pais, por sempre me guiarem e acreditarem em mim.*

*A quem devo tudo o que sou.*



## AGRADECIMENTOS

*À Deus, por sempre iluminar meus pensamentos, pelas minhas realizações e conquistas e por sempre colocar pessoas tão especiais no meu caminho.*

*Aos meus pais, pelo apoio e torcida com as minhas conquistas e por se preocuparem com as minhas angustias e aflições. Por sonharem meus sonhos, pelo amor e por sempre estarem ao meu lado. Aos meus irmãos, Alice e Laurinho pelo carinho e alegria.*

*À Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha, pela orientação, paciência e incentivo constante. Pela confiança no meu trabalho, mesmo quando algumas vezes eu não acreditava.*

*À Aninha, não só por ser minha co-orientadora, mas por sempre escutar meus desesperos e angustias, me ajudando no laboratório, nas dúvidas e sugestões do meu trabalho. Muito obrigada pela paciência e incentivo sempre!*

*A UNICAMP, funcionários e professores, pela oportunidade de realização deste trabalho.*

*A CAPES, pelo apoio financeiro.*

*À banca examinadora, pelas correções e sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.*

*Aos colegas do LEP, Rejane, Luiz, Fabi, Kátia, Lizi, Fezinha, Marisa, Carol, Joicinha e Raphaela pela ajuda, nas dúvidas e sugestões. E o mais importante, pelo agradável e divertidíssimo ambiente de trabalho!!!*

*Às minhas amigas coração de abóbora, Tina, Mari Piraí, Mari Viçosa pelo companheirismo e ajuda em todas as horas que precisei. Ju, Carol e Julia, que mesmo distantes, sempre se preocuparam e me apoiaram. Obrigada pelos conselhos e empurrões!*

*Às minhas amigas de república, Cela, Bruna e Jana pelas conversas e desabafos, pela companhia nos lanches, nos filmes, nas baladas, nas cervejas na varanda, nas tristezas de domingo, nos estudos e viradões. Muito obrigada por estarem presentes em minha vida e por serem minha família em Campinas.*

*Aos amigos Meiri, Luana, Larissa e João, por dividirem comigo momentos tão divertidos e alegres.*

*Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.*



## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS .....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xvii
RESUMO GERAL .....	xxi
ABSTRACT .....	xxiii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
1.1. Introdução .....	3
1.2. Objetivos.....	4
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Emulsões.....	7
2.2. Caseínas e caseinato de sódio.....	9
2.3. Tratamento enzimático e reticulação.....	12
2.4. Lacase .....	13
2.4.1. Ácido ferúlico.....	15
2.5. Emulsões estabilizadas com caseinato de sódio .....	16
CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. Material.....	19
3.2. Preparo das soluções-estoque .....	19
3.2.1. Caseinato de sódio.....	19
3.2.2. Soluções de lacase e ácido ferúlico .....	19
3.3. Géis de caseinato de sódio.....	20
3.3.1. Preparo dos géis.....	20
3.3.2. Análises .....	21
3.3.2.1. Compressão uniaxial .....	21
3.3.2.2. Capacidade de retenção de água (CRA).....	21
3.4. Preparo das emulsões óleo-água (O/A) .....	21
3.4.1. Tratamento enzimático .....	21
3.4.2. Produção das emulsões.....	22
3.5. Análises das emulsões .....	24

3.5.1. Estabilidade das emulsões à separação de fases.....	24
3.5.2. Composição química das fases.....	24
3.5.3. Microscopia óptica e distribuição de tamanho de gotas.....	24
3.5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
3.6. Análise Estatística.....	27
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>29</b>
Parte 1. Macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio.....	29
4.1. Macroemulsões.....	31
4.1.1. Estabilidade à separação de fases.....	31
4.1.2. Composição química das fases.....	33
4.1.3. Reologia.....	35
Parte 2. Emulsões estabilizadas por caseinato de sódio utilizando altas pressões de homogeneização.....	39
4.2. Emulsões.....	41
4.2.1. Estabilidade à separação de fases.....	41
4.2.2. Composição química das fases.....	43
4.2.3. Distribuição de tamanho de gotas e microscopia.....	43
4.2.4. Reologia.....	47
Parte 3. Emulsões estabilizadas por caseinato de sódio: efeito do ácido ferúlico e da lacase na estabilidade.....	55
4.3. Determinação da concentração de ácido ferúlico e lacase para aplicação nas emulsões ...	57
4.3.1. Propriedades mecânicas.....	57
4.3.1.1. Efeito da concentração de lacase.....	58
4.3.1.2. Efeito da concentração de ácido ferúlico.....	62
4.3.2. Capacidade de retenção de água.....	65
4.4. Emulsões homogeneizadas e tratadas enzimaticamente.....	67
4.4.1. Estabilidade à separação de fases.....	67
4.4.2. Distribuição de tamanho de gotas.....	71
4.4.3. Reologia.....	79
4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	91

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS.....	95
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
ANEXO 1. Medidas reológicas das emulsões estabilizadas por 1 e 4 % (m/v) CN-Na em pH 3, 5 e 7 .....	107
ANEXO 2. Medidas reológicas das emulsões estabilizadas por 1 e 4 % (m/v) CN-Na tratadas enzimaticamente .....	111



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição aminoacídica das caseínas do leite (g/100g proteína).....	10
Tabela 2.2. Ponto isoelétrico e massa molecular das principais frações da caseína.....	11
Tabela 3.1. Composição dos géis de caseinato de sódio formados com adição de lacase (LAC) e ácido ferúlico (AF).....	20
Tabela 3.2. Representação esquemática das análises realizadas nas emulsões estabilizadas por caseinato de sódio sem tratamento enzimático e sem adição de ácido ferúlico.....	23
Tabela 3.3. Representação esquemática das análises realizadas nas emulsões estabilizadas por caseinato de sódio com adição de ácido ferúlico e/ou adição de lacase. ....	23
Tabela 4.1. Índice de separação de fases (%) das macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio após 7 dias de estocagem.....	32
Tabela 4.2. Composição química das fases separadas após 7 dias de estocagem das macroemulsões estabilizadas por CN-Na em pH 3, 5 e 7. ....	34
Tabela 4.3. Efeito da concentração de proteína e do pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Herschel-Bulkley para fase superior e ao modelo Lei da Potência para fase inferior das macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio. ....	38
Tabela 4.4. Índice de separação de fases (%) das emulsões estabilizadas por CN-Na após 15 dias de estocagem. ....	42
Tabela 4.5. Composição química das fases separadas após 15 dias de estocagem das emulsões estabilizadas por 1% de CN-Na em pH 3 e 5.....	43
Tabela 4.6. Tamanho médio superficial das gotas $d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio. ....	47
Tabela 4.7. Efeito da concentração de proteína e do pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.....	51
Tabela 4.8. Índice de separação de fases (%) das emulsões estabilizadas com 1% (m/v) de CN-Na com adição de ácido ferúlico e lacase. ....	70
Tabela 4.9. Tamanho médio de gotas $d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões estabilizadas com caseinato de sódio na presença de ácido ferúlico e lacase.....	72
Tabela 4.10. Efeito da concentração de ácido ferúlico e lacase nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas por CN-Na em pH 7.....	84
Tabela 4.11. Efeito da concentração de ácido ferúlico e lacase nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das fases superiores estabilizadas por 1% de CN-Na. ....	85
Tabela 4.12. Módulos de armazenamento ( $G'$ ) e dissipação ( $G''$ ) obtidos em frequência de 1 Hz em ensaios oscilatórios de emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.....	91



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Esquema dos mecanismos de instabilidade em emulsões. Fonte: McClements (2005). .....	8
<b>Figura 2.2.</b> Reação de oxidação de cadeia lateral de tirosina em proteínas catalisada pela lacase. Fonte: BURCHERT et al. (2010)......	14
<b>Figura 2.3.</b> Estrutura do ácido ferúlico. Fonte: MATTINEN et al., (2005). .....	15
<b>Figura 4.1.</b> Separação de fases das macroemulsões após 7 dias de estocagem estabilizadas com (A) 1% de CN-Na e (B) 4% de CN-Na.....	32
<b>Figura 4.2.</b> Curvas de escoamento da fase superior das macroemulsões O/A (dependência do tempo de cisalhamento) com (A) 1% de CN-Na em pH 3, (B) 4 % de CN-Na em pH 3, (C) 1% de CN-Na em pH 5, (D) 4% de CN-Na em pH 5, (E) 1% de CN-Na em pH 7 e (F) 4% de CN-Na em pH 7.....	36
<b>Figura 4.3.</b> Curvas de escoamento em estado estacionário das macroemulsões O/A. (A) Fase superior das macroemulsões e (B) fase inferior das macroemulsões. pH: (◇) 3, (□) 5 e (○) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados.....	37
<b>Figura 4.4.</b> Separação de fases das emulsões O/A após 15 dias de estocagem.....	42
<b>Figura 4.5.</b> Microestruturas das emulsões com 4% de CN-Na e da fase superior das emulsões com 1% de CN-Na após 7 dias de estocagem.....	45
<b>Figura 4.6.</b> Distribuição do tamanho de gotas para as emulsões estabilizadas com 1% (—) e 4% (- -) de caseinato de sódio em diferentes valores de pH (3, 5 e 7).....	46
<b>Figura 4.7.</b> Curvas de escoamento das emulsões O/A para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com (A)1% de CN-Na em pH 3 (fase superior), (B) 4% de CN-Na em pH 3, (C) 1% de CN-Na em pH 5 (fase superior), (D) 4% de CN-Na em pH 5, (E) 1% de CN-Na em pH 7 e (F) 4% de CN-Na em pH 7.....	49
<b>Figura 4.8.</b> Curvas de escoamento em estado estacionário das emulsões O/A. pH: (□) 3, (Δ) 5 e (◇) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados. Com 1% de CN-Na e pH 3 ou 5 está apresentado o comportamento da fase superior.....	50
<b>Figura 4.9.</b> Efeito da concentração de proteína e do pH na viscosidade aparente das emulsões homogeneizadas. pH: (◇) 3, (□) 5 e (○) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados. Com 1% de CN-Na e pH 3 ou 5 está apresentado a viscosidade da fase superior. ....	52
<b>Figura 4.10.</b> Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsão estabilizada com 4% de CN-Na em pH 7. Módulo elástico $G'$ (◆) e módulo viscoso $G''$ (◇). .....	53
<b>Figura 4.11.</b> Influência da concentração de proteína e do pH no módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões O/A. pH: (□) 3, (Δ) 5 e (◇) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados. Com 1% de CN-Na e pH 3 ou 5 está apresentado o comportamento da fase superior. ....	54
<b>Figura 4.12.</b> Aspecto visual da adição de ácido ferúlico e lacase nos géis de caseinato de sódio. .....	57

<b>Figura 4.13.</b> Tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.....	59
<b>Figura 4.14.</b> Deformação na ruptura ( $\epsilon_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.....	60
<b>Figura 4.15.</b> Módulo de elasticidade (E) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.....	61
<b>Figura 4.16.</b> Tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.....	62
<b>Figura 4.17.</b> Deformação na ruptura ( $\epsilon_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.....	63
<b>Figura 4.18.</b> Módulo de elasticidade (E) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.....	64
<b>Figura 4.19.</b> Efeito do ácido ferúlico na capacidade de retenção de água de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança. ....	65
<b>Figura 4.20.</b> Efeito da lacase na capacidade de retenção de água de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.....	66
<b>Figura 4.21.</b> Estabilidade das emulsões O/A em pH 7 após 15 dias de estocagem. (A) 1% (m/v) de proteína e (B) 4% de (m/v) proteína. (1) 10 mM AF, (2) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (3) 5 mM AF e (4) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	68
<b>Figura 4.22.</b> Estabilidade das emulsões O/A com 1% (m/v) de proteína após 15 dias de estocagem. (A) pH 5 e (B) pH 3. (1) 10 mM AF, (2) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (3) 5 mM AF e (4) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	69
<b>Figura 4.23.</b> Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 4% (m/v) em pH 7. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	73
<b>Figura 4.24.</b> Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1% (m/v) em pH 7. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	74
<b>Figura 4.25.</b> Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1% (m/v) em pH 5. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	75
<b>Figura 4.26.</b> Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1% (m/v) em pH 3. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	76
<b>Figura 4.27.</b> Distribuição de gota para emulsões estabilizadas com 1% (m/v) de proteína na presença de (—) 10 mM AF, (— —) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, (— · — ·) 5 mM AF e (— · · —) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	77
<b>Figura 4.28.</b> Distribuição de gota para emulsões estabilizadas com 4% (m/v) de proteína em pH 7 na presença de (—) 10 mM AF, (— —) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, (— · — ·) 5 mM AF e (— · · —) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.....	78

- Figura 4.29.** Curvas de escoamento das emulsões com 1% de CN-Na em pH 3 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF (fase superior), (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC (fase superior), (C) 5 mM AF (fase superior) e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC..... 80
- Figura 4.30.** Curvas de escoamento da fase superior das emulsões com 1% de CN-Na em pH 5 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC. .... 80
- Figura 4.31.** Curvas de escoamento das emulsões com 1% de CN-Na em pH 7 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC..... 81
- Figura 4.32.** Curvas de escoamento das emulsões com 4% de CN-Na em pH 7 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC..... 81
- Figura 4.33.** Curvas de escoamento em estado estacionário das emulsões (pH 7) e da fase superior (pH 3 e 5), estabilizadas com 1% proteína na presença de ( $\Delta$ ) 10 mM AF, ( $\blacktriangle$ ) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, ( $\square$ ) 5 mM AF e ( $\blacksquare$ ) 5mM AF + 1 mg/mL LAC. Com 1% de CN-Na, pH 3 e 5mM AF + 1 mg/mL LAC está apresentado o comportamento da emulsão. .... 83
- Figura 4.34.** Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsão estabilizada com 1% de CN-Na em pH 7. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5mM AF + 1 mg/mL LAC. Módulo elástico  $G'$ : símbolos fechados e módulo viscoso  $G''$ : símbolos abertos. .... 87
- Figura 4.35.** Influência da concentração de ácido ferúlico e lacase no módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões O/A em pH 7. (A) 1% de CN-Na e (B) 4% de CN-Na. ( $\blacklozenge$ ) 10 mM AF, ( $\diamond$ ) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, ( $\bullet$ ) 5 mM AF, ( $\circ$ ) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC e ( $\text{—}$ ) controle. .... 88
- Figura 4.36.** Influência da concentração de ácido ferúlico e lacase no módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões estabilizadas com 1% de CN-Na. (A) pH 5 e (B) pH 3. ( $\blacklozenge$ ) 10 mM AF, ( $\diamond$ ) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, ( $\bullet$ ) 5 mM AF, ( $\circ$ ) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC e ( $\text{—}$ ) controle. .... 89
- Figura 4.37.** Eletroforese SDS-PAGE das emulsões estabilizadas com caseinato de sódio em pH 7. (1) marcador de massa molecular, (2) emulsão 4% de CN-Na (controle 1), (3) Controle 1 + 10 mM AF, (4) Controle 1 + 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (5) Controle 1 + 5 mM AF, (6) Controle 1 + 5 mM AF + 1 mg/mL LAC, (7) emulsão 1% de CN-Na (controle 2), (8) Controle 2 + 10 mM AF, (9) Controle 2 + 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (10) Controle 2 + 5 mM AF e (11) ) Controle 2 + 5 mM AF + 1 mg/mL LAC. .... 93



## RESUMO GERAL

Proteínas são os biopolímeros mais amplamente utilizados nas formulações de emulsões alimentícias como agentes emulsificantes, por serem um aditivo seguro. Com o intuito de entender e melhorar as propriedades emulsificantes das proteínas, inicialmente foram estudadas as macroemulsões óleo-água (O/A) estabilizadas por caseinato de sódio (CN-Na), obtidas em um sistema rotor-estator, sob diferentes concentrações de proteína e condições de pH. Todas as macroemulsões apresentaram separação de fases, devido ao mecanismo de cremação. Este processo de desestabilização foi reduzido quando existiu o aumento da viscosidade dos sistemas, obtido pela adição de maiores concentrações de proteína e pela redução do pH em direção ao ponto isoelétrico da proteína. Já a utilização da homogeneização a altas pressões promoveu a formação de emulsões cineticamente estáveis, não sendo observada separação de fases com 4% de CN-Na em nenhuma das condições de pH. De modo geral, as emulsões apresentaram comportamento pseudoplástico, com exceção das emulsões estabilizadas com 1% de proteína em pH 5, que se comportaram como fluido dilatante, e em pH 7, como fluido Newtoniano. A redução do pH para os sistemas com 1% de CN-Na levou à desestabilização das emulsões, devido à menor concentração de proteínas adsorvidas não permitirem uma estabilização eletrostática. Foi realizado um tratamento enzimático para melhorar a estabilização das emulsões que separaram de fases em pH ácido. Assim, géis de caseinato de sódio foram reticulados com lacase e ácido ferúlico e as propriedades mecânicas desses géis foram avaliadas. A adição de lacase mediada por ácido ferúlico resultou em géis mais rígidos, firmes e menos deformáveis. As melhores combinações foram selecionadas para o preparo de emulsões O/A estabilizadas com CN-Na com o objetivo de aumentar a estabilidade em pH ácido. O uso desse tratamento enzimático levou a modificações na estrutura da proteína e, com isso, mudanças nas suas propriedades funcionais, o que permitiu o aumento na estabilidade das emulsões. Em geral, essas emulsões tratadas enzimaticamente apresentaram-se mais estáveis, com distribuição de gotas menos polidispersa e com comportamento mais estruturado, apesar do aumento no diâmetro médio das gotas, variando entre 11,79 e 20,17  $\mu\text{m}$  para emulsões em pH 3 contra 6,14  $\mu\text{m}$  medido na emulsão controle (sem tratamento enzimático). Assim, o aumento na estabilidade dessas emulsões deve estar associado ao aumento da viscosidade, que promoveram estabilidade estérica aos sistemas. Portanto, os

resultados mostram que foi possível a produção de emulsões ácidas com maior estabilidade a partir do caseinato de sódio, através do tratamento enzimático, originando emulsões com estruturas e propriedades reológicas diferenciadas em comparação com a proteína não reticulada.

**Palavras-chave:** caseinato de sódio, lacase, ácido ferúlico, reticulação, emulsões, estabilidade, reologia, microestrutura.

## ABSTRACT

Proteins are biopolymers widely used as a safe additive in the formulation of food emulsions as emulsifying agents. To understand and improve the emulsifying properties of sodium caseinate, initially oil-in-water macroemulsions (O/W) were studied. The emulsions were stabilized by sodium caseinate prepared using a rotor-stator device at different concentrations of protein and pH. All macroemulsions showed phase separation due to the creaming mechanism. This mechanism of destabilization was reduced with the increase of system viscosity, either due to the increase on the concentrations of protein and by the reduction of pH towards to the protein's isoelectric point. The use of high-pressure homogenization promoted the formation of stable microemulsions, with no phase separation observed in emulsions with 4% CN-Na. In general, the emulsions exhibited a shear-thinning behavior, except the emulsion containing 1% protein at pH 7, which exhibited Newtonian behavior, and at pH 5, which tended to show a shear-thickening behavior. The reduction of pH in emulsions with 1% CN-Na led to phase separated emulsions, which was attributed to the amount of adsorbed protein, which was insufficient to promote a strong electrostatic repulsion. In order to improve the stabilization of phase separated emulsions at acidic pH, an enzymatic treatment was carried out. Thus, sodium caseinate gels were cross-linked with laccase and ferulic acid and the mechanical properties of these gels were evaluated. The addition of laccase and ferulic acid resulted in gels with increased hardness, firmness and less deformable. The best treatments were selected for the preparation of O/W emulsions stabilized with CN-Na, in order to increase in their stability in acidic pH. The enzymatic treatment caused modifications in the protein structure, resulting in changes of functional properties, which led to an increase in the emulsion stability. In general, these enzymatically treated emulsions were more stable, composed by droplets with lower size distribution and more structured behavior, despite the increased mean droplet diameters (between 11.79 and 20.17  $\mu\text{m}$  for emulsions at pH 3). Thus, the stability increase of these emulsions could be associated to the increase in viscosity, which resulted in steric stability. Results showed that it was possible to produce more stable emulsions containing sodium caseinate in acidic pH using enzymatic treatment, resulting in emulsions with different structures and rheological properties when compared with the non-cross-linked protein.

**Keywords:** sodium caseinate, laccase, ferulic acid, cross-linking, emulsions, stability, rheology, microstructure.

## **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**



## 1.1. Introdução

Uma ampla variedade de produtos alimentícios é constituída de pequenas gotas dispersas em uma fase contínua, o que caracteriza uma emulsão. Leite, maionese, sorvete, molhos e sopas são exemplos de emulsões encontradas na indústria de alimentos. Contudo, as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis que tendem a se desestabilizar com o tempo (MCCLEMENTS, 2005), resultando em duas fases separadas. A estabilidade cinética das emulsões pode ser conseguida com o uso de agentes emulsificantes e/ou estabilizantes, como por exemplo, as proteínas e polissacarídeos. Estes compostos são considerados aditivos seguros e constituem uma alternativa aos emulsificantes artificiais, que vem encontrando extrema rejeição ao uso nas legislações dos principais mercados mundiais (CHEN et al., 2006).

As proteínas são emulsificantes de caráter anfifílico, que promovem a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial (DICKINSON, 2003). As caseínas são proteínas desordenadas e flexíveis, além de estáveis ao calor (PARKINSON & DICKINSON, 2004), sendo o caseinato de sódio um sal derivado da caseína bastante utilizado como emulsificante. No entanto, a utilização de proteínas como agente emulsificante é limitada pela sua alta sensibilidade às mudanças de pH e força iônica, o que afeta sua funcionalidade, tornando as emulsões simples mais susceptíveis à instabilidade.

Assim, uma nova estratégia para melhorar a funcionalidade das proteínas é o uso do processo de reticulação, formando ligações cruzadas covalentes entre suas moléculas. Este processo pode ser obtido através de modificações químicas e/ou enzimática (BUCHERT et al., 2010). Contudo, modificações químicas podem levar à formação de produtos tóxicos, o que pode ser evitado com uso de enzimas. Assim, as propriedades funcionais das proteínas para uso em emulsões alimentícias podem ser melhoradas com a reticulação através de enzimas.

A lacase é uma enzima oxidase contendo cobre, que catalisa a formação de radicais fenóxi e água pela oxidação de um elétron da hidroxila do grupo fenólico, utilizando a molécula de oxigênio como o aceptor de elétron (CURA et al., 2009; STEFFENSEN et al., 2008). Ela atua em uma ampla variedade de substratos como monofenóis, polifenóis, aminas, entre outros, através da remoção de um elétron com conseqüente formação de radicais livres. O ácido ferúlico é um

composto fenólico bastante utilizado nas indústrias de alimentos e de cosméticos devido a sua baixa toxicidade (OU & KWOK, 2004). Este composto pode ser empregado como mediador da reação de oxidação pela lacase, aumentando a acessibilidade aos aminoácidos reativos, tirosina e triptofano, presentes no caseinato de sódio, e assim facilitando o processo de reticulação.

## **1.2. Objetivos**

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência da lacase e do ácido ferúlico na estabilidade de emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio.

Com este intuito, os objetivos específicos da pesquisa foram:

- Estudo de macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio e verificação da influência da concentração de proteína e variação do pH na estabilidade à separação de fases e comportamento reológico desses sistemas;
- Avaliação dos efeitos da homogeneização a altas pressões, concentração de proteína e variação do pH na estabilidade à separação de fases, tamanho de gotas, estrutura e propriedades reológicas dessas emulsões;
- Avaliação dos efeitos de ácido ferúlico e lacase nas propriedades mecânicas e capacidade de retenção de água em géis de caseinato de sódio;
- Produção de emulsões tratadas com ácido ferúlico e lacase e avaliação da estabilidade à separação de fases, tamanho de gotas, estrutura e propriedades reológicas desses sistemas.

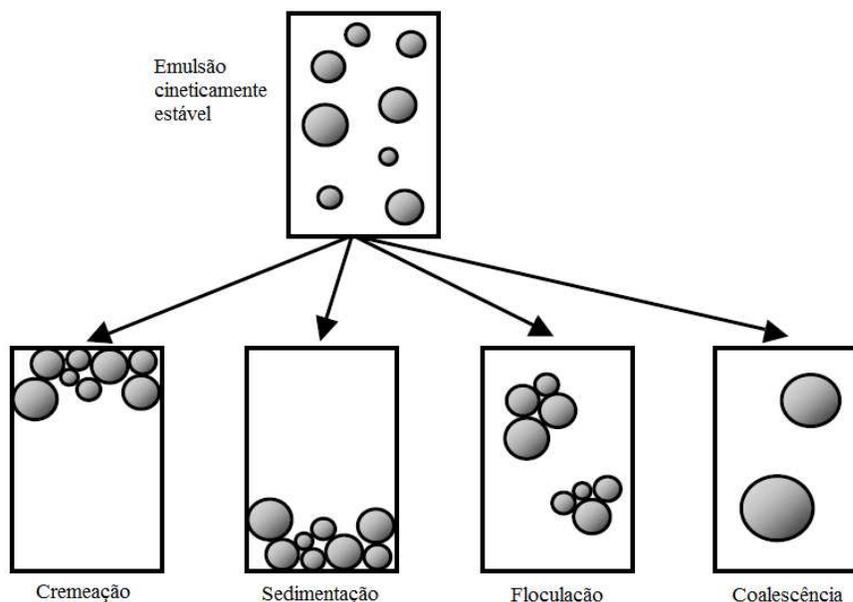
## **CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2.1. Emulsões

Uma emulsão consiste em dois líquidos imiscíveis (geralmente óleo e água), com um dos líquidos disperso no outro na forma de pequenas gotas esféricas. A substância que compõe as gotas de uma emulsão é chamada de fase dispersa, descontínua, ou interna, enquanto a substância que compõe o líquido circundante é chamada de fase contínua ou externa. As emulsões podem ser classificadas de acordo com a distribuição espacial relativa das fases aquosa e oleosa: um sistema que consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado emulsão óleo em água (O/A), como é o caso do leite, maionese, sopas e molhos; enquanto que, quando as gotas de água estão dispersas em uma fase oleosa, o sistema é chamado emulsão água em óleo (A/O), tendo como exemplos a margarina e a manteiga (MCCLEMENTS, 2005). Em geral, o processo de conversão de dois líquidos imiscíveis em uma emulsão é feito em duas etapas: a formação de uma pré-emulsão ou macroemulsão e posterior redução do tamanho das gotas desta emulsão pré-existente através do processo de homogeneização a altas pressões (MCCLEMENTS, 2005).

Quando consideramos a estabilidade de uma emulsão, é extremamente importante distinguir entre a sua estabilidade termodinâmica e cinética (DICKINSON, 1992), pois a primeira indica se o processo irá ou não ocorrer, enquanto que a segunda fornece em que taxa o processo ocorrerá (ATKINS, 1994 apud PERRECHIL, 2008). Quase todas as emulsões são termodinamicamente instáveis e tendem a se desestabilizar com o tempo (MCCLEMENTS, 2005). Contudo, é possível obter emulsões cineticamente estáveis, isto é, estáveis por um determinado período, com o uso de estabilizantes e emulsificantes (MCCLEMENTS et al., 2009). O agente estabilizante atua na modificação da viscosidade ou gelificação da fase contínua, enquanto o emulsificante promove a estabilização da emulsão via ação interfacial (DICKINSON, 2003). Após o período de estabilidade cinética, as emulsões podem se desestabilizar por diferentes mecanismos, como a cremação gravitacional, sedimentação, floculação, e coalescência das gotas (Figura 2.1). A cremação ocorre quando a densidade das gotas é menor do que a da fase contínua. Já na sedimentação, a densidade das gotas é maior do que da fase contínua, ocorrendo a sua deposição. A floculação consiste na associação das gotas em flocos, mantendo a integridade individual das gotas. A coalescência é o processo pelo qual duas ou mais gotas se fundem para formar uma única gota maior (MCCLEMENTS, 2005).



**Figura 2.1.** Esquema dos mecanismos de instabilidade em emulsões. Fonte: MCCLEMENTS (2005).

Emulsificantes são moléculas anfifílicas com propriedades de atividade superficial capazes de se adsorver em uma interface óleo-água, promovendo a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial (DICKINSON, 1992; MCCLEMENTS, 2005). Existem duas grandes classes de agentes emulsificantes usadas no processamento de alimentos: surfactantes de baixa massa molecular (monoglicérides, polisorbatos, lecitina, etc.) e emulsificantes macromoleculares (geralmente proteínas, como as do leite e do ovo) (DICKINSON, 2003).

Atualmente, grande parte dos emulsificantes utilizados são sintéticos e sua aceitabilidade frente ao mercado consumidor é cada vez menor, visto que os consumidores estão buscando produtos associados à qualidade de vida. Neste contexto, está inserido o uso de ingredientes naturais como estabilizantes/emulsificantes em alimentos processados, como, por exemplo, as proteínas e os polissacarídeos.

As propriedades funcionais das proteínas são determinadas pelas suas características moleculares como massa molecular, conformação, flexibilidade, polaridade e hidrofobicidade (MCCLEMENTS et al., 2009). As condições da solução, como pH e força iônica, além da interação desses biopolímeros com outros componentes presentes nos alimentos, também afetam

a sua funcionalidade (DICKINSON, 2003). Como consequência das alterações na funcionalidade destes biopolímeros, estas emulsões são bastante susceptíveis à instabilidade quando expostas a determinadas condições. Assim, uma nova estratégia para aumentar a estabilidade das emulsões estabilizadas com biopolímeros é fazer uso de enzimas capazes de formarem ligações cruzadas covalentes.

## **2.2. Caseínas e caseinato de sódio**

Existem dois principais tipos de proteínas do leite que podem ser separados com base na sua solubilidade em pH 4,6 a 20°C. Sob estas condições, algumas das proteínas precipitam; essas são chamadas caseínas. As proteínas que permanecem solúveis em pH 4,6 são conhecidas como proteínas do soro (FOX & KELLY, 2004). As caseínas são constituídas de quatro frações principais:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína (WONG et al., 1996). Estas proteínas compostas por aminoácidos unidos por amidas substituídas, ou ligações peptídicas. A natureza e tipo desses aminoácidos definem as estruturas primárias, secundárias e terciárias das moléculas proteicas, determinando suas interações com outros biopolímeros (CHEFTEL et al, 1996). A estrutura primária é uma sequência de aminoácidos unidos por ligações covalentes (ligações peptídicas e dissulfeto) formando uma cadeia polipeptídica (LEHNINGER, 2006). A análise elementar das caseínas (complexo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) revela a seguinte composição: 53% C; 7,05% H; 16,65% N; 0,76% S; 0,85% P, sendo que a presença de grupos fosfato nas caseínas permite classificá-las como fosfoproteínas (SGARBIERI, 1996). A Tabela 2.1 apresenta a composição dos aminoácidos que constituem as caseínas.

**Tabela 2.1.** Composição aminoacídica das caseínas do leite (g/100g proteína).

Constituintes	Caseínas				
	pH 4,6	$\alpha_{s1}$	$\beta$	$\kappa$	$\gamma$
Glicina	2,0	2,9	1,6	1,2	1,5
Alanina	3,2	3,4	2,0	5,4	2,3
Valina	7,2	5,5	10,2	6,3	10,5
Leucina	9,2	9,4	11,6	6,1	12,0
Isoleucina	6,1	6,1	5,5	7,1	4,4
Prolina	10,6	8,3	15,1	11,0	17,0
Fenilalanina	5,0	5,6	5,8	3,9	5,8
Tirosina	6,3	7,7	3,2	7,6	3,7
Triptofano	1,7	1,7	0,83	1,0	1,2
Serina	6,3	7,1	6,8	5,0	5,5
Treonina	4,9	2,5	5,1	6,7	4,4
Cistina+ Cisteína	0,34	0,0	0,0	1,2	0,0
Metionina	2,8	3,2	3,4	1,7	4,1
Arginina	4,1	4,4	3,4	4,0	1,9
Histidina	3,1	3,2	3,1	2,4	3,7
Lisina	8,2	8,7	6,5	6,5	6,2
Ácido aspártico	7,1	8,5	4,9	7,7	4,0
Ácido glutâmico	22,4	24,3	23,2	19,8	22,9
N amídico	1,1	1,3	1,6	1,9	1,6

Fonte: SGARBIERI, 1996.

A grande quantidade de ácido glutâmico e aspártico na cadeia peptídica confere característica ácida às caseínas. Além disso, devido à sua composição de aminoácidos, as caseínas apresentam hidrofobicidade média, ligeiramente superior à maioria das proteínas globulares, possibilitando que essa proteína se associe mais facilmente a complexos de alta massa molecular (CHEFTEL et al, 1996).

As duas maiores frações de caseína,  $\alpha$  e  $\beta$ , compreendem cerca de 75% do total das caseínas do leite. O predomínio de resíduos de prolina, e a ausência completa de resíduos de cisteína, significam que ambas as proteínas em solução adotam configurações desordenadas e flexíveis, inibindo a formação de estruturas secundárias ordenadas (DICKINSON, 1999). Além disso, a ausência de estrutura terciária contribui para a estabilidade das caseínas à desnaturação térmica e à exposição dos resíduos hidrofóbicos, além de contribuir para sua alta atividade de superfície (estrutura aberta). Esta última propriedade confere boas propriedades espumantes e emulsificantes (FOX & KELLY, 2004). As caseínas são estáveis ao calor, mas se agregam fortemente com a redução do pH (PARKINSON & DICKINSON, 2004). São proteínas de pequena massa molecular (variando de 20-25 kDa), o que provavelmente também contribui para sua alta estabilidade. O ponto isoelétrico e massa molecular das quatro frações de caseína estão apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Ponto isoelétrico e massa molecular das principais frações da caseína.

Fração Protéica	Ponto Isoelétrico	Massa Molecular (Da)
$\alpha_{s1}$	4,9	23.612
$\alpha_{s2}$	5,3	25.228
$\beta$	4,5	24.000
$\kappa$	4,1	21.000

Fonte: SGARBIERI, (2005); CHEFTEL et al, (1996).

O caseinato de sódio é um sal derivado da caseína, também composto pela mistura multicomponente das frações  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína. O caseinato de sódio é um importante ingrediente utilizado na indústria de alimentos devido à sua boa propriedade emulsificante quando comparado com outras proteínas, sua elevada solubilidade e estrutura dissociada e desdobrada. Além disso, essa proteína apresenta elevada hidrofobicidade, com uma nítida

separação entre as zonas muito hidrofílicas e muito hidrofóbicas das cadeias polipeptídicas (CHEFTEL et al, 1996).

A estabilidade e reologia das emulsões produzidas com caseinato de sódio dependem de dois fatores principais: a estrutura e composição da camada de proteína adsorvida na interface O/A, e o estado de desdobramento e agregação das proteínas na fase aquosa (DICKINSON, 1999). Como a acidificação a valores de pH próximos ao ponto isoeletrico do caseinato ( $\approx 4,6$ ) leva ao aumento das forças atrativas (interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals) entre as partículas de proteína, nestas condições ocorre a auto-associação dos componentes proteicos adsorvidos e não-adsorvidos (ALLEN et al., 2006) o que pode alterar as suas propriedades estabilizantes em uma emulsão. Assim, este ingrediente apresenta uma limitada aplicabilidade para o uso em emulsões acidificadas e a formação de uma estrutura na interface que não fosse susceptível a alterações de pH e força iônica seria necessária para a aplicação da caseína na estabilidade de emulsões.

### **2.3. Tratamento enzimático e reticulação**

Inúmeros estudos têm investigado métodos para melhorar a capacidade emulsificante das proteínas. A modificação química é um método de promover a reticulação em proteínas, como por exemplo, a reação de Maillard (BUCHERT et al., 2010). Neste sentido, a promoção de ligações covalentes entre as cadeias de proteína seria uma alternativa para o aumento da estabilidade de emulsões na presença de proteína, melhorando a resistência à proteólise (BUCHERT et al., 2010). Contudo, o uso de modificações químicas para melhorar as propriedades funcionais das proteínas pode levar à formação de produtos tóxicos (FÆRGEMAND et al., 1998), o que limita a sua utilização na indústria de alimentos. Assim, além de reações químicas as ligações cruzadas covalentes podem ser formadas na matriz alimentar através de tratamentos físicos ou enzimáticos (BUCHERT et al., 2010).

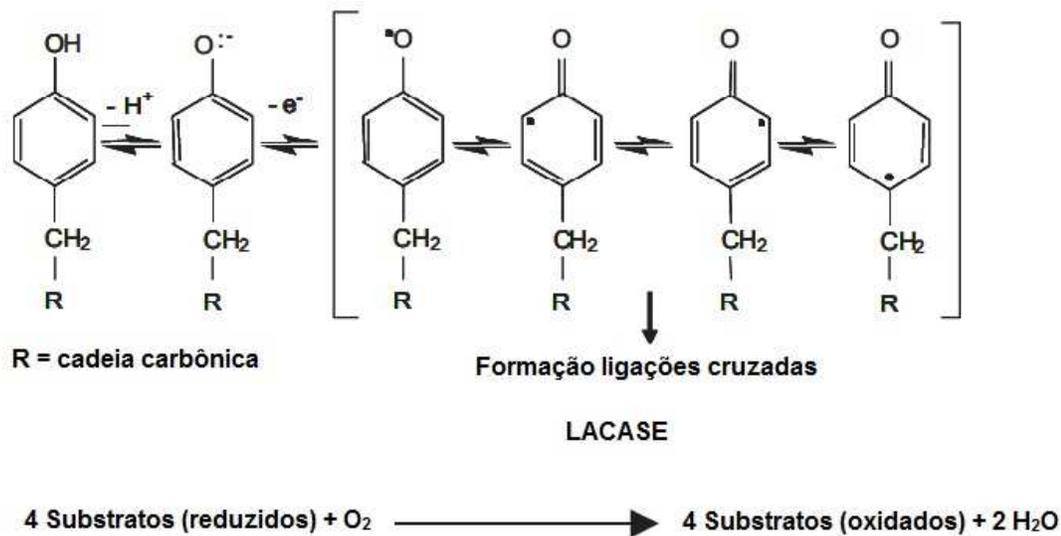
A utilização de enzimas na indústria de alimentos é muito promissora devido à sua alta especificidade com o substrato, condições brandas de reação e por serem catalisadores biodegradáveis (COUTO & HERRERA, 2006). As propriedades funcionais das proteínas podem

ser melhoradas com a reticulação através de enzimas como a tirosinase, transglutaminase e a lacase. A reticulação enzimática pode influenciar na estabilidade de emulsões O/A estabilizadas por proteína, através de mudanças na estrutura do emulsificante na interface e/ou na fase contínua (MA et al., 2011).

#### **2.4. Lacase**

A lacase (benzenodiol oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) é uma oxidase que catalisa a formação de radicais livres fenóxi e água pela oxidação da hidroxila do grupo fenólico utilizando a molécula de oxigênio como o aceptor de elétrons (Figura 2.2) (CURA et al., 2009; STEFFENSEN et al., 2008). Estes radicais livres são susceptíveis a reações químicas como a polimerização, hidratação e fragmentação (THURSTON, 1994; CLAUS, 2003). A lacase é capaz de catalisar a oxidação de proteínas e polissacarídeos formando conjugados heterogêneos, através de ligações cruzadas (SELINHELMO et al., 2008). As modificações causadas na estrutura dos biopolímeros, como proteínas e/ou carboidratos, devido à formação de ligações cruzadas, podem melhorar sua capacidade estabilizante em emulsões. O aumento da estabilidade está associado à formação de uma espessa camada em torno das gotas de óleo, que aumenta a repulsão estérica e reduz as interações atrativas (LITTOZ & MCCLEMENTS, 2008).

Muitas lacases fúngicas têm pH ótimo de atuação em condições ácidas, embora algumas também apresentem em pH neutro e alcalino (KIISKINEN et al. 2002, MARTINS et al. 2002). O pH ótimo da lacase não é apenas afetado pela procedência da enzima mas também pelo substrato. O aumento do pH diminui o potencial redox do substrato fenólico, tornando-o mais susceptível à oxidação. A estabilidade à temperatura varia com a fonte de onde é isolada a lacase, mas em geral as lacases fúngicas são estáveis entre 30 e 60°C (BUCHERT et al., 2010).



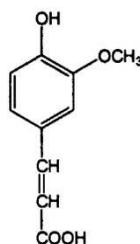
**Figura 2.2.** Reação de oxidação de cadeia lateral de tirosina em proteínas catalisada pela lacase. Fonte: BURCHERT et al. (2010).

A lacase pode oxidar diversos substratos incluindo monofenóis, polifenóis, diferentes substitutos de fenóis, diaminas, aminas aromáticas e tióis (THURSTON, 1994; MAYER & STAPLES, 2002). As ligações cruzadas podem ocorrer em grupos aromáticos presentes em proteínas/carboidratos ou em certos aminoácidos presentes nas proteínas, como resíduos de glutamina, lisina, tirosina e cisteína (BUCHERT et al., 2007).

A presença e a acessibilidade aos aminoácidos alvo dependem da conformação do substrato, sendo estes os principais fatores que afetam a formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares em proteínas (BUCHERT et al., 2010). A caseína é uma proteína que não apresenta estrutura secundária e terciária ordenada, o que a torna um ótimo substrato para atuação da lacase, devido à sua estrutura flexível. Segundo Mattinen et al. (2006), dentre 15 aminoácidos estudados somente a tirosina, cisteína e triptofano foram oxidados pela lacase, sendo que a utilização de ácido ferúlico aumentou a acessibilidade a estes aminoácidos.

### 2.4.1. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) é uma substância naturalmente presente no reino vegetal. Ele é um ácido fenólico de baixa toxicidade, podendo ser adsorvido e facilmente metabolizado pelo corpo humano. O ácido ferúlico tem muitas funções fisiológicas como agente antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatório, antitrombose e anticancerígeno. Devido a todas estas propriedades, o ácido ferúlico passou a ser usado nas indústrias de alimentos e de cosméticos (OU & KWOK, 2004). A Figura 2.3 apresenta a estrutura do ácido ferúlico.



**Figura 2.3.** Estrutura do ácido ferúlico. Fonte: MATTINEN et al., (2005).

A adição de ácido ferúlico, um mediador de baixa massa molecular facilmente oxidado pela lacase, na mistura de reação enzima-proteína aumenta a acessibilidade aos aminoácidos reativos para a formação de radicais, resultando em extensivas ligações cruzadas entre os substratos (MATTINEN et al., 2005). Além disso, quando proteínas são utilizadas como substrato, a acessibilidade à tirosina pode ser limitada devido à sua elevada massa molecular e, consequentemente, a formação de ligações cruzadas pode ser melhorada na presença de um ácido fenólico (MATTINEN et al., 2005). Assim, a conformação da proteína, ou seja, a acessibilidade dos aminoácidos reativos, é um dos principais fatores que determina a extensão das ligações cruzadas das proteínas (MATTINEN et al., 2006), além da presença de algum componente fenólico de baixa massa molecular.

Estudos sobre a adição de ácido ferúlico na reação de caseinato de sódio com lacase mostraram que ocorreu um aumento das interações proteína-proteína e levou à formação de géis mais firmes, com valores de módulos de armazenamento mais altos e microestrutura mais fina, quando comparados a géis de caseinato tratados somente com lacase (CURA et al., 2009). A

utilização da lacase também promoveu a formação de ligações covalentes em emulsões multicamadas compostas por pectina de beterraba, que contem ácido ferúlico em sua composição, e  $\beta$ -lactoglobulina. As emulsões que foram reticuladas pela lacase foram mais estáveis ao NaCl que as emulsões contendo somente  $\beta$ -lactoglobulina (LITTOZ & MCCLEMENTS, 2008).

### **2.5. Emulsões estabilizadas com caseinato de sódio**

Estudos avaliaram a capacidade emulsificante do caseinato de sódio em emulsões do tipo óleo-água. Foram verificadas a influência do pH e da aplicação de forças mecânicas na obtenção das emulsões, o efeito da concentração de proteína no processo de estabilidade à cremeação, o processo de gelificação em emulsões e comportamento reológico (PERRECHIL & CUNHA, 2010; DICKINSON, 1999; ELIOT & DICKINSON, 2003; DICKINSON & GOLDING, 1997).

A concentração de proteína, pH e força iônica modificam o tamanho das gotas e a viscosidade da fase contínua, com conseqüente efeito na estabilidade cinética das emulsões. O aumento na concentração de caseinato leva à formação de emulsões mais estáveis, devido ao aumento da viscosidade (PERRECHIL & CUNHA, 2010). Porém, uma concentração muito elevada de proteína pode ocasionar a separação de fases da emulsão, sendo essa associada à floculação por depleção, que ocorre quando há proteínas não adsorvidas na superfície das gotas (DICKINSON, GOLDING & POVEY, 1997).

Além da concentração de biopolímero, o processo de formação das emulsões afeta a estabilidade das emulsões, sendo que o uso de homogeneização a altas pressões leva à formação de emulsões mais estáveis devido à redução do tamanho das gotas de óleo (PERRECHIL & CUNHA, 2010). O pH das emulsões tem grande influência na estabilidade, sendo que a estabilidade das macroemulsões é maior em condições próximas ao ponto isoelétrico (pI) do caseinato de sódio e menor em pH ácido (PERRECHIL & CUNHA, 2010). Assim, a obtenção de emulsões cineticamente estáveis utilizando o caseinato de sódio como emulsificante é limitada em pH ácido.

## **CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS**



### **3.1. Material**

A caseína, a lacase proveniente do *Trametes versicolor* e o ácido ferúlico foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St Louis - USA). De acordo com o fabricante, a lacase tinha uma atividade enzimática de 0,51 U/mg utilizando o catecol como substrato a 25°C em pH 6. O óleo de soja (óleo de soja Soya, Bunge Alimentos S.A, Brasil) foi obtido em supermercado local. A azida sódica adquirida da Sigma Aldrich Co. (St Louis - USA) foi adicionada às emulsões para evitar o crescimento microbiano. Os demais reagentes foram de grau analítico e também obtidos da Sigma Aldrich Co. (St Louis - USA).

### **3.2. Preparo das soluções-estoque**

#### **3.2.1. Caseinato de sódio**

A solução-estoque com 6 % (m/v) de caseinato de sódio (CN-Na) foi preparada pela dispersão da caseína em água deionizada sob agitação magnética por 3 h em uma temperatura máxima de 50°C. O pH foi ajustado para 7,0 com o uso de NaOH 10 M.

#### **3.2.2. Soluções de lacase e ácido ferúlico**

As soluções enzimáticas foram obtidas pela dispersão do pó de lacase em água deionizada, com concentração de 1, 5 e 10 mg/mL. As soluções de ácido ferúlico foram preparadas pela dissolução do composto fenólico em água deionizada, com concentração de 1, 5 e 10 mM. Ambas as soluções foram agitadas utilizando um agitador magnético até completa dissolução dos ingredientes. Estas concentrações foram obtidas a partir de ensaios preliminares para a formação de géis de caseinato de sódio.

### 3.3. Géis de caseinato de sódio

#### 3.3.1. Preparo dos géis

A capacidade da lacase de promover ligações covalentes nas moléculas de proteína foi verificada a partir da formação de géis de caseinato de sódio com diferentes concentrações de enzima (1, 5 e 10 mg/mL) e de ácido ferúlico (1, 5 e 10 mM). As combinações das concentrações das soluções nos géis estão apresentadas na Tabela 3.1. Estes sistemas foram preparados pela mistura das soluções de caseinato de sódio (4% m/v) com as soluções de lacase e ácido ferúlico por 2 horas à temperatura ambiente (CURA et al., 2009). Depois deste tratamento enzimático, esses sistemas foram incubados com adição de glucona- $\delta$ -lactona (GDL) sendo a razão GDL/proteína de 0,115 (CAVALLIERI & CUNHA, 2008) de forma que o pH final das amostras fosse 5,0 a 25°C por 22 horas. As amostras foram acondicionadas em formas cilíndricas de 22 mm de diâmetro e com altura de 22 – 25 mm para a formação e estabilização da rede dos géis a 25°C.

**Tabela 3.1.** Composição dos géis de caseinato de sódio formados com adição de lacase (LAC) e ácido ferúlico (AF).

Sistema	AF (mM)	Lac (mg/mL)	Volume AF (mL)	Volume LAC (mL)
0	0	0	0	0
1	1	0	15	0
2	1	1	6	9
3	1	5	6	9
4	1	10	6	9
5	5	0	15	0
6	5	1	6	9
7	5	5	6	9
8	5	10	6	9
9	10	0	15	0
10	10	1	6	9
11	10	5	6	9
12	10	10	6	9
13	0	1	15	0
14	0	5	15	0
15	0	10	15	0

### 3.3.2. Análises

#### 3.3.2.1. Compressão uniaxial

As propriedades mecânicas dos géis de caseinato de sódio foram analisadas em um texturômetro TA-XT Plus Texture Analyser (Stable MicroSystems Ltd., Surrey, Inglaterra), à temperatura ambiente. Para esta análise foi utilizada uma placa de acrílico de 60 mm a uma velocidade de compressão de  $5 \text{ mm.s}^{-1}$  até 80 % de deformação em relação à altura inicial do gel. A partir do diagrama de tensão-deformação foram determinadas as seguintes propriedades: módulo de elasticidade (E), tensão de ruptura ( $\sigma_{\text{rup}}$ ) e deformação na ruptura ( $\varepsilon_{\text{rup}}$ ). O módulo de elasticidade está relacionado com a firmeza do gel e é uma propriedade obtida dentro da zona elástica, sendo que a deformação até  $\approx 5\%$  foi considerada reversível. A tensão de ruptura refere-se à dureza do gel, correspondendo à tensão máxima aplicada a que o gel resiste antes da fratura, e a deformação associada a este ponto é denominada  $\varepsilon_{\text{rup}}$ . Todas as medidas foram realizadas em quintuplicata.

#### 3.3.2.2. Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água foi determinada por diferença de massa dos géis de caseinato de sódio antes e após serem centrifugados a 4000 g por 10 minutos a  $15^\circ\text{C}$  (KOCHER & FOEGEDING, 1993) em uma centrífuga refrigerada Jouan BR4i (Jouan S/A, Saint Herblain, França). Para isto, cerca de 1,0 g de gel foi envolvido por papel manteiga e papel filtro Whatman 1 (Whatman, Brentford, Inglaterra) antes de ser colocado em um tubo de centrífuga de 50 mL. O valor de retenção de água foi expresso como o percentual de água remanescente em relação à quantidade de água presente inicialmente no gel (BRAGA et al., 2006). Todas as medidas foram realizadas em quadruplicata.

### 3.4. Preparo das emulsões óleo-água (O/A)

#### 3.4.1. Tratamento enzimático

A solução estoque de caseinato de sódio (6% m/v) foi diluída de forma que estivesse na concentração de 1 e 4% (m/v) nas emulsões O/A. As soluções aquosas foram preparadas pela

agitação magnética das soluções de caseinato de sódio com as soluções de lacase (LAC) e ácido ferúlico (AF) por 2 horas à temperatura ambiente. Para as emulsões que não foram tratadas enzimaticamente, a solução estoque foi diluída para as concentrações mencionadas anteriormente, usando água deionizada.

### **3.4.2. Produção das emulsões**

As emulsões foram preparadas em pH 7 (acima do pI), 5 (próximo ao pI) e 3 (abaixo do pI), sendo o pH das soluções de caseinato ajustado com ácido cítrico 1M. A azida sódica (0,02 %, m/v) foi adicionada como agente antimicrobiano. O óleo de soja (30% v/v) foi adicionado e misturado à solução de CN-Na utilizando-se um sistema rotor-estator ULTRA TURRAX IKA modelo T18 (Staufen, Alemanha) a 18000 rpm por 4 minutos para a formação das macroemulsões. Para obter emulsões com tamanho de gota reduzido, as macroemulsões foram submetidas à homogeneização a altas pressões em um homogeneizador de dois estágios NS1001L2K-PANDA2K, Niro Soave S.p.A. (Parma, Itália), com a pressão no primeiro estágio de 600 bar e no segundo estágio de 50 bar (PERRECHIL, 2008). Os seguintes sistemas foram avaliados: (i) emulsões estabilizadas por caseinato de sódio, (ii) emulsões estabilizadas por caseinato de sódio com adição de ácido ferúlico, (iii) emulsões estabilizadas por caseinato de sódio com adição de ácido ferúlico e lacase. As Tabelas 3.2 e 3.3 descrevem as emulsões produzidas, as variáveis de processo, o processo de homogeneização, bem como as análises realizadas para a sua caracterização.

**Tabela 3.2.** Representação esquemática das análises realizadas nas emulsões estabilizadas por caseinato de sódio sem tratamento enzimático e sem adição de ácido ferúlico.

Tipo de emulsão	Variáveis de processo	Análises realizadas para caracterização
Macroemulsões	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentração de proteína</li> <li>• pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidade à separação de fases (Seção 3.5.1)</li> <li>• Composição de fases (Seção 3.5.2)</li> <li>• Reologia (estado estacionário) (Seção 3.5.5)</li> </ul>
Emulsões Homogeneizadas a alta pressão	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentração de proteína</li> <li>• pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidade à separação de fases (Seção 3.5.1)</li> <li>• Composição de fases (Seção 3.5.2)</li> <li>• Microscopia / tamanho de gota (Seção 3.5.3)</li> <li>• Reologia (escoamento e oscilatório) (Seção 3.5.5)</li> </ul>

**Tabela 3.3.** Representação esquemática das análises realizadas nas emulsões estabilizadas por caseinato de sódio com adição de ácido ferúlico e/ou adição de lacase.

Tipo de emulsão	Variáveis de processo	Análises realizadas para caracterização
Emulsões Homogeneizadas a alta pressão	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentração de proteína</li> <li>• Concentração de lacase</li> <li>• Concentração de ácido ferúlico</li> <li>• pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidade à separação de fases (Seção 3.5.1)</li> <li>• Microscopia / tamanho de gota (Seção 3.5.3)</li> <li>• Eletroforese em gel de poliacrilamida (Seção 3.5.4)</li> <li>• Reologia (estado estacionário e oscilatório) (Seção 3.5.5)</li> </ul>

### 3.5. Análises das emulsões

#### 3.5.1. Estabilidade das emulsões à separação de fases

Imediatamente após a formação das emulsões, alíquotas de 25 mL de amostra foram transferidas para tubos cilíndricos graduados (diâmetro interno = 15,5 mm, altura = 65 mm) e armazenadas por 7 dias à temperatura ambiente, sendo o volume da fase aquosa quantificado diariamente. Os resultados de estabilidade foram reportados como índice de separação de fases (ISF) descrito pela Equação 1:

$$\text{ISF (\%)} = H/H_0 \times 100 \quad (1)$$

onde H representa a altura da fase inferior com o tempo de estocagem e  $H_0$  a altura inicial.

#### 3.5.2. Composição química das fases

Após 7 dias de estocagem, as emulsões que apresentaram separação de fases com a formação de uma fase superior creme (oleosa) e uma inferior aquosa foram caracterizadas quimicamente. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1992) com fator de correção proteína-nitrogênio de 6,38. A umidade foi determinada gravimetricamente a 105°C (AOAC, 1992), enquanto a concentração de óleo foi obtida por diferença, a partir da concentração dos outros componentes. Todas as medidas foram realizadas em quadruplicata.

#### 3.5.3. Microscopia óptica e distribuição de tamanho de gotas

A microestrutura das emulsões foi avaliada após 7 dias de estocagem em microscópio Carl Zeiss modelo MF-AKS 24 x 36 EXPOMET (Zeiss, Jena, Alemanha). As amostras foram colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e visualizadas com aumento de 40 e 100 x, sendo obtidas aproximadamente 10 imagens de cada lâmina. As imagens obtidas foram avaliadas no software AxioVision Rel. 4.8.

O tamanho das gotas foi analisado através de técnica de espalhamento de luz utilizando-se o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). Esta análise foi realizada após 7 dias de estocagem das emulsões estabilizadas com caseinato de sódio, permitindo a obtenção da curva de distribuição de tamanho de partículas, sendo que o tamanho médio das gotas foi caracterizado em termos do diâmetro médio superficial,  $d_{32}$ , obtido pela Equação 2. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente e em sextuplicata.

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

onde  $n_i$  é o número de partículas com diâmetro  $d_i$ .

#### **3.5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu verificar a atuação da lacase através da determinação das massas moleculares dos agregados proteicos. Eletroforese em géis de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo o método de Laemmli (1970). Para a construção do gel foram utilizadas lâminas verticais de vidro (Bio-Rad, Hercules-CA), nas quais a poliacrilamida ainda não polimerizada foi adicionada. Os ensaios foram realizados em gel de poliacrilamida com concentrações de 12 % para o gel de resolução e de 5 % para o gel de empacotamento. As emulsões contendo 1 e 4% (m/v) de proteína em pH 7 foram diluídas em água deionizada e 30 µg de amostra foi aplicada nos compartimentos formados no topo do gel de empacotamento de poliacrilamida. A amostra foi diluída na razão de 1:2 em um tampão de amostra pH 6,8 (50 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 10 % de glicerol (v/v) e 0,1 % (m/v) de Comassie Brilliant Blue). O tampão de corrida (pH 8,3) continha 25 mM de Tris-HCl e 250mM de glicina. O gel de resolução e o gel de empacotamento foram compostos por tampão com 0,1 % de SDS e Tris-HCl, em pH 8,8 e 6,8, respectivamente. Após as corridas, todos os géis foram corados com 0,25 % (p/v) de Comassie Brilliant Blue em metanol/ácido acético glacial/água (4,5:1:4,5) e para o contraste estes foram descorados em solução de 1% (m/v) de metanol e 2,5% (m/v) de ácido acético. Foi utilizado como padrão um marcador comercial de massa molecular entre 19 – 180 kDa (prestained Invitrogen™ Bench Marker protein leader, Byoagency International, Jacksonville, USA).

### 3.5.5. Ensaio reológicos

As propriedades reológicas em baixas e altas deformações das emulsões foram determinadas utilizando-se um reômetro de tensão controlada Physica MCR301 (Anton Paar, Graz, Áustria). As medidas foram realizadas após 7 dias de estocagem para garantir a estabilidade cinética das emulsões, em triplicata e a 25°C. Para a fase superior utilizou-se uma geometria de placa rugosa de 50 mm de diâmetro para evitar o escorregamento, enquanto que a geometria de placa paralela de aço inoxidável de 75 mm de diâmetro foi utilizada para a fase inferior aquosa da emulsão. Para as emulsões que não apresentaram separação de fases, também foi utilizada a geometria de placa rugosa de 50 mm de diâmetro.

As curvas de escoamento foram obtidas através de um programa de passos múltiplos usando um intervalo de taxa de deformação entre 0-300 s<sup>-1</sup>, avaliando-se a relação entre viscosidade ( $\eta$ ) e taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ). Os modelos para fluidos Newtonianos (3), Lei da Potência (4) e de Herschel-Bulkley (5) foram utilizados para ajustar as curvas de escoamento aos dados:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3)$$

$$\sigma = k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (4)$$

$$\sigma = \sigma_0 + k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (5)$$

onde  $\sigma$  é a tensão de cisalhamento (Pa),  $\sigma_0$  é a tensão residual (Pa),  $\dot{\gamma}$  é a taxa de deformação (s<sup>-1</sup>),  $\eta$  é a viscosidade (Pa.s),  $n$  é o índice de comportamento e  $k$  o índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>).

Para realização dos ensaios oscilatórios, um teste de varredura de frequência (0,01 - 10 Hz) foi realizado a 25°C com uma deformação fixa de no máximo 1 % para que estivesse dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, sendo avaliados os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de dissipação ( $G''$ ).

### **3.6. Análise Estatística**

A avaliação dos dados foi realizada com auxílio do programa STATISTICA® 7.0, através da análise de variância (ANOVA) em que diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas pela comparação de médias entre os dados por meio do teste de Tukey.



## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Parte 1. Macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio**



## 4.1. Macroemulsões

A avaliação das propriedades das macroemulsões O/A preparadas com concentração de óleo fixa (30% v/v), variando-se a concentração de caseinato de sódio (1% e 4% m/v) e pH (3, 5 e 7) estão apresentadas abaixo.

### 4.1.1. Estabilidade à separação de fases

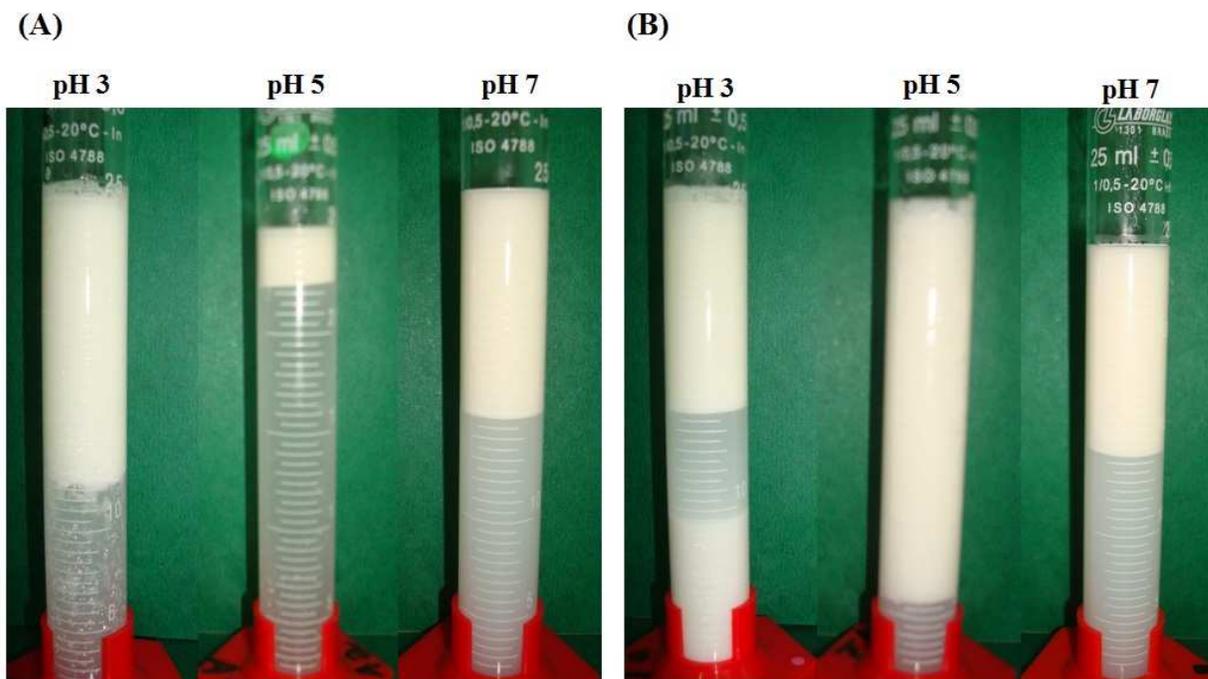
Em todas as condições estudadas, as macroemulsões foram instáveis, mostrando separação de fases com a formação de uma fase superior creme e uma inferior aquosa. Contudo, o volume final das fases dependeu do pH e da concentração de proteína utilizada. A Figura 4.1 apresenta o aspecto visual destes sistemas após 7 dias de estocagem. Foi observada a formação de uma rede de gel nas amostras preparadas em pH 3 e 5, sendo esta mais pronunciada com 4% de proteína. Além disso, a macroemulsão com 4% de proteína (m/v) em pH 3 apresentou formação de uma terceira fase depositada no fundo da proveta, que pode estar associada ao excesso de proteína nesta fase. Já a macroemulsão com 1% de caseinato de sódio em pH 3 apresentou partículas insolúveis na fase aquosa que podem ser resultantes da agregação de proteínas na fase inferior (Figura 4.1A).

A Tabela 4.1 apresenta o índice de separação de fases (ISF), calculado a partir da Equação 1, das macroemulsões estabilizadas com 1% e 4% de caseinato de sódio em diferentes valores de pH (3, 5 e 7). Através desses resultados (Tabela 4.1), pode-se verificar que o aumento da concentração de proteína levou à diminuição do volume da fase inferior (aquosa), ou seja, a menores índices de separação de fases indicando que as macroemulsões foram mais estáveis (maior volume da fase superior), exceto em pH 3 onde ocorreu o aparecimento de uma terceira fase. A partir dos índices de separação de fases, também pode-se observar que o processo de separação de fases das macroemulsões também foi fortemente influenciado pelos valores do pH, ou seja, pela carga superficial da proteína. Para valores de pH 3, abaixo do ponto isoelétrico (pI) do caseinato de sódio, a proteína apresenta carga líquida positiva; enquanto que em pH 7, acima do pI, ocorre predomínio de carga negativa. Já para valores de pH próximos ao pI (pH 5) a carga líquida é neutra, podendo ocorrer interações atrativas (interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de

van der Waals) entre as moléculas de proteína. Caso essas interações atrativas sejam suficientemente fortes, as partículas se agregarão e poderão formar uma rede de gel tridimensional (CHEN et al, 1999). A formação desta rede foi observada em valores de pH 5, sendo mais evidente na concentração de 4% de CN-Na. Resultados similares também foram observados por Perrechil (2008).

Tabela 4.1. Índice de separação de fases (%) das macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio após 7 dias de estocagem.

CN-Na	pH		
	3	5	7
1%	48	96	61
4%	60	22	57



**Figura 4.1.** Separação de fases das macroemulsões após 7 dias de estocagem estabilizadas com (A) 1% de CN-Na e (B) 4% de CN-Na.

#### **4.1.2. Composição química das fases**

A Tabela 4.2 apresenta a composição química das fases separadas após 7 dias de estocagem das macroemulsões, de forma que elas se encontrassem em equilíbrio (índice de separação de fases constante). A fase superior das emulsões é formada na sua maior parte por óleo enquanto que a fase inferior possui como componente majoritário a água, permitindo a classificação de fase creme e aquosa, respectivamente.

O aumento na concentração de proteína levou a uma elevação na razão proteína/água na fase inferior e na razão proteína/óleo na fase superior, sendo que a última parece estar associada à maior estabilidade da emulsão. Assim, o aumento do teor de proteína promoveu a diminuição da mobilidade das gotas, resultando no aumento da estabilidade cinética (PERRECHIL & CUNHA, 2010). A macroemulsão estabilizada por 4% de caseinato de sódio em pH 5 apresentou a maior razão proteína/óleo na fase superior, coerente com o índice de separação de fases, indicando que nestas condições a proteína foi capaz de recobrir maior parte da superfície das gotas de óleo presentes na fase creme e melhorar a estabilidade.

**Tabela 4.2.** Composição química das fases separadas após 7 dias de estocagem das macroemulsões estabilizadas por CN-Na em pH 3, 5 e 7.

Composição Inicial		Fase Superior					Fase Inferior				
Prot (%)	pH	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Razão prot/óleo	Razão óleo/água	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Razão prot/água	Razão Óleo/água
	3	1,04 ± 0,16	28,25 ± 0,95	70,71 ± 0,96	0,015	2,50	0,73 ± 0,15	97,34 ± 0,74	1,93 ± 0,76	0,007	0,0198
1	5	1,65 ± 0,20	38,42 ± 5,45	59,93 ± 5,45	0,028	1,56	0,65 ± 0,13	98,31 ± 0,16	1,04 ± 0,21	0,007	0,0106
	7	1,26 ± 0,27	26,80 ± 0,43	71,94 ± 0,51	0,018	2,68	1,01 ± 0,16	98,68 ± 0,20	0,31 ± 0,26	0,010	0,0031
	3(*)	1,13 ± 0,19	30,11 ± 1,17	68,76 ± 1,18	0,016	2,28	0,87 ± 0,09	97,48 ± 0,99	1,65 ± 0,99	0,009	0,0039
4	5	4,60 ± 0,48	50,45 ± 1,39	44,95 ± 1,47	0,102	0,89	0,70 ± 0,07	98,50 ± 0,19	0,8 ± 0,20	0,007	0,0081
	7	4,10 ± 0,27	25,73 ± 0,11	70,19 ± 0,29	0,058	2,73	1,73 ± 0,36	95,66 ± 0,08	2,61 ± 0,37	0,018	0,0273

(\*) Composição terceira fase, desconsiderando a presença de óleo: proteína (%) = 2,17 ± 0,2; água (%) = 96,09.

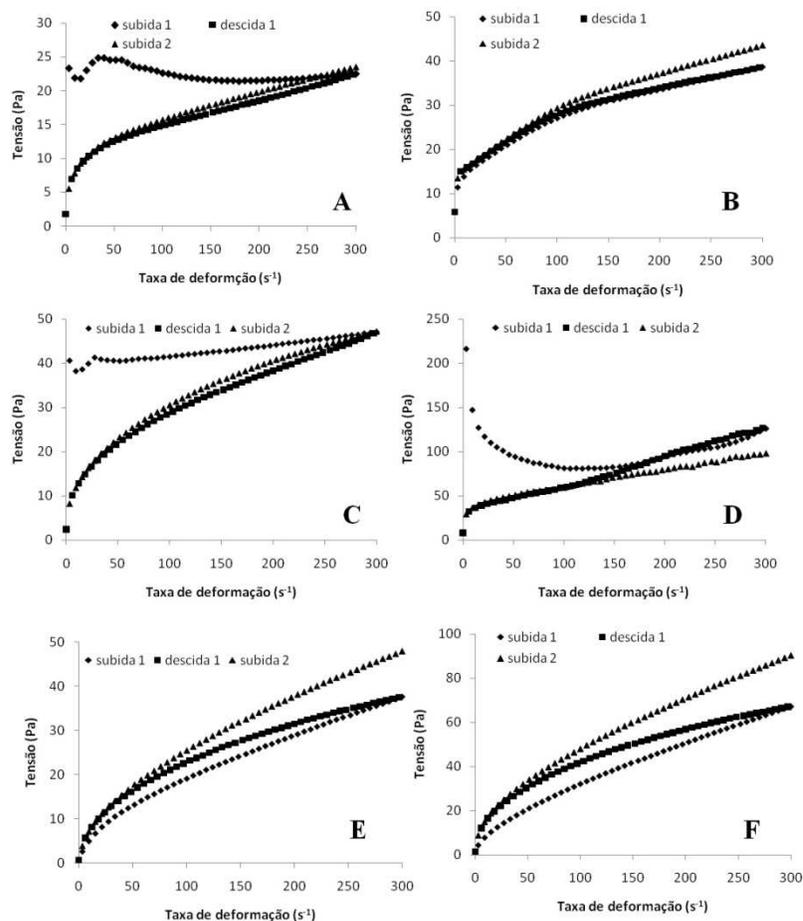
### 4.1.3. Reologia

Medidas reológicas para obtenção das curvas de escoamento foram realizadas para as fases separadas das macroemulsões. A Figura 4.2 apresenta as curvas de escoamento da fase superior das macroemulsões com diferentes concentrações de proteína e pH obtidas a 25°C. Com o intuito de verificar a existência de dependência do tempo de cisalhamento nos sistemas, as macroemulsões foram primeiramente submetidas a um aumento de tensão de cisalhamento (subida 1), seguido por uma redução na tensão (descida) e, posteriormente, uma nova rampa crescente (subida 2) de tensão de cisalhamento. As fases superiores dos sistemas em pH 3 e 5 com 1% CN-Na apresentaram ruptura estrutural com a aplicação do cisalhamento, resultando na redução da viscosidade aparente entre a subida 1 e a descida, o que é indicativo da presença de tixotropia. Esse comportamento pode estar associado à ruptura do gel formado próximo ao pI. Já as demais amostras, com exceção da emulsão com 4% de proteína em pH 5, apresentaram comportamento reopético, ou seja, apresentaram aumento da viscosidade aparente com o tempo de cisalhamento, especialmente em pH 7. Uma explicação para este tipo de comportamento é que a aplicação de uma força de cisalhamento em uma emulsão aumenta tanto a frequência quanto a eficiência das colisões entre as gotas, o que pode levar a um aumento da agregação e, conseqüentemente, a um aumento na viscosidade aparente com o tempo (MCCLEMENTS, 2005). A fase inferior não mostrou comportamento dependente do tempo de cisalhamento.

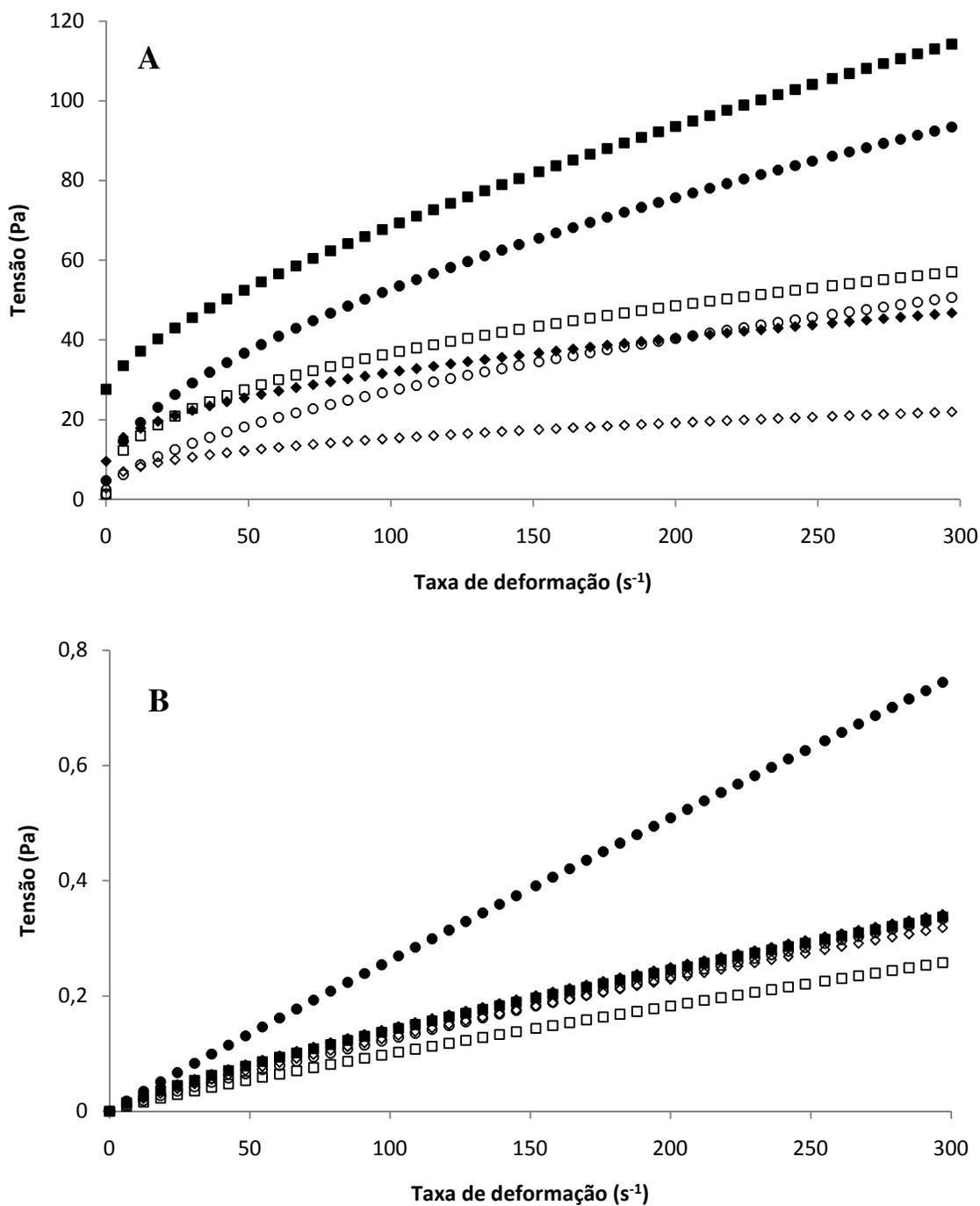
A Figura 4.3 mostra as curvas de escoamento em estado estacionário da fase superior (subida 2) e inferior de todas as macroemulsões estudadas. A fase superior das macroemulsões apresentou comportamento de fluido pseudoplástico ( $n < 1$ ) com tensão residual, sendo assim, o modelo Herschel-Bulkley (HB) foi ajustado às curvas de escoamento, apresentando coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior que 0,999 para todas as condições estudadas. Os parâmetros de ajustes estão apresentados na Tabela 4.3, juntamente com a viscosidade aparente ( $\eta_{100}$ ) a  $100 \text{ s}^{-1}$ .

A partir da Tabela 4.3 pode-se notar que o aumento na concentração de proteína levou ao aumento dos parâmetros reológicos: tensão residual ( $\sigma_0$ ), índice de comportamento ( $n$ ) e índice de consistência ( $k$ ), com exceção do pH 5 para este último parâmetro. Nesta condição, as macroemulsões eram mais estruturadas, pois o pH estava mais próximo ao ponto isoelétrico do

caseinato de sódio, levando à formação de uma rede de gel bastante viscosa. Como consequência, a viscosidade aparente da fase superior foi consideravelmente maior do que em valores de pH 3 e 7. No entanto, como a emulsão com 4% de proteína em pH 5 apresentou elevada tensão residual, este valor pode ter mascarado o índice de comportamento e consistência, sendo mais confiável comparar a viscosidade aparente das emulsões, já que estes valores são independentes do ajuste do modelo. Analisando  $\eta_{100}$  (Tabela 4.3), pode-se observar que o aumento na concentração de proteína resultou em maiores valores de viscosidade na taxa de deformação avaliada, o que foi associado à formação de um sistema mais estruturado, melhorando a estabilidade das macroemulsões, e consequentes menores índices de separação de fases (Tabela 4.1).



**Figura 4.2.** Curvas de escoamento da fase superior das macroemulsões O/A (dependência do tempo de cisalhamento) com (A) 1% de CN-Na em pH 3, (B) 4 % de CN-Na em pH 3, (C) 1% de CN-Na em pH 5, (D) 4% de CN-Na em pH 5, (E) 1% de CN-Na em pH 7 e (F) 4% de CN-Na em pH 7.



**Figura 4.3.** Curvas de escoamento em estado estacionário das macroemulsões O/A. (A) Fase superior das macroemulsões e (B) fase inferior das macroemulsões. pH: (◇) 3, (□) 5 e (○) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados.

A fase inferior de todos os sistemas também apresentou pseudoplasticidade, sendo que o modelo Lei da Potência foi o que melhor se ajustou às curvas de escoamento (Tabela 4.3). A viscosidade aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$  da fase inferior de todas as condições foi consideravelmente menor que a da fase superior. Esse comportamento pode ser explicado pela composição química das fases (Tabela 4.2), em que a razão óleo/água da fase superior foi muito maior do que a razão óleo/água da fase inferior, além da presença das gotas de óleo na fase superior, que levaram ao comportamento altamente pseudoplástico desta fase. Além disso, deve-se considerar que como o componente predominante na fase inferior (aquosa) é a água, o comportamento viscoso foi semelhante ao da água, com uma pequena pseudoplasticidade, o que pode ser atribuído à proteína presente nesta fase.

**Tabela 4.3.** Efeito da concentração de proteína e do pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Herschel-Bulkley para fase superior e ao modelo Lei da Potência para fase inferior das macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio.

Proteína (% m/v)	pH	Fase superior				Fase inferior		
		$\sigma_0$ (Pa)	$k$ (Pa.s <sup>n</sup> )	$n$	$\eta_{100}$ (Pa.s)	$k$ (Pa.s <sup>n</sup> )	$n$	$\eta_{100}$ (mPa.s)
1	3	2,86 <sup>Aa</sup>	2,02 <sup>Aa</sup>	0,39 <sup>Aa</sup>	0,15 <sup>Aa</sup>	0,0028 <sup>Aa</sup>	0,83 <sup>Aa</sup>	1,29 <sup>Aa</sup>
	5	1,34 <sup>Ab</sup>	5,16 <sup>Ab</sup>	0,42 <sup>Ab</sup>	0,37 <sup>Ab</sup>	0,0018 <sup>Ab</sup>	0,87 <sup>Ab</sup>	1,00 <sup>Ab</sup>
	7	1,30 <sup>Ab</sup>	1,70 <sup>Aa</sup>	0,59 <sup>Ac</sup>	0,27 <sup>Ac</sup>	0,0020 <sup>Ab</sup>	0,90 <sup>Ac</sup>	1,25 <sup>Aa</sup>
4	3	9,60 <sup>Ba</sup>	2,56 <sup>Aab</sup>	0,47 <sup>Ba</sup>	0,31 <sup>Ba</sup>	0,0037 <sup>Ba</sup>	0,80 <sup>Ba</sup>	1,42 <sup>Ba</sup>
	5	27,61 <sup>Bb</sup>	1,72 <sup>Ba</sup>	0,69 <sup>Bb</sup>	0,67 <sup>Bb</sup>	0,0034 <sup>Ba</sup>	0,80 <sup>Ba</sup>	1,35 <sup>Ba</sup>
	7	4,71 <sup>Bc</sup>	3,58 <sup>Bb</sup>	0,56 <sup>Bc</sup>	0,52 <sup>Bc</sup>	0,0032 <sup>Aa</sup>	0,96 <sup>Ab</sup>	2,62 <sup>Ab</sup>

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína para um valor de pH fixo. Letras minúsculas: diferenças entre os valores de pH para uma mesma concentração de proteína.

**Parte 2. Emulsões estabilizadas por caseinato de sódio utilizando altas pressões de  
homogeneização**



## 4.2. Emulsões

As emulsões O/A foram preparadas a partir das macroemulsões analisadas anteriormente, seguidas de um processo de homogeneização a altas pressões (600/50 bar) mantendo as mesmas concentrações de óleo (30% v/v) e de caseinato de sódio (1% e 4% m/v), bem como os valores de pH (3, 5 e 7).

### 4.2.1. Estabilidade à separação de fases

As emulsões estabilizadas com 4% de caseinato de sódio não apresentaram separação de fases em nenhum dos pH estudados, após 15 dias de estocagem. No entanto, nas emulsões com 1% de caseinato de sódio ocorreu formação de duas fases, com exceção do pH 7,0 que permaneceu estável (Figura 4.4). Assim, o comportamento de separação de fases foi influenciado pela concentração de proteína e pelo pH das emulsões. Diferentemente das macroemulsões, o aumento da concentração de proteína resultou na formação de emulsões estáveis, indicando que com a aplicação de maior magnitude de forças mecânicas e redução do tamanho de gotas, a quantidade de proteína foi suficiente para recobrir a superfície das gotas e estabilizar as emulsões (DICKINSON et al., 1997). Como observado anteriormente nas macroemulsões, também foi observada a formação de uma rede de gel em condições de pH 3 e 5 (Figura 4.4).

A influência do pH foi mais clara nas emulsões com 1% de caseinato de sódio, em que houve separação de fases quando o pH estava próximo (pH 5) e abaixo (pH 3) do pI. Em condições próximas ao pI da proteína, as emulsões encontraram-se mais floculadas, com formação de uma rede de gel. Além disso, apresentaram gotas com baixa densidade de carga, e insuficiente repulsão eletrostática capaz de evitar a agregação das gotas (SURH et al., 2006; MCCLEMENTS, 2005). A floculação, geralmente, leva à redução da estabilidade à cremeação, exceto em emulsões concentradas em que a formação de uma rede de gel influencia positivamente na estabilidade (DICKINSON, 1998), fenômeno observado com a emulsão estabilizada com 4% de proteína em pH 5.

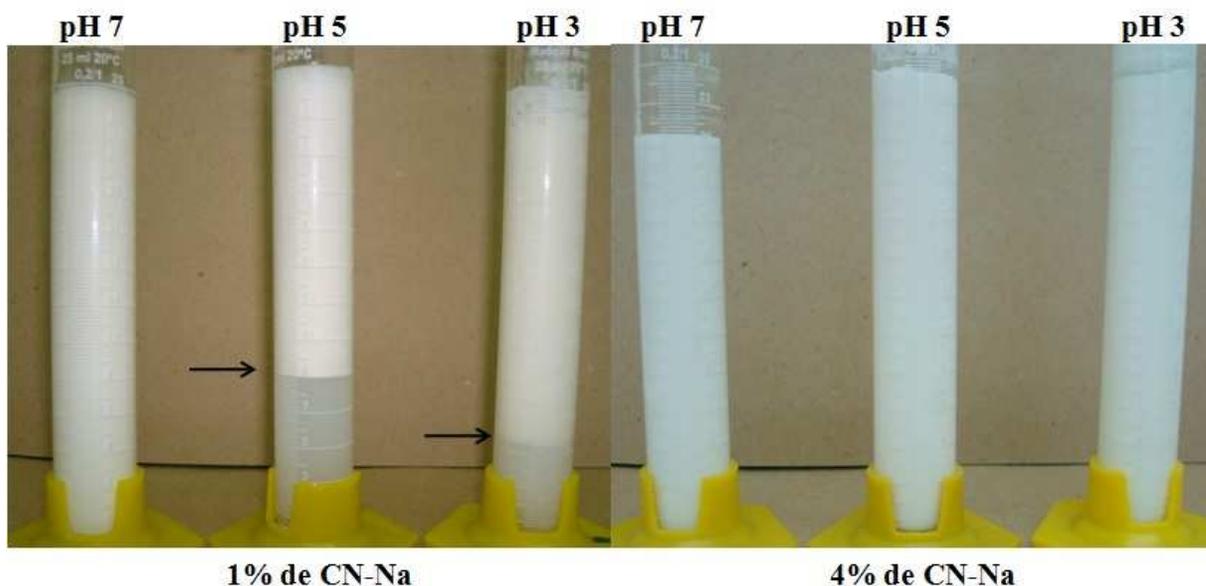
O mecanismo de desestabilização por floculação também ocorreu quando a emulsão com 1% de caseinato de sódio estava abaixo do pI. Apesar das gotas estarem carregadas positivamente

em pH 3, a repulsão eletrostática não foi suficientemente forte para superar as forças atrativas, ocorrendo a floculação e o aparecimento de uma fase inferior. Nesse pH também foi observada uma rede de gel, similar ao pH 5, porém menos pronunciada e que afetou menos o índice de cremação.

Já as emulsões em pH 7 não se desestabilizaram, permanecendo estáveis por 15 dias de estocagem. A maior estabilidade cinética dessas emulsões está associada à carga líquida negativa (pH acima do pI) que promoveu uma maior repulsão eletrostática, evitando a agregação das gotas, e assim a separação de fases.

**Tabela 4.4.** Índice de separação de fases (%) das emulsões estabilizadas por CN-Na após 15 dias de estocagem.

CN-Na	pH		
	3	5	7
1%	23,2	36,0	0
4%	0	0	0



**Figura 4.4.** Separação de fases das emulsões O/A após 15 dias de estocagem.

### 4.2.2. Composição química das fases

A Tabela 4.5 apresenta a composição química das fases separadas após 15 dias de estocagem das emulsões, condição em que estavam em equilíbrio (índice de separação de fases constante). Em pH 5, a fase superior apresentou maior razão proteína/óleo e óleo/água, assim como a fase inferior teve uma maior razão proteína/água. Contudo, não foi possível associar a estabilidade das emulsões com a razão emulsificante/componente predominante na fase como concluído por Perrechil (2008), já que para este caso o aumento das razões ocorreu em emulsões com o maior índice de cremeação, apesar da separação de fase em algumas destas emulsões terem ocorrido de forma mais lenta, como observado por Santana (2009).

**Tabela 4.5.** Composição química das fases separadas após 15 dias de estocagem das emulsões estabilizadas por 1% de CN-Na em pH 3 e 5.

pH	Fase Superior				
	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Razão proteína/óleo	Razão óleo/água
3	0,83 ± 0,1	60,20 ± 0,86	38,97 ± 0,87	0,02	0,65
5	1,3 ± 0,2	53,85 ± 0,70	44,83 ± 0,73	0,03	0,83
pH	Fase Inferior				
	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	10 <sup>3</sup> * Razão proteína/água	10 <sup>3</sup> * Razão óleo/água
3	0,47 ± 0,04	96,88 ± 1,29	2,65 ± 1,29	4,85	27,35
5	0,69 ± 0,07	97,68 ± 0,99	1,63 ± 0,99	7,06	16,69

### 4.2.3. Distribuição de tamanho de gotas e microscopia

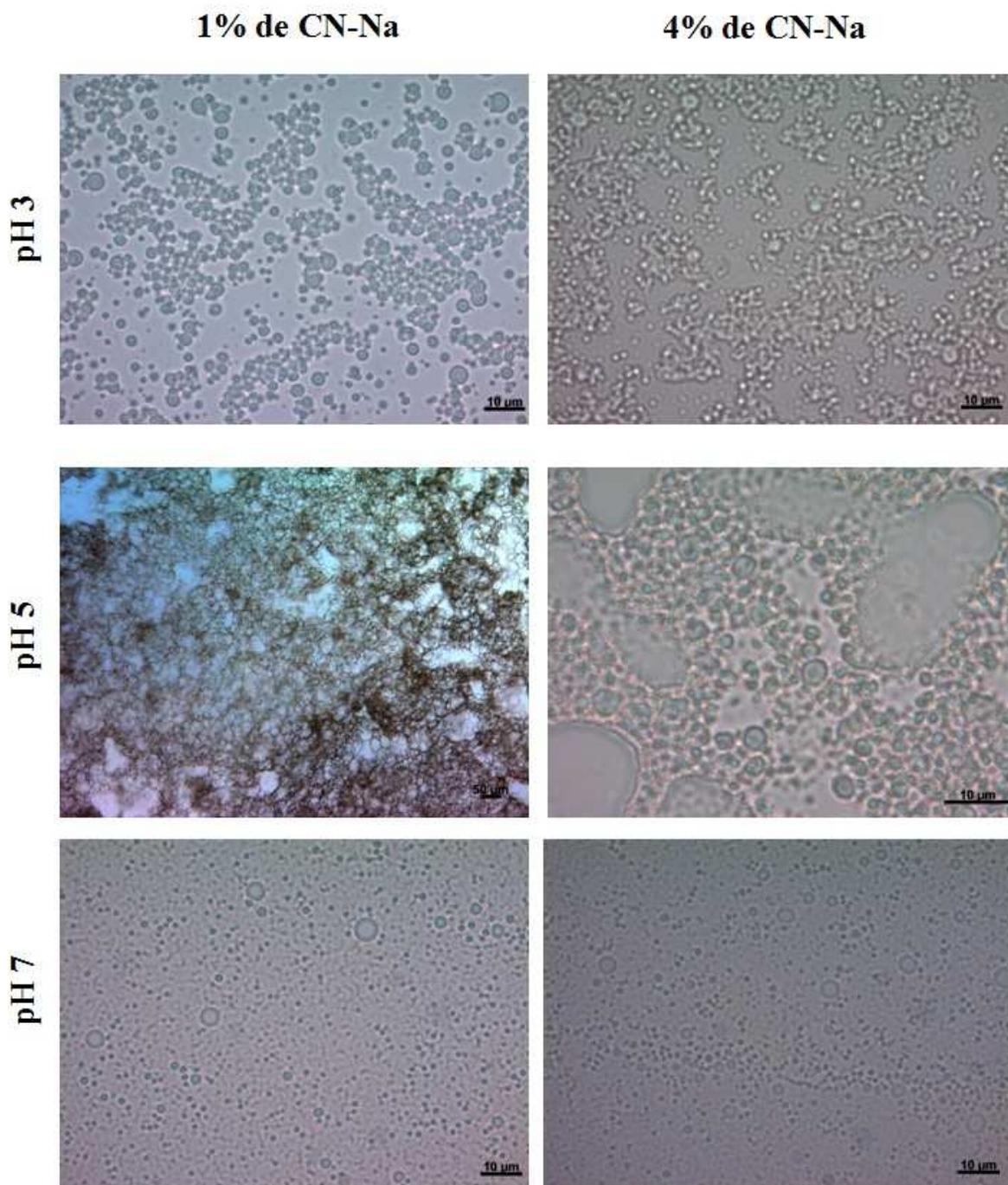
A distribuição de tamanho de gotas é um parâmetro muito importante para diversas propriedades das emulsões como, por exemplo, vida de prateleira, aparência, textura e aroma. Consequentemente, é fundamental que se possa controlar e medir com precisão o tamanho das gotas em emulsões (MCCLEMENTS, 2005). As microscopias (Figura 4.5) mostraram que as microestruturas das emulsões eram polidispersas, ou seja, apresentaram diferentes tamanhos de gotas e/ou agregados. A polidispersão foi mais pronunciada em pH 3 e 5 (Figura 4.5) condições

em que essas emulsões apresentaram estrutura bastante diferenciadas, com a formação de uma rede típica de gel, principalmente em pH 5, condição que a amostra encontra-se próxima ao pI da proteína. Assim, vale ressaltar que o diâmetro médio superficial das gotas, nessas condições de pH, pode estar mascarado devido aos clusters de proteína que poderiam se sobrepor as gotas de óleo.

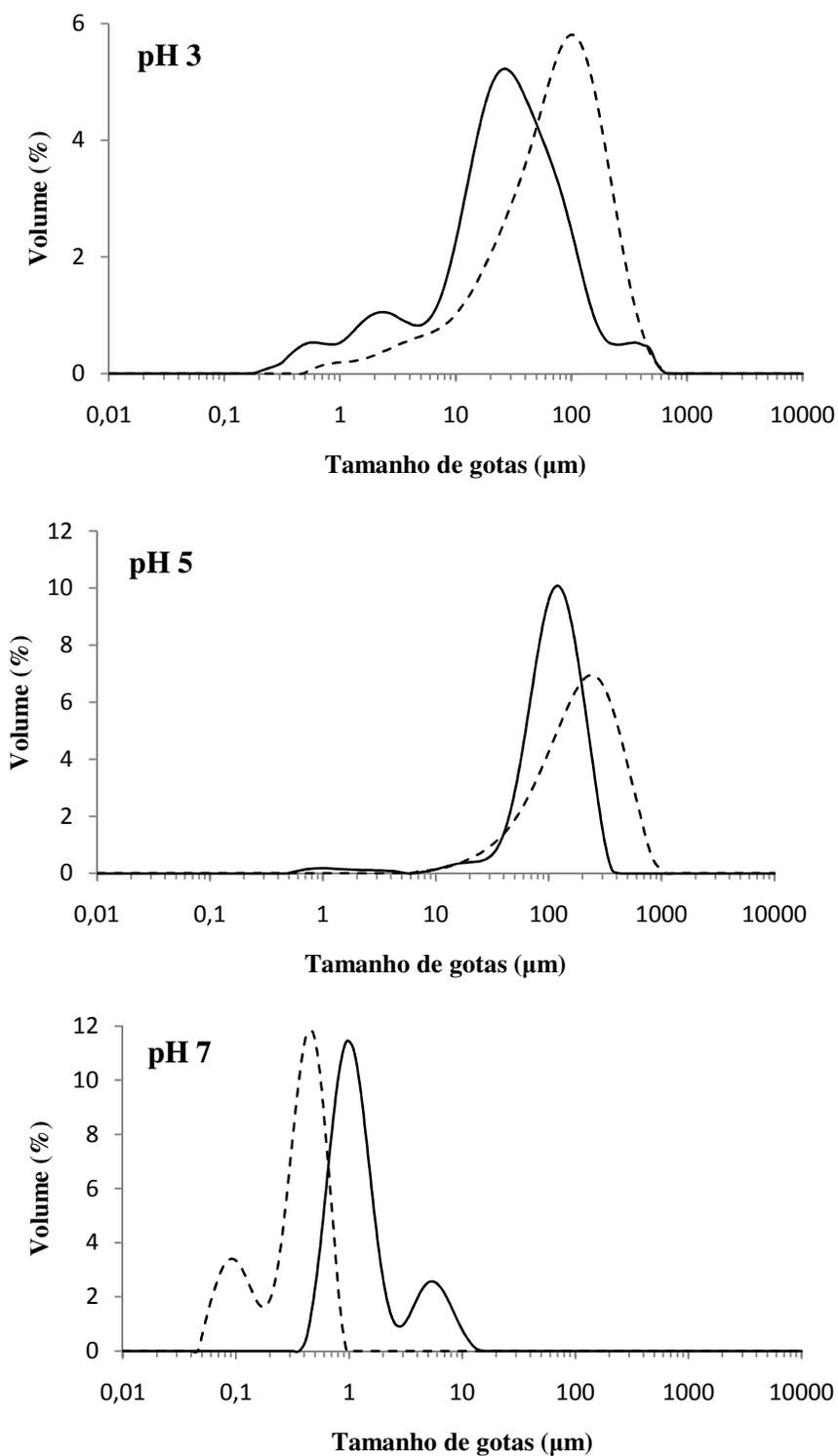
A Figura 4.6 mostra a polidispersão das gotas de todas as emulsões formadas. As emulsões em pH 3 apresentaram um volume elevado de gotas com diâmetro entre 10 - 60  $\mu\text{m}$  e 30 - 200  $\mu\text{m}$  para as emulsões com 1 e 4% caseinato de sódio, respectivamente. Além disso, a emulsão estabilizada com 1% de proteína não apresentou uma distribuição monomodal, com a formação de quatro picos, sendo os dois primeiros com diâmetro menor do que 5  $\mu\text{m}$  e o quarto pico com diâmetro de gotas maior do que 200  $\mu\text{m}$ . Esse resultado indica a formação de agregados de gotas, que ocasiona a desestabilização por floculação das emulsões, conforme observado nos resultados de índice de cremação, composição de fases e microscopia. O aparecimento desses picos com menor diâmetro pode estar associado a proteínas não adsorvidas que se agregaram, ocorrendo a floculação por depleção (DICKINSON, 2006).

Já em pH 5 as emulsões apresentaram um volume elevado de gotas com diâmetro entre 40 - 300  $\mu\text{m}$  e 40 - 500  $\mu\text{m}$  para as emulsões com 1 e 4% caseinato de sódio, respectivamente. Os maiores tamanhos de gotas em relação aos outros valores de pH podem estar associados à agregação das proteínas. A maior concentração de proteína levou a uma maior largura (span) ou polidispersão na curva de distribuição de tamanho, o que pode indicar a ocorrência de floculação por depleção devido ao excesso de caseinato de sódio.

Já as emulsões em pH 7 apresentaram distribuição bimodal, com volume elevado de gotas entre 0,4 - 2  $\mu\text{m}$  e 0,2 - 0,8  $\mu\text{m}$  para 1 e 4% caseinato de sódio, respectivamente, sendo que o aparecimento de outros picos pode estar associado à agregação das gotas ou de partículas de proteínas não adsorvidas. Contudo, esses diâmetros médios foram inferiores quando comparados aos valores em pH 3 e 5. O reduzido tamanho de gotas provoca redução na força de gravidade, o que inibe o processo de cremação ou sedimentação e pode prevenir o processo de floculação, evitando a separação de fases (TADROS et al, 2004).



**Figura 4.5.** Microestruturas das emulsões com 4% de CN-Na e da fase superior das emulsões com 1% de CN-Na após 7 dias de estocagem.



**Figura 4.6.** Distribuição do tamanho de gotas para as emulsões estabilizadas com 1% (—) e 4% (---) de caseinato de sódio em diferentes valores de pH (3, 5 e 7).

Perrechil (2008) verificou que macroemulsões contendo 30% de óleo (m/v) estabilizadas com 1% e 4% (m/m) de caseinato de sódio em pH neutro (pH 7) apresentaram diâmetro médio superficial de gotas de 14,41 e 10,74  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A produção de emulsões estabilizadas com proteína utilizando-se o sistema rotor-estator, usado no trabalho de Perrechil (2008), não viabiliza a formação de gotas com menores diâmetros, o que pode ser obtido com o uso de homogeneização a altas pressões. A Tabela 4.6 apresenta o tamanho médio superficial das gotas das emulsões obtidas através de homogeneização a alta pressão (600/50 bar). Os elevados diâmetros médios de gotas a pH 3 e 5 confirmam o observado nas micrografias da Figura 4.5. Comparando os valores de  $d_{32}$  obtidos por Perrechil (2008) com os do presente trabalho, pode-se verificar que houve uma considerável redução do tamanho médio das gotas das emulsões com o uso de alta pressão a pH 7. Como boa parte da energia adicionada no processo é dissipada na forma de calor, a menor energia usada no sistema rotor-estator comparada à alta pressão não fornece a energia livre necessária para criar uma grande área interfacial (ANTON et al., 2008) que seja capaz de reduzir o tamanho das gotas e conseqüentemente obter-se a estabilidade cinética da emulsão.

**Tabela 4.6.** Tamanho médio superficial das gotas  $d_{32}$  ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.

% proteína (m/m)	pH		
	3	5	7
1	6,14 $\pm$ 0,72	34,17 $\pm$ 2,95	1,10 $\pm$ 0,05
4	19,93 $\pm$ 1,27	106,93 $\pm$ 9,54	0,44 $\pm$ 0,04

#### 4.2.4. Reologia

Medidas reológicas para obtenção das curvas de escoamento foram realizadas para as emulsões que permaneceram estáveis e para a fase superior daquelas que apresentaram separação de fases (Figura 4.7). Como descrito anteriormente para as macroemulsões (item 4.1.3), as

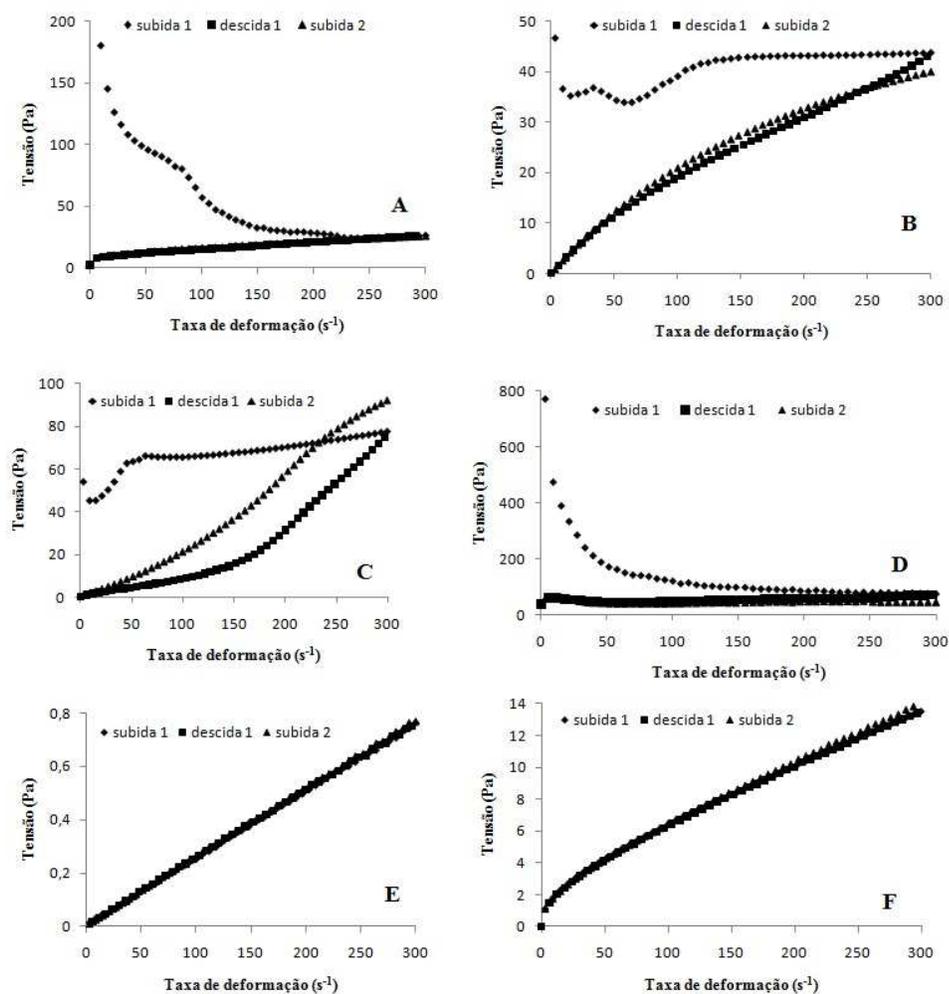
emulsões homogeneizadas a altas pressões foram submetidas a diferentes ciclos de tensão de cisalhamento (subida 1, descida e subida 2) para verificar comportamento dependente do tempo de cisalhamento. As emulsões em pH 3 e 5 apresentaram uma ruptura estrutural com a aplicação do cisalhamento, resultando na redução da viscosidade aparente entre a subida 1 e a descida, o que indica a presença de tixotropia. Essa quebra está associada à destruição da rede de gel formada nesses dois valores de pH. Emulsões que exibem esse tipo de comportamento muitas vezes contêm partículas que estão agregadas por interações fracas (MCCLEMENTS, 2005). Quando essas interações entre as partículas são rompidas pelo cisalhamento, ocorre a diminuição da resistência ao escoamento e assim a redução da viscosidade aparente (NORDE, 2003; MCCLEMENTS, 2005). Já as emulsões em pH 7 não apresentaram dependência em relação ao tempo de cisalhamento, ou seja, a viscosidade variou somente com a taxa de deformação e as três rampas mostraram sobreposição, diferentemente das macroemulsões tratadas nas mesmas condições. Esse comportamento independente do tempo de cisalhamento pode estar associado ao menor diâmetro superficial das gotas das emulsões submetidas à alta pressão de homogeneização em pH 7.

Eliminando a dependência do tempo, foram obtidas as curvas de escoamento em regime estacionário. Pela Figura 4.8 pode-se observar que, dentro do intervalo de taxa de cisalhamento estudado, a maior parte das emulsões apresentou comportamento de fluido pseudoplástico ( $n < 1$ ). No entanto, as emulsões com 1% de proteína em pH 7 comportaram-se como fluido Newtoniano e em pH 5 como fluido dilatante ( $n > 1$ ), como observado na microscopia (Figura 4.5) pela estrutura diferenciada. As emulsões com comportamento pseudoplástico foram ajustadas ao modelo Lei da Potência (Equação 4) apresentando coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior que 0,99, sendo os parâmetros apresentados na Tabela 4.7, juntamente com a viscosidade aparente ( $\eta_{100}$ ) a  $100 \text{ s}^{-1}$ .

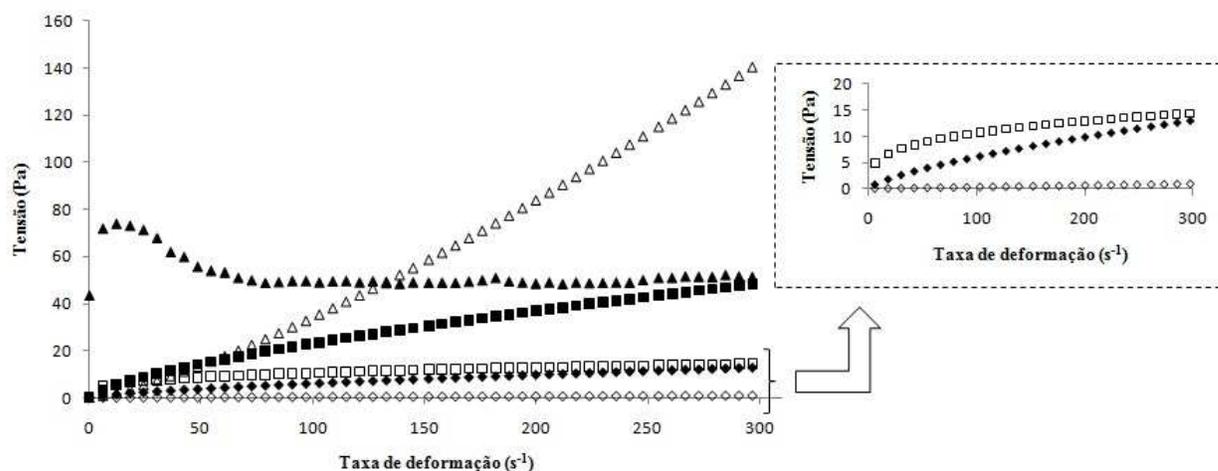
Esse tipo de comportamento pseudoplástico é o mais comum para a maioria das emulsões alimentícias. A pseudoplasticidade pode ocorrer por uma variedade de razões como, por exemplo, alteração da distribuição espacial das gotas devido à aplicação de cisalhamento, alinhamento de gotas não esféricas, remoção de moléculas de solventes ligados às gotas ou deformação e

rompimento dos flocos (HUNTER, 1993; MEWIS & MACOSKO, 1994; NEWSTEIN et al., 1999).

Já em pH 5, próximo ao ponto isoelétrico do caseinato de sódio, a emulsão estabilizada com 4% de proteína apresentou comportamento reológico de fluido complexo com tensão residual (PERRECHIL & CUNHA, 2010), não sendo possível o ajuste a um modelo reológico, devido à formação de uma rede de gel.



**Figura 4.7.** Curvas de escoamento das emulsões O/A para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com (A) 1% de CN-Na em pH 3 (fase superior), (B) 4% de CN-Na em pH 3, (C) 1% de CN-Na em pH 5 (fase superior), (D) 4% de CN-Na em pH 5, (E) 1% de CN-Na em pH 7 e (F) 4% de CN-Na em pH 7.



**Figura 4.8.** Curvas de escoamento em estado estacionário das emulsões O/A. pH: (□) 3, (Δ) 5 e (◇) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados. Com 1% de CN-Na em pH 3 e 5 está apresentado o comportamento da fase superior.

As emulsões homogeneizadas a alta pressão (600 bar), que apresentaram comportamento pseudoplástico, tiveram uma redução no índice de consistência ( $k$ ) e na viscosidade aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$  quando comparadas às macroemulsões estudadas anteriormente. Este comportamento é explicado pela estrutura das emulsões, que passaram a apresentar menores diâmetros de gota com o uso da homogeneização ou elevada energia mecânica (SANTANA et al., 2011).

Para as emulsões que apresentaram separação de fases, também foram obtidas curvas de escoamento em estado estacionário para a fase inferior (Tabela 4.7). As curvas de escoamento também foram ajustadas ao modelo Lei da Potência assim como a fase inferior das macroemulsões, apresentando semelhanças com os parâmetros ajustados anteriormente (Tabela 4.3). A pseudoplasticidade é explicada pela quantidade de proteína na fase inferior que interage com a água (Tabela 4.5).

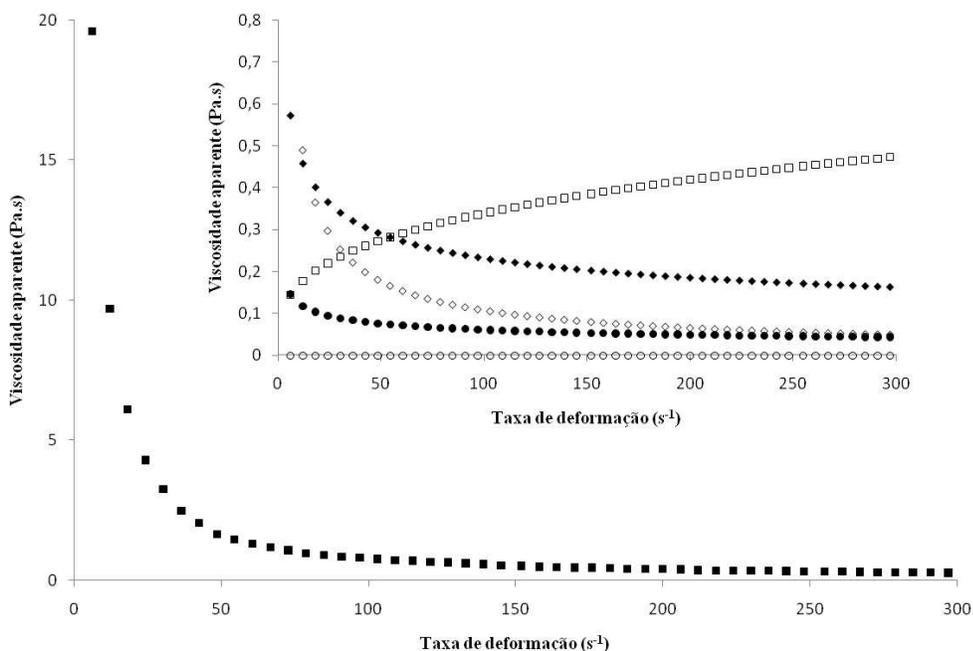
A Figura 4.9 ilustra o perfil de comportamento da viscosidade aparente com a taxa de deformação aplicada. Pode-se observar que o aumento da concentração de proteína ocasionou no aumento da viscosidade aparente, ocasionando no aumento da estabilidade das emulsões por efeito estérico. Para as condições de pH próximo e abaixo do pI (pH 5 e 3), quando houve a formação de uma emulsão tipo gel, a viscosidade aparente foi muito superior a das emulsões em

pH acima do pI (pH 7) (Tabela 4.7). O aumento da viscosidade está associado ao mecanismo de floculação, que é confirmado pelo maior diâmetro das gotas e pelo comportamento pseudoplástico das emulsões. Eliot & Dickinson (2003) verificaram que a redução do pH de 7 para 5,8 em emulsões estabilizadas por caseinato de sódio levou à redução da força de interação (floculação) entre as gotas e como consequência uma mudança no comportamento reológico das emulsões, de pseudoplástico para Newtoniano. No entanto, a acidificação abaixo de pH 5,5 levou à refloculação da emulsão e à agregação das gotas. O mecanismo de desestabilização por floculação é induzido pela redução do pH para o ponto isoelétrico, que leva à redução da densidade de carga da superfície da gota e, assim, à perda da estabilização eletrostática (DICKINSON, 2006). Contudo, é importante ressaltar que para as emulsões estabilizadas com 1% de caseinato de sódio, que apresentaram separação de fases, a viscosidade aparente em pH 3 e 5 foi obtida somente da fase creme superior.

**Tabela 4.7.** Efeito da concentração de proteína e do pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.

Proteína (% m/m)	pH	Fase superior			Fase inferior		
		k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\eta_{100}$ (Pa.s)	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\eta_{100}$ (mPa.s)
1	3	2,95 <sup>Aa</sup>	0,28 <sup>Aa</sup>	0,11 <sup>Aa</sup>	0,0021 <sup>A</sup>	0,87 <sup>A</sup>	1,14 <sup>A</sup>
	5	0,08 <sup>B</sup>	1,28 <sup>B</sup>	0,27 <sup>Ba</sup>	0,0017 <sup>A</sup>	0,89 <sup>A</sup>	1,00 <sup>B</sup>
	7	0,003	1	0,003 <sup>Ca</sup>	-	-	-
4	3	1,03 <sup>Ab</sup>	0,68 <sup>Ab</sup>	0,23 <sup>Ab</sup>	-	-	-
	5	-	-	0,63 <sup>Bb</sup>	-	-	-
	7	0,26 <sup>B</sup>	0,69 <sup>A</sup>	0,06 <sup>Cb</sup>	-	-	-

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas: diferenças entre os valores de pH para uma mesma concentração de proteína. Letras minúsculas: diferenças entre concentrações de proteína para um valor de pH fixo.



**Figura 4.9.** Efeito da concentração de proteína e do pH na viscosidade aparente das emulsões homogêneas. pH: (◇) 3, (◻) 5 e (○) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados. Com 1% de CN-Na e pH 3 ou 5 está apresentado a viscosidade da fase superior.

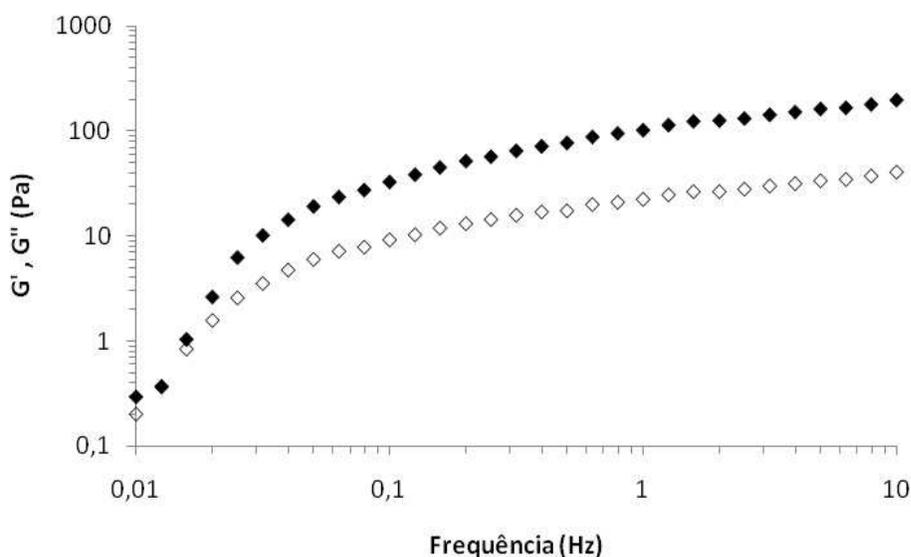
As medidas reológicas dinâmicas das emulsões estão apresentadas nas Figuras 4.10 e 4.11, sendo que o módulo de armazenamento ou elástico ( $G'$ ) foi maior que o módulo de dissipação ou viscoso ( $G''$ ) em função da frequência para todas as condições estudadas, indicando um comportamento de um sistema mais estruturado. A Figura 4.10 apresenta o comportamento da emulsão estabilizada com 4% de caseinato de sódio em pH 7, a qual representa o comportamento típico das outras emulsões estudadas.

Em pH 7, o módulo elástico ( $G'$ ) e o módulo viscoso ( $G''$ ) se cruzaram em aproximadamente 0,02 Hz, mas a partir desse ponto o  $G'$  foi maior do que o  $G''$ . Santana et al. (2011) verificaram que emulsões estabilizadas com fibra de colágeno a altas pressões de homogeneização apresentaram comportamento de solução concentrada (gel) com o módulo elástico maior do que o módulo viscoso. Esse mesmo comportamento também foi observado nas macroemulsões estabilizadas por caseinato de sódio, estudadas por Perrechil & Cunha (2010). As curvas de  $G'$  e  $G''$  em função da frequência referentes às outras amostras estão apresentadas no

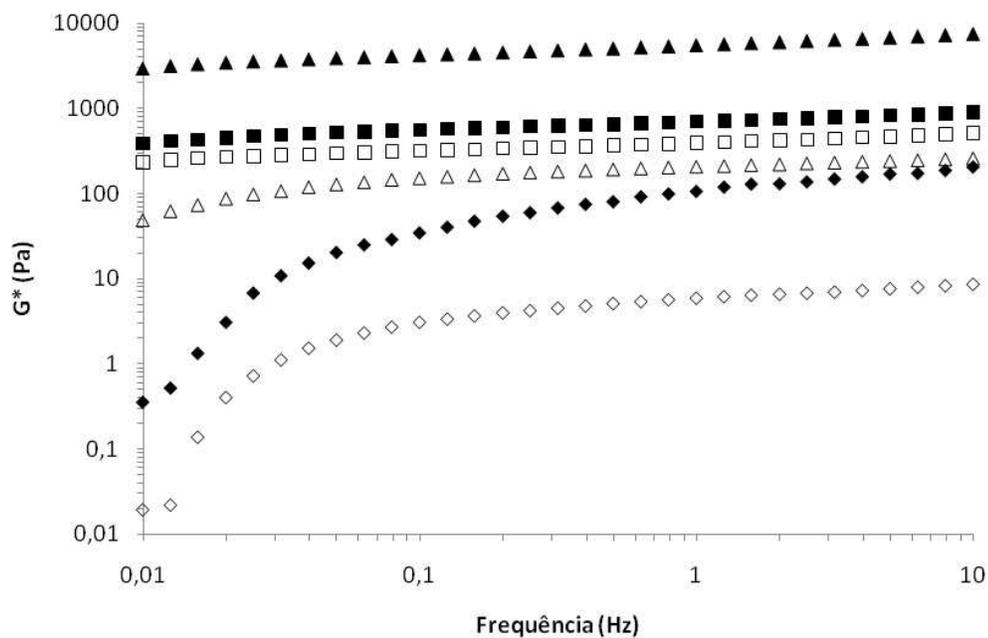
Anexo 1, sendo que o módulo elástico foi cerca de 10 vezes maior do que o módulo viscoso, indicando que as emulsões apresentaram comportamento de solução concentrada (gel).

Os valores de módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões em pH 3 e 5 não apresentaram dependência em relação à frequência (Figura 4.11), sendo que a maior concentração de proteína levou à formação de uma estrutura mais rígida e mais estável, como observado no ensaio de estabilidade e viscosidade. Perrechil & Cunha (2010) também concluíram que a redução do pH para valores próximos ao pI levou à formação de macroemulsões de caseinato de sódio mais estruturadas, comportando-se como uma rede de gel. Já para as emulsões com 1% de caseinato de sódio, que apresentaram separação de fases, os valores de  $G^*$  tenderam a ser menores, apesar de não serem dependentes da frequência.

As emulsões em pH 7 apresentaram valores de módulo complexo dependentes da frequência, sendo que o  $G^*$  aumentou com o aumento da frequência aplicada (Figura 4.11). Esse comportamento de solução mais diluída está associado à menor viscosidade e menor tamanho médio de gotas das emulsões.



**Figura 4.10.** Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsão estabilizada com 4% de CN-Na em pH 7. Módulo elástico  $G'$  (◆) e módulo viscoso  $G''$  (◇).



**Figura 4.11.** Influência da concentração de proteína e do pH no módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões O/A. pH: (□) 3, (△) 5 e (◇) 7. Concentração de proteína: 1% símbolos abertos e 4% símbolos fechados. Com 1% de CN-Na e pH 3 ou 5 está apresentado o comportamento da fase superior.

**Parte 3. Emulsões estabilizadas por caseinato de sódio: efeito do ácido ferúlico e da lacase na estabilidade**

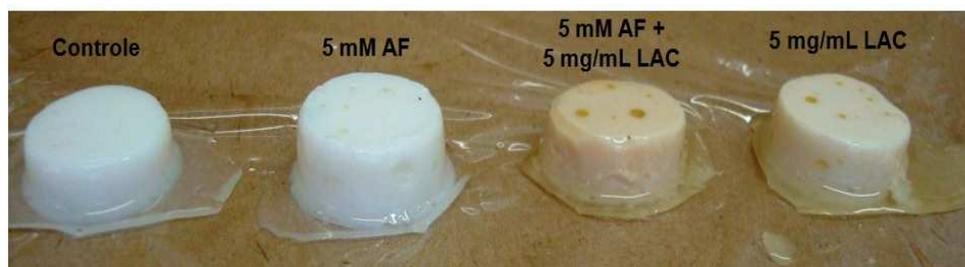


### 4.3. Determinação da concentração de ácido ferúlico e lacase para aplicação nas emulsões

Foram realizados ensaios de gelificação do caseinato de sódio na presença de ácido ferúlico e lacase, para verificar a capacidade desta enzima de promover ligações covalentes nas moléculas de proteína. As propriedades dos géis obtidos em concentração de caseinato de sódio fixa (4% m/m), variando-se a concentração de ácido ferúlico (1, 5 e 10 mM) e enzima (1, 5 e 10 mg/mL) são apresentadas abaixo.

#### 4.3.1. Propriedades mecânicas

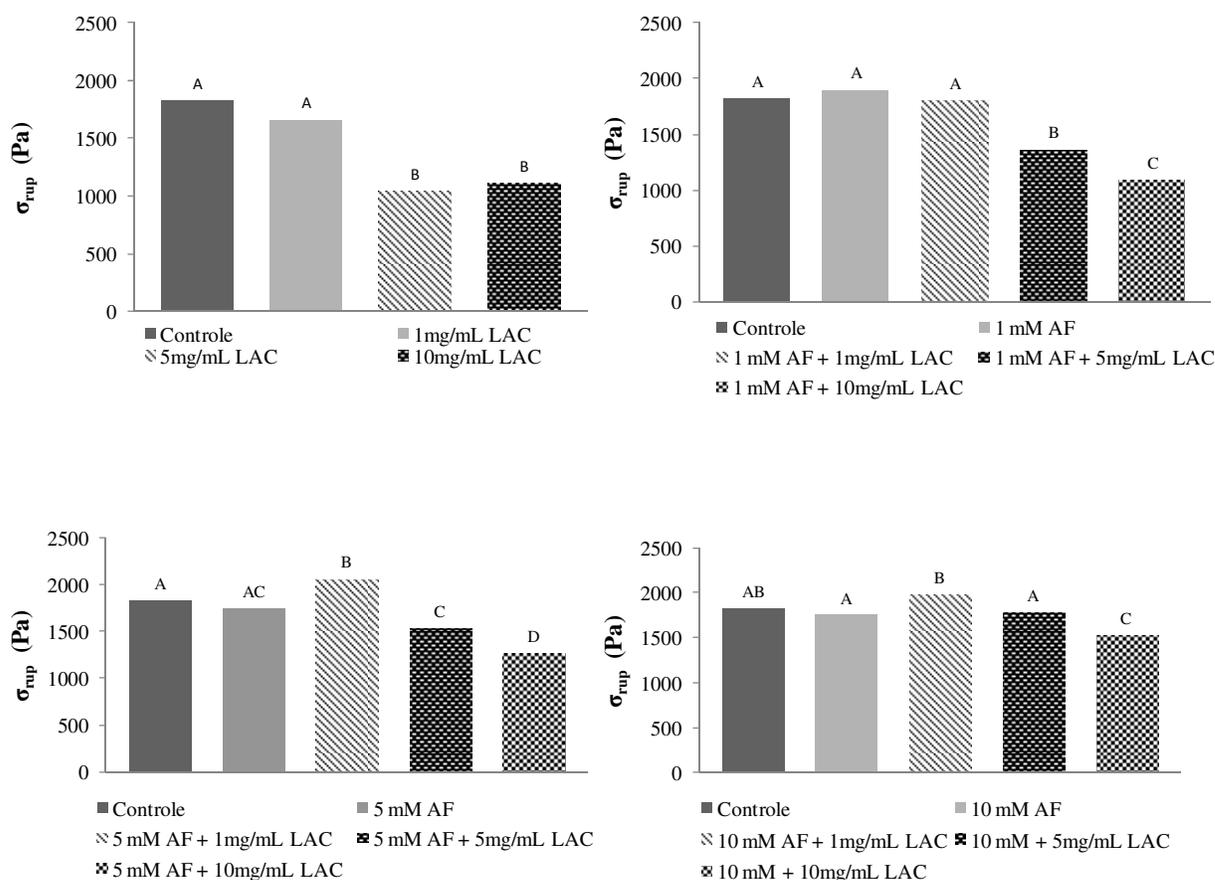
Todas as dispersões estudadas apresentaram um pH em torno de 4,9 (próximo ao pI do caseinato de sódio), depois de 24 horas de estocagem a temperatura ambiente com uma razão GDL e caseinato de 0,115 (CAVALLIERI & CUNHA, 2008). Todas as dispersões formaram géis auto-sustentáveis porém apresentaram liberação de água (sinerese), conforme observado na Figura 4.12. Além disso, a adição de lacase tornou os géis mais particulados, ou seja, a rede de gel foi menos homogênea. Através da avaliação da tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade dos géis pode-se entender a funcionalidade do ácido ferúlico e da lacase na dureza, deformabilidade e firmeza dos géis formados. Tais propriedades podem ser relacionadas às alterações na estrutura da rede de caseinato pela presença de ácido ferúlico (AF) e/ou lacase (LAC). Assim, a análise de tensão na ruptura foi usada como indicador de dureza, o módulo de elasticidade como indicador da resistência e a deformação de ruptura como fragilidade (KOHYAMA & NISHINARI, 1993) dos géis de caseinato de sódio.



**Figura 4.12.** Aspecto visual da adição de ácido ferúlico e lacase nos géis de caseinato de sódio.

#### 4.3.1.1. Efeito da concentração de lacase

A adição de diferentes concentrações de lacase nos géis de caseinato de sódio foi avaliada através das propriedades mecânicas. Para todas as concentrações de ácido ferúlico estudadas (1, 5 e 10 mM) houve uma tendência de diminuição da tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) com o aumento da concentração de lacase (1, 5 e 10 mg/mL), como pode ser observado na Figura 4.13. A adição de lacase em concentração maior do que 5 mg/mL afetou significativamente a tensão de ruptura quando comparado ao sistema formado apenas por caseinato de sódio (controle), tornando o gel menos rígido. O aumento da fragilidade dos géis com o aumento na concentração da lacase pode ser explicado pela intensificação da ruptura da proteína com maior teor de enzima (LANTTO et al., 2005). Este efeito também foi observado em massa de pão de trigo que ficou mais macia a altas concentrações de lacase (SELINHEIMO et al., 2006). Além disso, através da Figura 4.12 observa-se que a presença da lacase tornou os géis mais particulados, o que pode indicar uma agregação desordenada. Por outro lado, a adição de 1 mg/mL de lacase favoreceu a formação de um gel mais rígido, apresentando maior tensão de ruptura, desde que a concentração de ácido ferúlico fosse maior ou igual que 5 mM de ácido ferúlico. A mudança nas propriedades de textura dos géis de caseinato de sódio está associada à reticulação promovida pela ação da lacase (CURA et al., 2009).

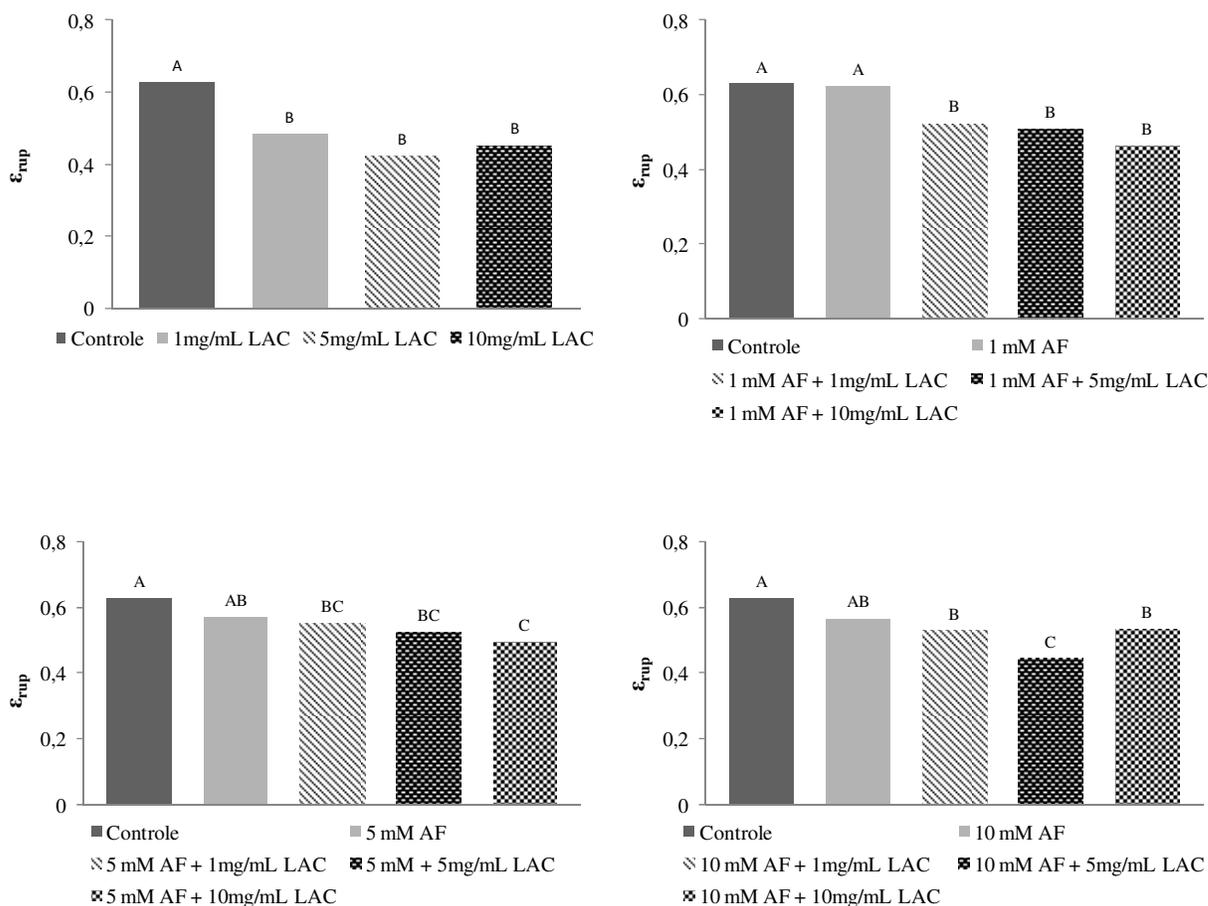


**Figura 4.13.** Tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.

A Figura 4.14 apresenta o efeito da lacase na deformação de ruptura ( $\epsilon_{rup}$ ) dos géis. A deformação na ruptura dos géis está relacionada à variação de altura que a amostra suporta antes de se romper, ou à deformabilidade dos géis. Para todas as concentrações do composto fenólico estudadas, a deformação na ruptura tendeu a diminuir com o aumento da concentração de lacase, ou seja, os géis tornaram-se menos deformáveis, exceto com a concentração de 10 mM de ácido ferúlico. Porém, somente o uso da lacase afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) a deformação na ruptura quando comparado ao gel controle (caseinato de sódio).

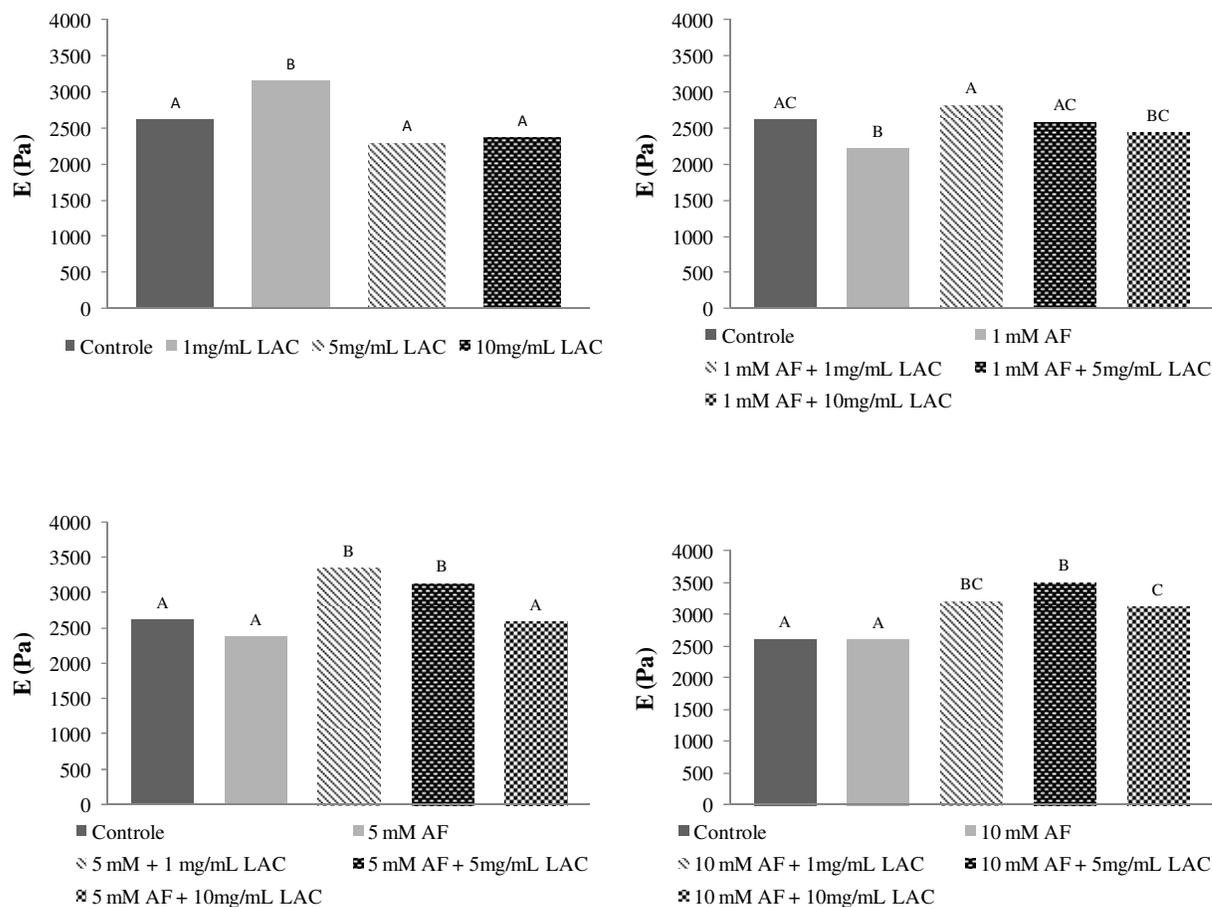
Macedo et al. (2010) estudaram o efeito da enzima transglutaminase em géis ácidos de caseinato de sódio e verificaram que o uso dessa enzima resultou no aumento tanto da tensão

quanto na deformação de ruptura, o que não foi constatado neste trabalho. Assim, o uso da lacase, em maiores concentrações, tornou o gel mais macio (menor tensão na ruptura) e menos deformável (menor deformação na ruptura), comprovando a mudança na estrutura causada pela enzima. Isso pode estar relacionado à presença de atividade proteolítica na lacase que altera a estrutura do gel neutralizando o efeito de ligações covalentes formadas pela enzima (CURA et al. 2009).



**Figura 4.14.** Deformação na ruptura ( $\epsilon_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.

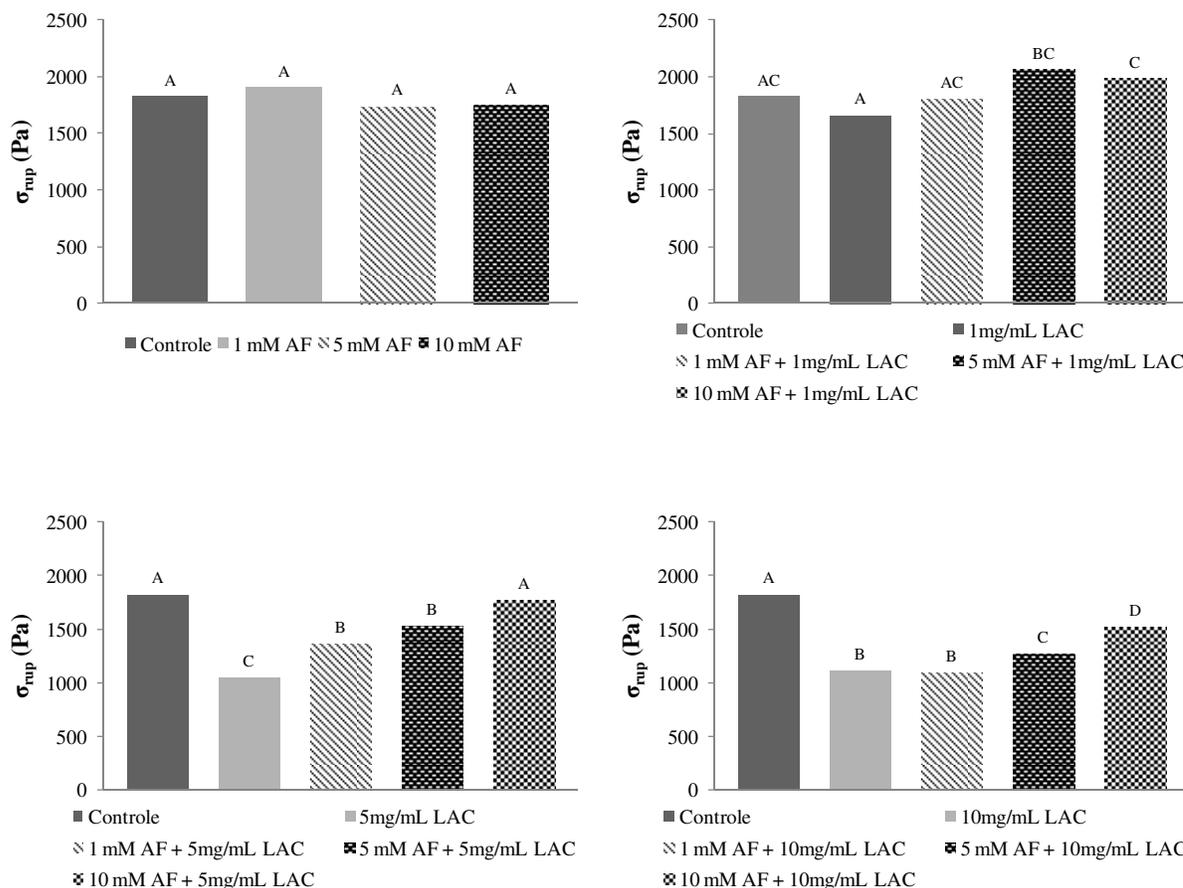
Os módulos de elasticidade (E) foram determinados a partir dos dados iniciais de tensão e deformação na ruptura, até 5 % de deformação, mostrados na Figura 4.15. De maneira geral, o aumento na concentração de enzima tendeu a diminuir o módulo de elasticidade dos géis na presença de ácido ferúlico, devido à formação de um gel mais particulado. Assim, o uso da enzima deve estar associado ao ácido ferúlico, visto que o uso deste mediador melhora as propriedades mecânicas dos géis de caseinato de sódio. Desta forma, o efeito do ácido ferúlico e da lacase na formação de géis foi estudado para determinar a melhor relação de mediador e enzima para a obtenção das emulsões tratadas enzimaticamente.



**Figura 4.15.** Módulo de elasticidade (E) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.

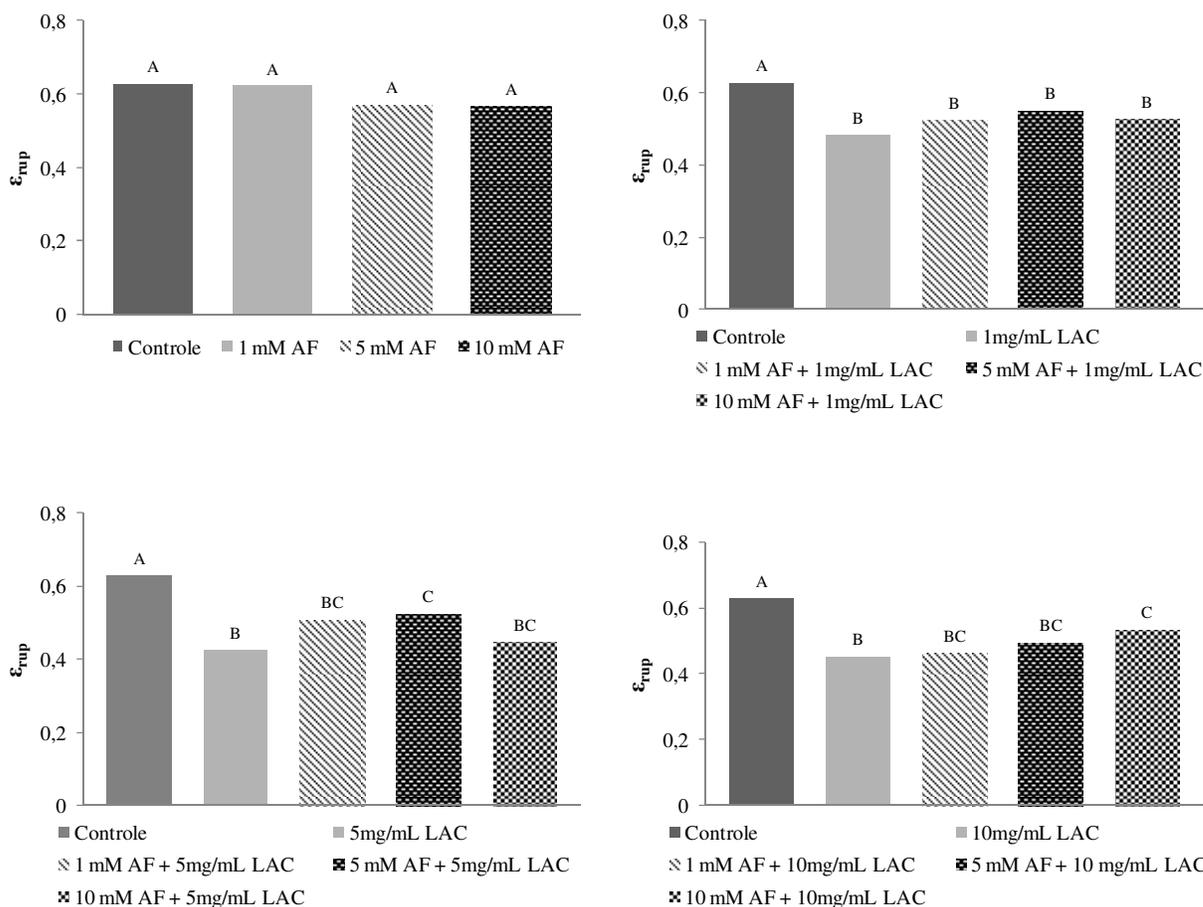
### 4.3.1.2. Efeito da concentração de ácido ferúlico

A adição de diferentes concentrações de ácido ferúlico nos géis de caseinato de sódio também foi avaliada através das propriedades mecânicas. O acréscimo somente do ácido ferúlico não afetou a tensão de ruptura quando comparado ao gel formado apenas por caseinato (Figura 4.16). No entanto, o efeito do ácido ferúlico é positivo na presença da lacase, pois ocorre o aumento da dureza dos géis. Alguns estudos têm mostrado que o uso de ácido ferúlico como mediador da reação de oxidação da lacase melhora a formação de ligações covalentes em caseínas,  $\beta$ -lactoglobulina e tirosina (SELINHEIMO et al., 2008; STEFFENSEN et al., 2008; MATTINEN et al., 2005).

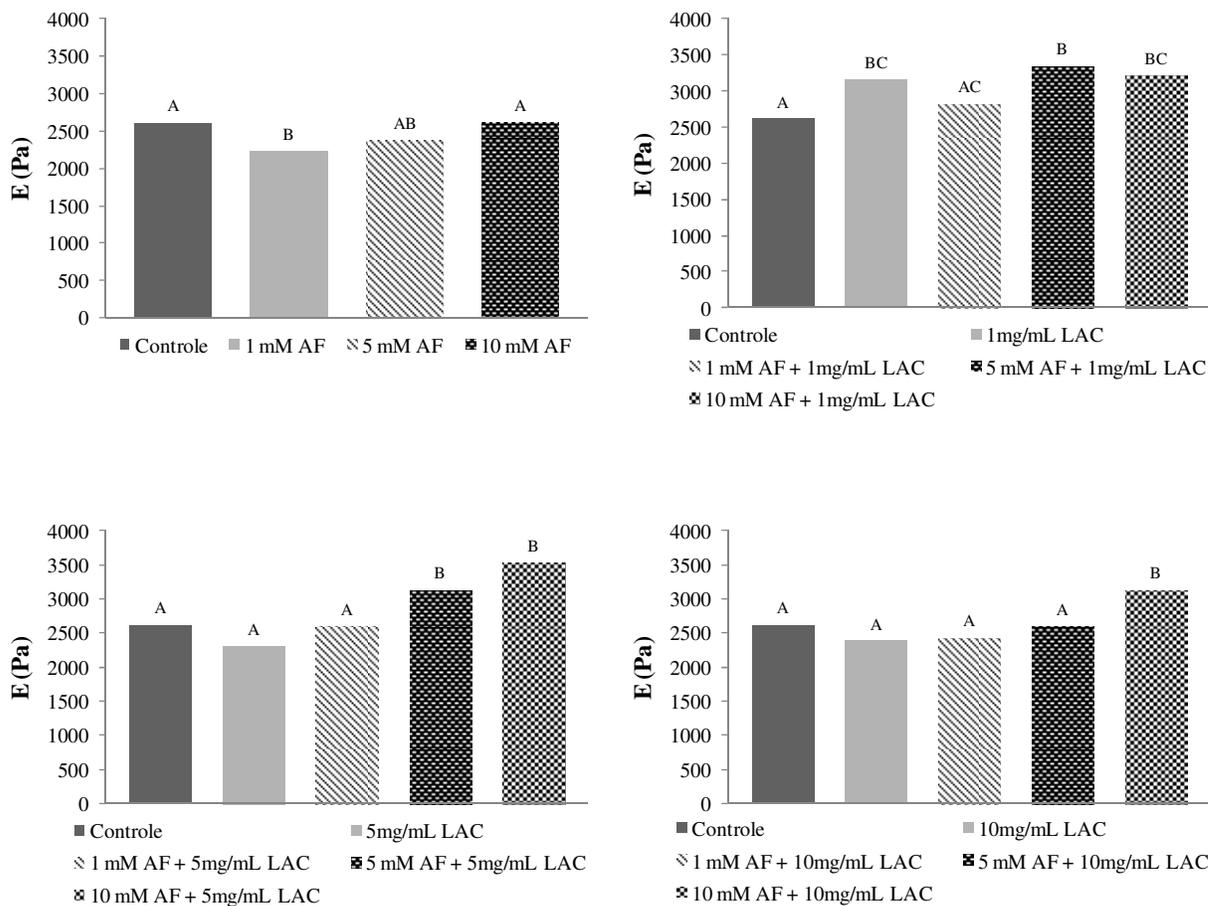


**Figura 4.16.** Tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.

O uso do ácido ferúlico não afetou significativamente a deformação de ruptura quando comparado ao gel formado apenas por caseinato de sódio (Figura 4.17). Já para o módulo de elasticidade (E) pode-se observar que, de maneira geral, a adição de enzima promoveu a formação de géis com maior firmeza, com o aumento da concentração de ácido ferúlico, exceto para a condição de 1 mg/mL de lacase (Figura 4.18). Assim, o que se pode concluir sobre a adição de enzima em géis de caseinato de sódio é que o efeito da lacase é mais pronunciado e positivo na presença de ácido ferúlico, mediador necessário na reação de oxidação para formação de ligações cruzadas covalentes. Cura et al. (2009) concluíram que o aumento na concentração de lacase e a presença de ácido ferúlico aumentaram a extensão das ligações cruzadas em géis de caseinato, levando à formação de géis mais firmes.



**Figura 4.17.** Deformação na ruptura ( $\epsilon_{rup}$ ) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.



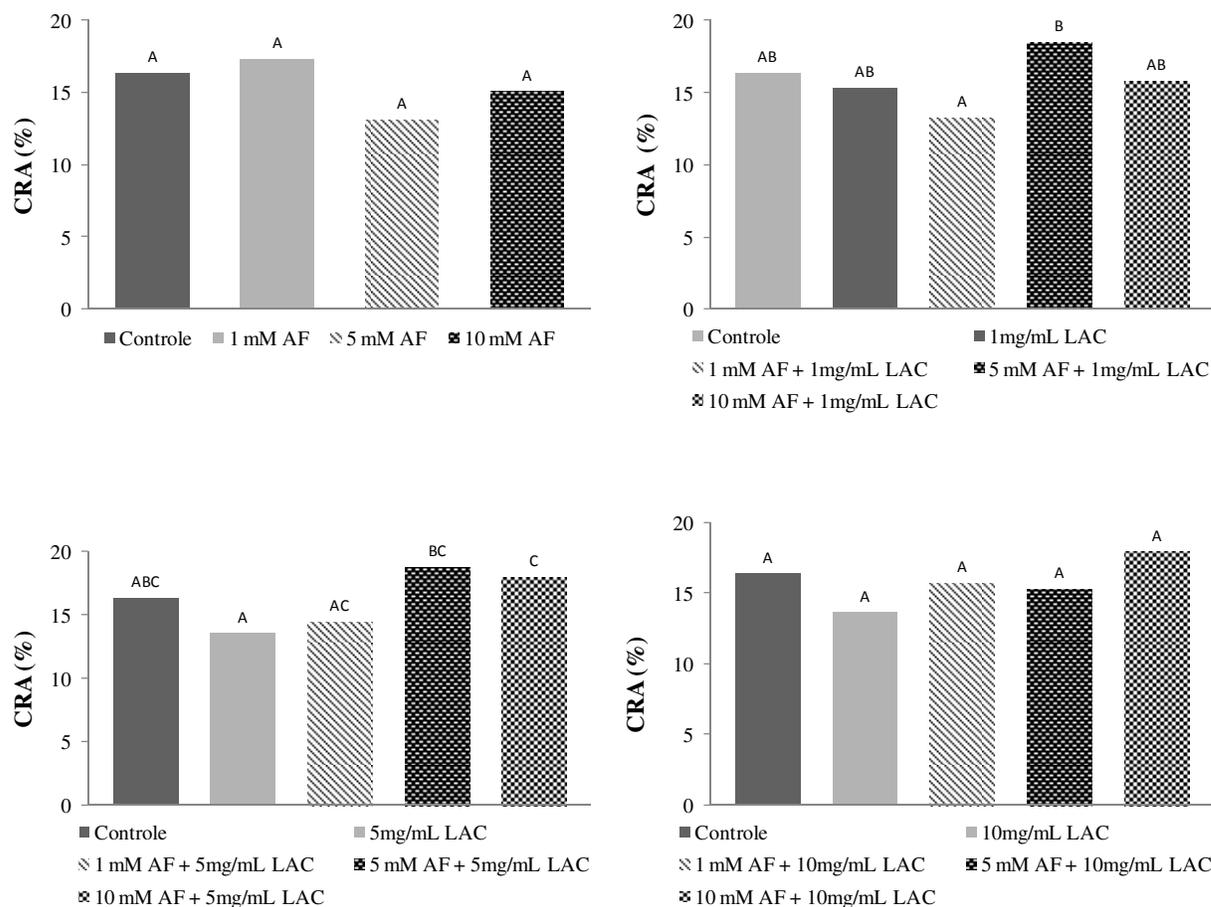
**Figura 4.18.** Módulo de elasticidade (E) de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.

Desta forma, foram escolhidas as condições que formaram géis mais fortes e resistentes com o objetivo de produzir, a partir das concentrações escolhidas de ácido ferúlico e lacase, emulsões mais estáveis. Logo, a relação de 5 mM de ácido ferúlico e 1 mg/mL de lacase e 10 mM ácido ferúlico e 5 mg/mL de lacase foram estabelecidas.

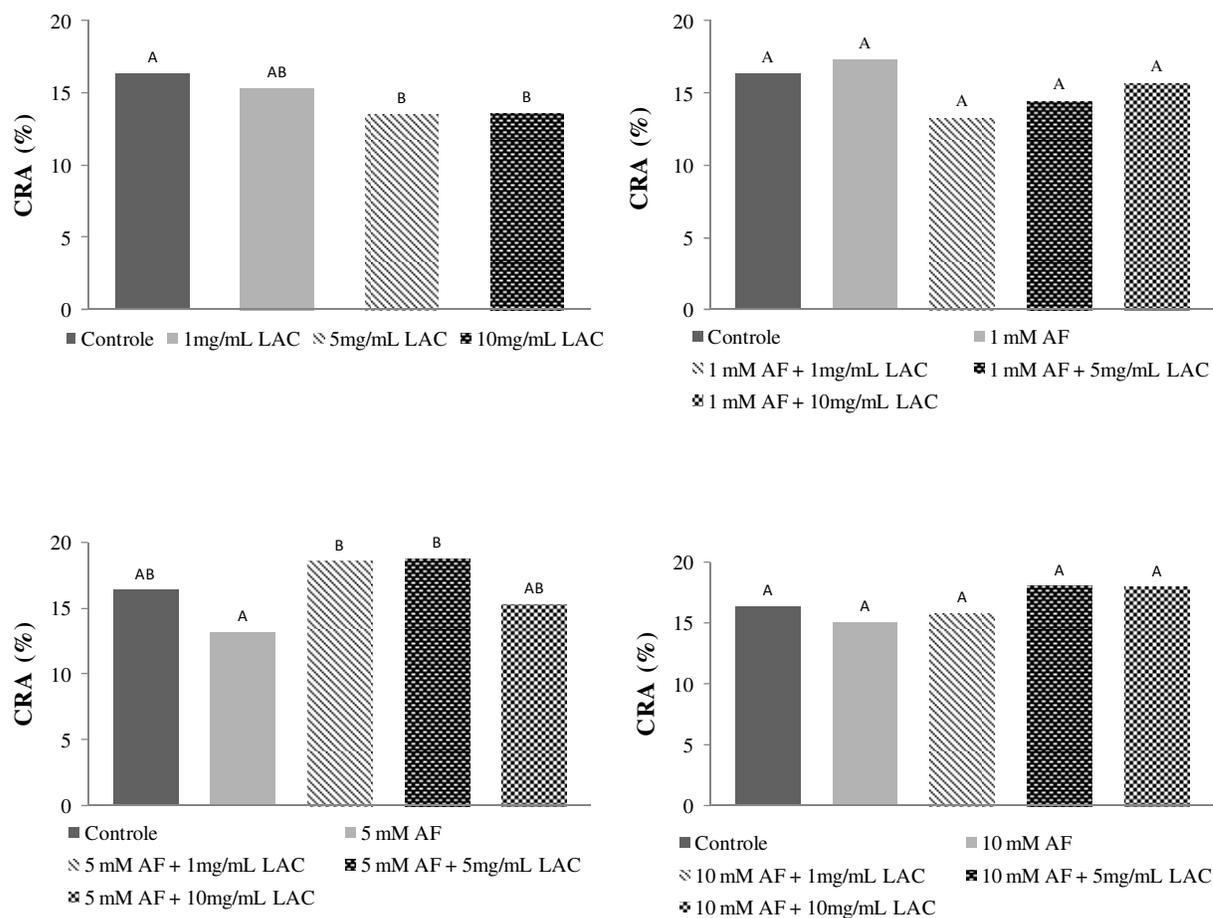
### 4.3.2. Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água é uma propriedade relacionada à estrutura da rede dos géis, sendo uma característica que influencia na aceitação dos produtos pelos consumidores. Os resultados de capacidade de retenção de água dos géis de caseinato de sódio, para verificar o efeito do ácido ferúlico e da lacase, estão apresentados nas Figuras 4.19 e 4.20.

A adição de ácido ferúlico ou lacase não afetou a capacidade de retenção de água dos géis formados ( $p < 0,05$ ). No entanto, utilização conjunta do composto fenólico e da enzima promoveu um pequeno aumento da capacidade de retenção de água, como observado nos sistemas: 5 mM de ácido ferúlico e 1 mg/mL de lacase e 10 mM de ácido ferúlico e 5 mg/mL de lacase, que também apresentaram melhores propriedades mecânicas.



**Figura 4.19.** Efeito do ácido ferúlico na capacidade de retenção de água de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.



**Figura 4.20.** Efeito da lacase na capacidade de retenção de água de géis de caseinato de sódio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 95% de confiança.

#### 4.4. Emulsões homogeneizadas e tratadas enzimaticamente

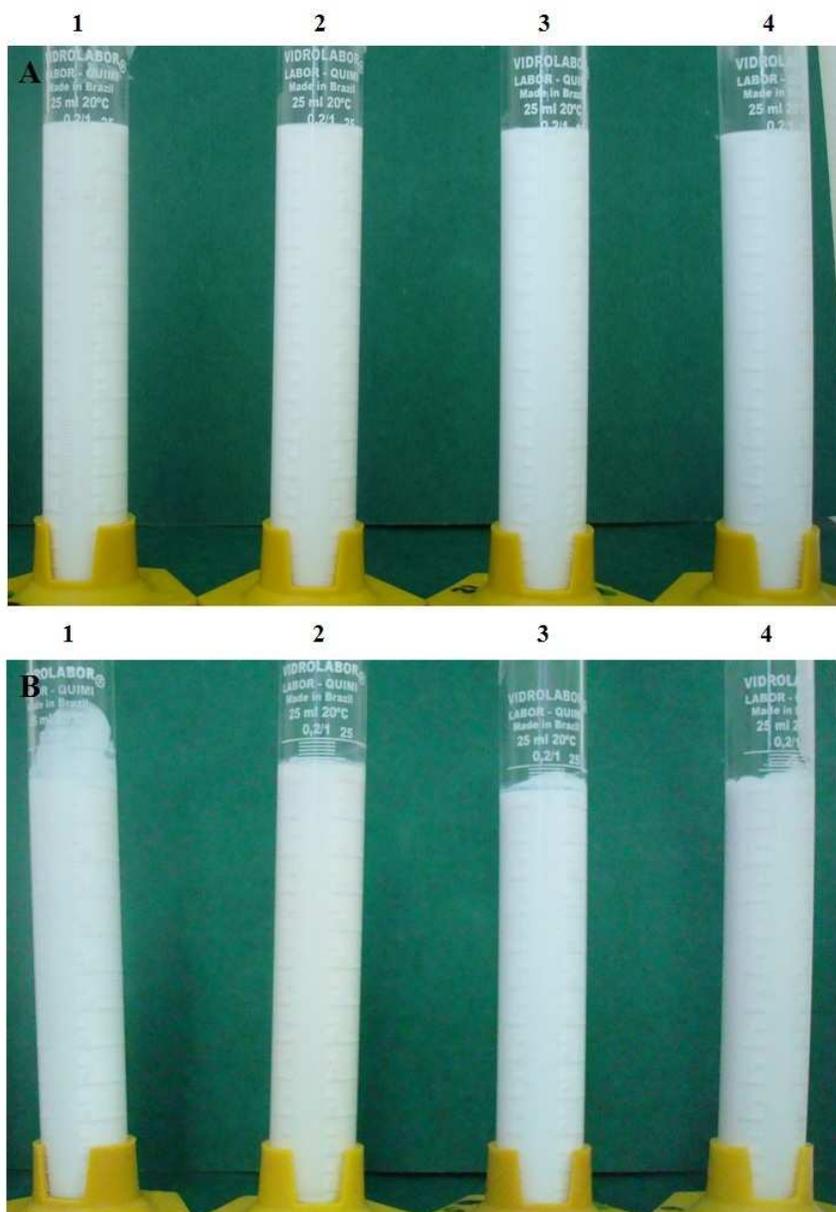
Antes da formação das emulsões, a solução de caseinato de sódio foi tratada enzimaticamente com diferentes concentrações de ácido ferúlico (AF) e de lacase (LAC). O pH das soluções de proteína foi ajustado para 3, 5 e 7. As propriedades das macroemulsões (seção 3.4.2) e emulsões secundárias obtidas após processo de homogeneização a altas pressões (seção 3.4.2), com adição de caseinato de sódio tratado enzimaticamente, são apresentados a seguir.

##### 4.4.1. Estabilidade à separação de fases

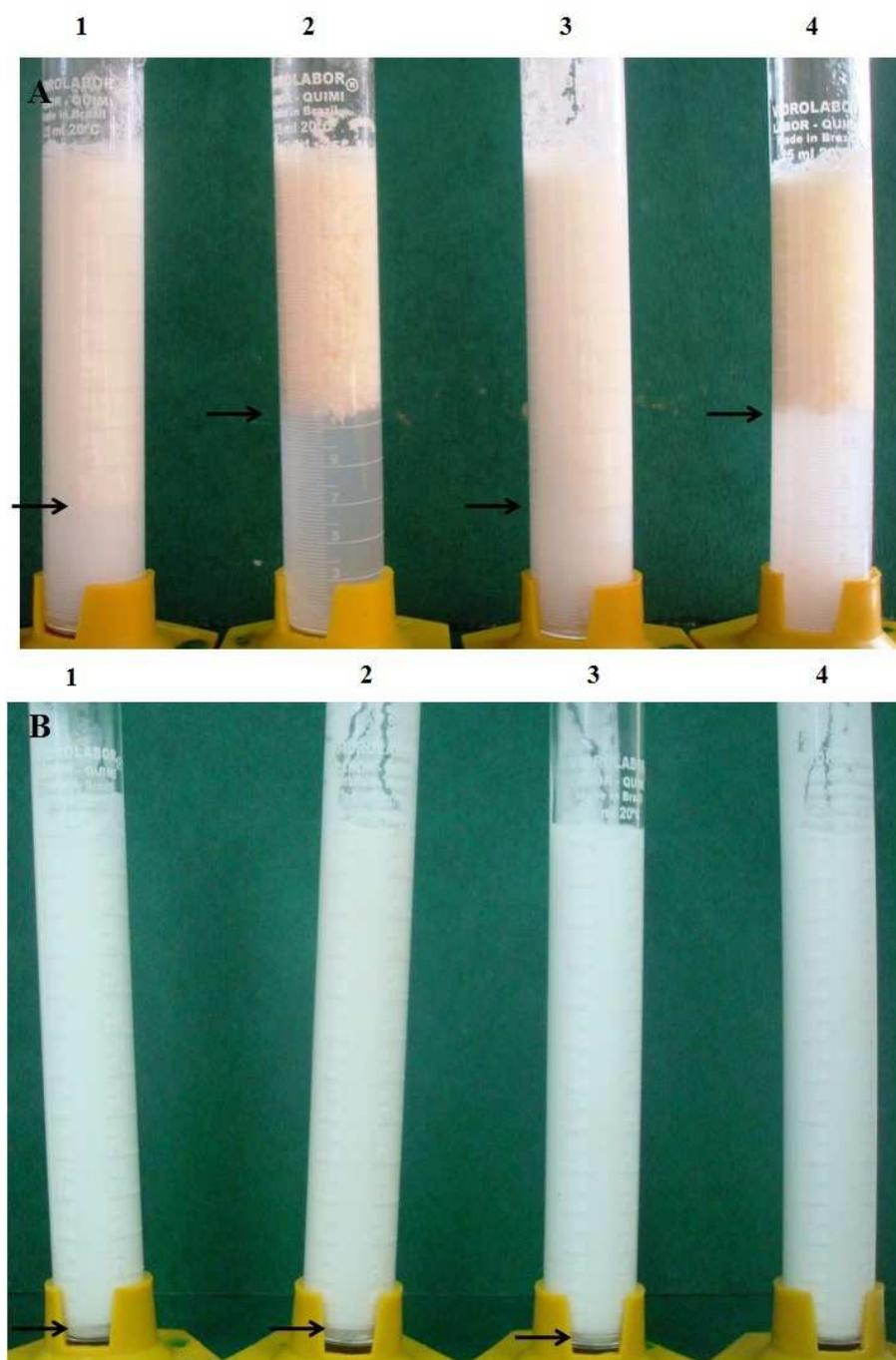
Inicialmente foi verificada a influência da lacase e do ácido ferúlico nas emulsões, homogeneizadas a alta pressão, com 1% e 4% (m/v) de caseinato de sódio em pH 7. Independentemente da presença de ácido ferúlico e lacase, nenhuma das condições estudadas apresentou separação de fases, permanecendo estáveis por 15 dias de estocagem como mostrado nas Figuras 4.21 A e B. Assim, pode-se constatar que o tratamento enzimático não influenciou na estabilidade das emulsões a pH 7, pois estas também não mostraram separação de fases sem a adição de ácido ferúlico e lacase. Porém, a adição de lacase alterou o aspecto visual das emulsões com 1% de proteína, tornando-as mais aglomeradas. A influência da lacase e ácido ferúlico na estabilidade das emulsões com caseinato de sódio, 1% de proteína em pH 3 e 5, também foi avaliada.

Em pH 5, a presença de lacase e ácido ferúlico não levou à estabilização das emulsões (Figura 4.22A), ou seja, ocorreu separação de fases assim como observado para a emulsão estabilizada somente com caseinato de sódio (seção 4.2.1). O abaixamento do pH induz reações de associação, devido à neutralização parcial das cargas negativas da caseína e consequente diminuição da repulsão eletrostática intermolecular (ROEFS & VAN VLIET, 1990), ocorrendo a precipitação do caseinato no ponto isoelétrico. Provavelmente essa mudança na conformação da proteína (estrutura mais fechada) desfavorece a atuação da enzima, e, portanto, o potencial efeito no aumento da estabilidade da emulsão. Assim como as emulsões estabilizadas somente com caseinato de sódio em pH 5 (controle), as emulsões tratadas com ácido ferúlico e lacase apresentaram formação de gel, sendo que a presença da enzima diminuiu a compactação dessa

rede, sendo esta visualmente mais floculada. Já a presença somente do ácido ferúlico levou à formação de uma rede de gel semelhante à emulsão estabilizada apenas com proteína.



**Figura 4.21.** Estabilidade das emulsões O/A em pH 7 após 15 dias de estocagem. (A) 1% (m/v) de proteína e (B) 4% de (m/v) proteína. (1) 10 mM AF, (2) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (3) 5 mM AF e (4) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



**Figura 4.22.** Estabilidade das emulsões O/A com 1% (m/v) de proteína após 15 dias de estocagem. (A) pH 5 e (B) pH 3. (1) 10 mM AF, (2) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (3) 5 mM AF e (4) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.

A Tabela 4.8 apresenta o índice de separação de fases no equilíbrio das emulsões estabilizadas com 1% de caseinato de sódio em pH 3 e 5. A partir desses resultados, pode-se observar que a adição de lacase aumentou o índice de separação das emulsões em pH 5, ou seja, diminuiu a estabilidade. Isso pode estar associado à formação de um gel mais particulado (estrutura proteica) que levou à expulsão de água (sinerese) e consequente formação de uma fase inferior com maior volume. Comparando esses valores com os calculados para as emulsões somente com caseinato, o ácido ferúlico teve um efeito positivo na estabilidade, diminuindo o índice de separação. Esse resultado pode estar associado à formação de extensivas ligações covalentes que tornaram a emulsão-gel formada mais ordenada.

**Tabela 4.8.** Índice de separação de fases (%) das emulsões estabilizadas com 1% (m/v) de CN-Na com adição de ácido ferúlico e lacase.

Sistemas \ pH	3	5
Controle (somente CN-Na)	23,2	36,0
10 mM AF	4,0	26,4
10 mM AF + 5 mg/mL LAC	4,0	48,0
5 mM AF	4,0 <	25,6
5 mM AF + 1 mg/mL LAC	0	52,0

Em pH 3 (Figura 4.22B), apesar da separação de fases, a lacase e o ácido ferúlico tiveram efeito positivo na estabilidade das emulsões, diminuindo consideravelmente o índice de cremeação (Tabela 4.8). Apesar da formação de uma rede de gel causada pelo abaixamento do pH, a lacase foi capaz de formar ligações covalentes na estrutura do caseinato usando o mediador ácido ferúlico, que ocasionou o aumento da capacidade emulsificante da proteína e consequentemente aumento da estabilidade cinética.

Chen et al. (2010) estudaram a influência da lacase na estabilidade de suspensões de gotas de lipídeos (*oil body*) encontradas em grãos de soja, utilizando a pectina para recobrir a superfície das gotas. Eles verificaram que a pectina que estava ligada covalentemente às gotas melhoraram a estabilidade das suspensões em pH ácido.

#### 4.4.2. Distribuição de tamanho de gotas

Visualmente, as imagens das emulsões estabilizadas com 4% de proteína não mostraram diferenças significativas em relação ao tamanho das gotas, uma vez que apresentaram estruturas bastante homogêneas (Figura 4.23). Já as microscopias das emulsões com 1% de CN-Na (Figura 4.24) mostraram que as microestruturas das emulsões eram mais polidispersas, ou seja, apresentaram diferentes tamanhos de gotas, com presença de floculação. Contudo, a polidispersão foi menos pronunciada que nas emulsões estabilizadas apenas com caseinato de sódio (Figura 4.7), apresentando curvas de distribuição de tamanho mais estreitas (Figura 4.24). Já as emulsões em pH próximo ao pI (pH 5) apresentaram estruturas bastante diferenciadas, indicando a formação de uma rede típica de gel e com gotas visivelmente maiores (Figura 4.25). Quando o pH foi decrescido para valores abaixo do pI (pH 3), foi possível observar que as gotas de óleo ainda formavam uma rede fraca, provavelmente porque a carga positiva predominante na superfície das mesmas não foi suficiente para impedir a sua agregação, aumentando o diâmetro médio das gotas (Figura 4.26). O diâmetro médio superficial das gotas foi calculado através de técnica de espalhamento de luz para todas as emulsões estudadas, sendo apresentado na Tabela 4.9.

Na Figura 4.24 observa-se que em pH 7 para a concentração de 10 mM de ácido ferúlico e 5 mg/mL de lacase ocorreu agregação das gotas, o que pode ter levado ao maior diâmetro médio de gotas dessa emulsão (Tabela 4.9) e ao pico de menor altura (4 – 20  $\mu\text{m}$ ) na curva de distribuição de tamanho (Figura 4.27), indicando maior polidispersão. Já em pH 3, a presença de ácido ferúlico e lacase levou a curvas de distribuição de tamanho semelhantes (Figura 4.27), porém, com formação de picos de menor altura quando comparados a emulsão controle (Figura 4.6). Isso pode ser explicado pela modificação na estrutura do caseinato promovida pela ação da

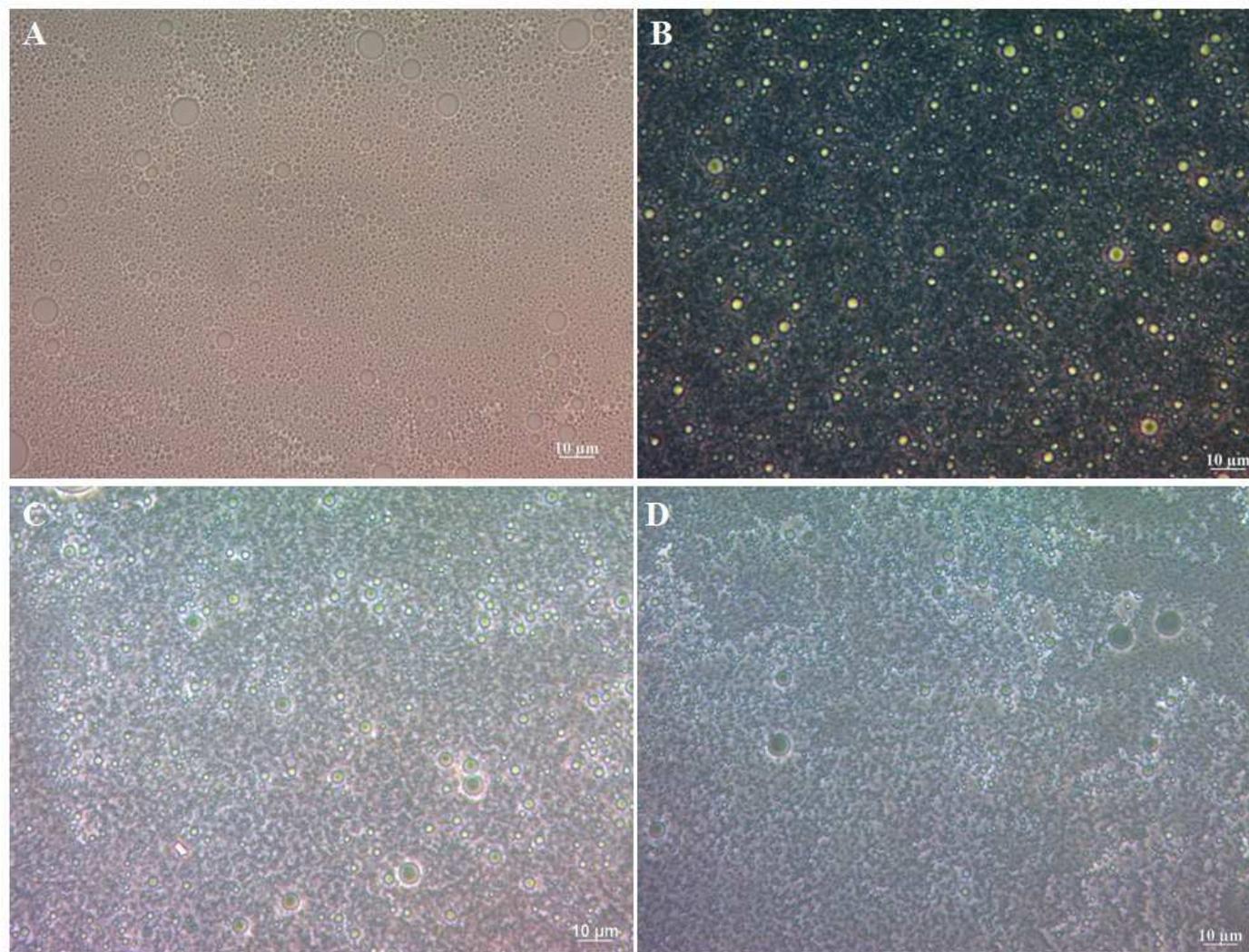
enzima, que melhorou a capacidade emulsificante da proteína, sendo que os menores picos podem estar associados à agregação das proteínas ou aos resíduos de ácido ferúlico que não foram ligados ao caseinato.

Para as emulsões estabilizadas com 4% de proteína as curvas de distribuição de tamanho (Figura 4.28) também apresentaram um pico relacionado à formação de menores diâmetros de gota, assim como o controle (Figura 4.6). Analisando o tamanho médio das gotas (Tabela 4.9) somente o tratamento com 10 mM de ácido ferúlico e 5 mg/mL de lacase apresentaram tamanho médio de gotas significativamente diferentes e maiores em relação aos demais tratamentos em pH 3 e 7.

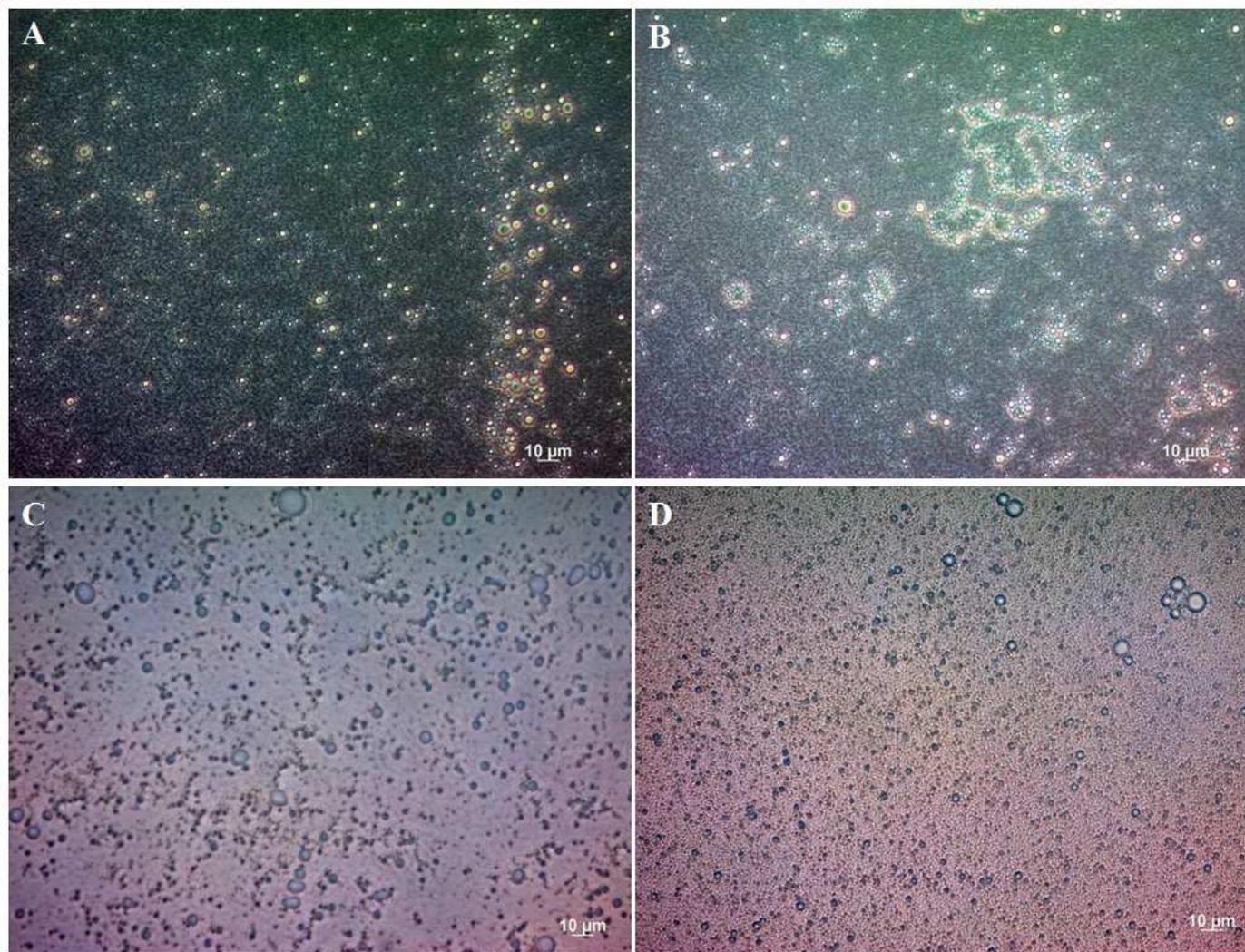
**Tabela 4.9.** Tamanho médio de gotas  $d_{32}$  ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões estabilizadas com caseinato de sódio na presença de ácido ferúlico e lacase.

% Proteína (m/m)	Tratamento	pH		
		3,0	5,0	7,0
1	10 mM AF	11,79 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup>	31,55 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	10 mM AF + 5 mg/mL LAC	20,17 $\pm$ 2,08 <sup>b</sup>	32,19 $\pm$ 2,18 <sup>a</sup>	1,32 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
	5 mM AF	13,95 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	31,97 $\pm$ 2,98 <sup>a</sup>	0,96 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	5 mM AF + 1 mg/ mL LAC	13,47 $\pm$ 1,71 <sup>a</sup>	30,18 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	0,97 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
	10 mM AF	-	-	0,44 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	10 mM AF + 5 mg/mL LAC	-	-	0,49 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
4	5 mM AF	-	-	0,44 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	5 mM AF + 1 mg/mL LAC	-	-	0,44 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

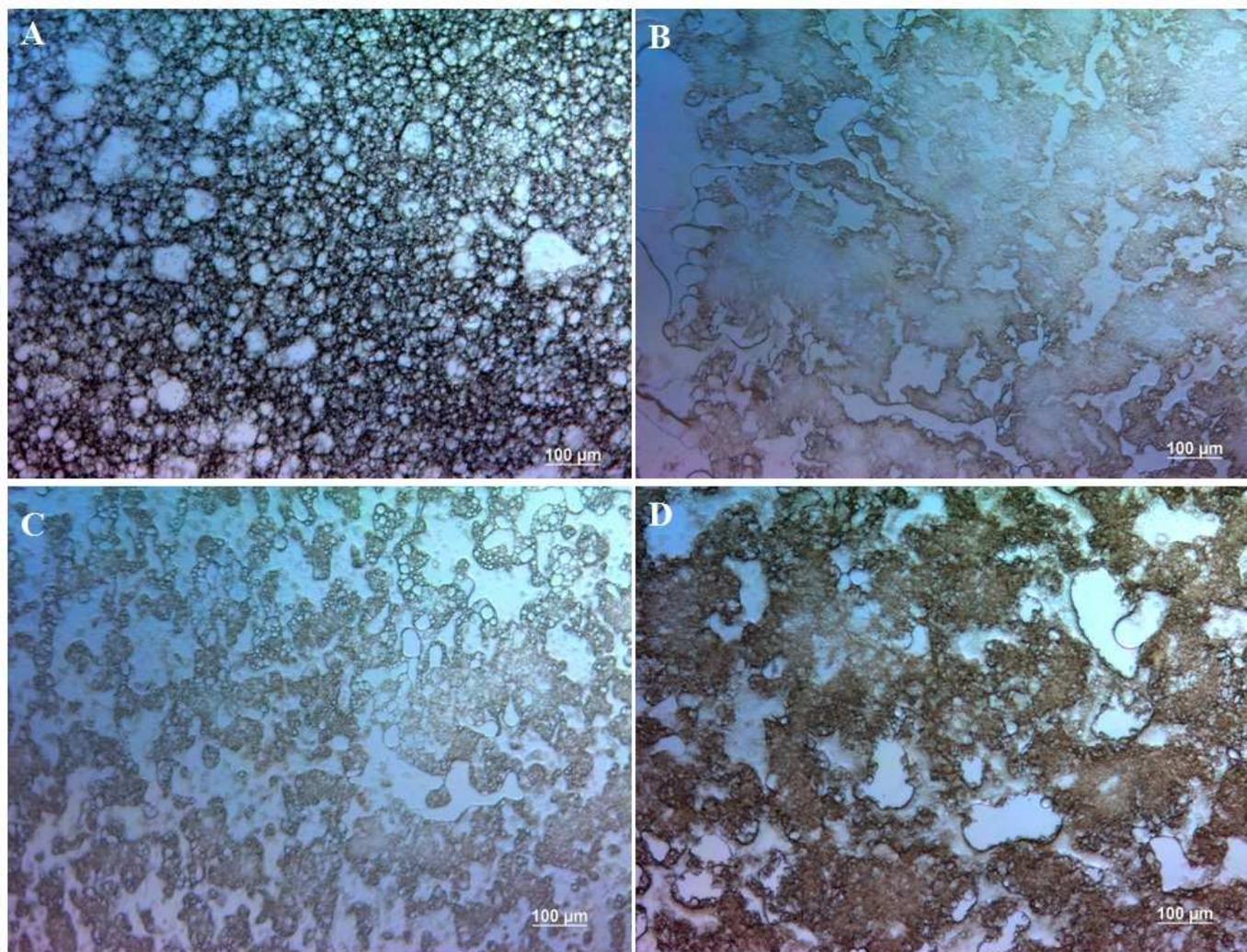
Letras diferentes indicam diferenças significativas a ( $p < 0,05$ ).



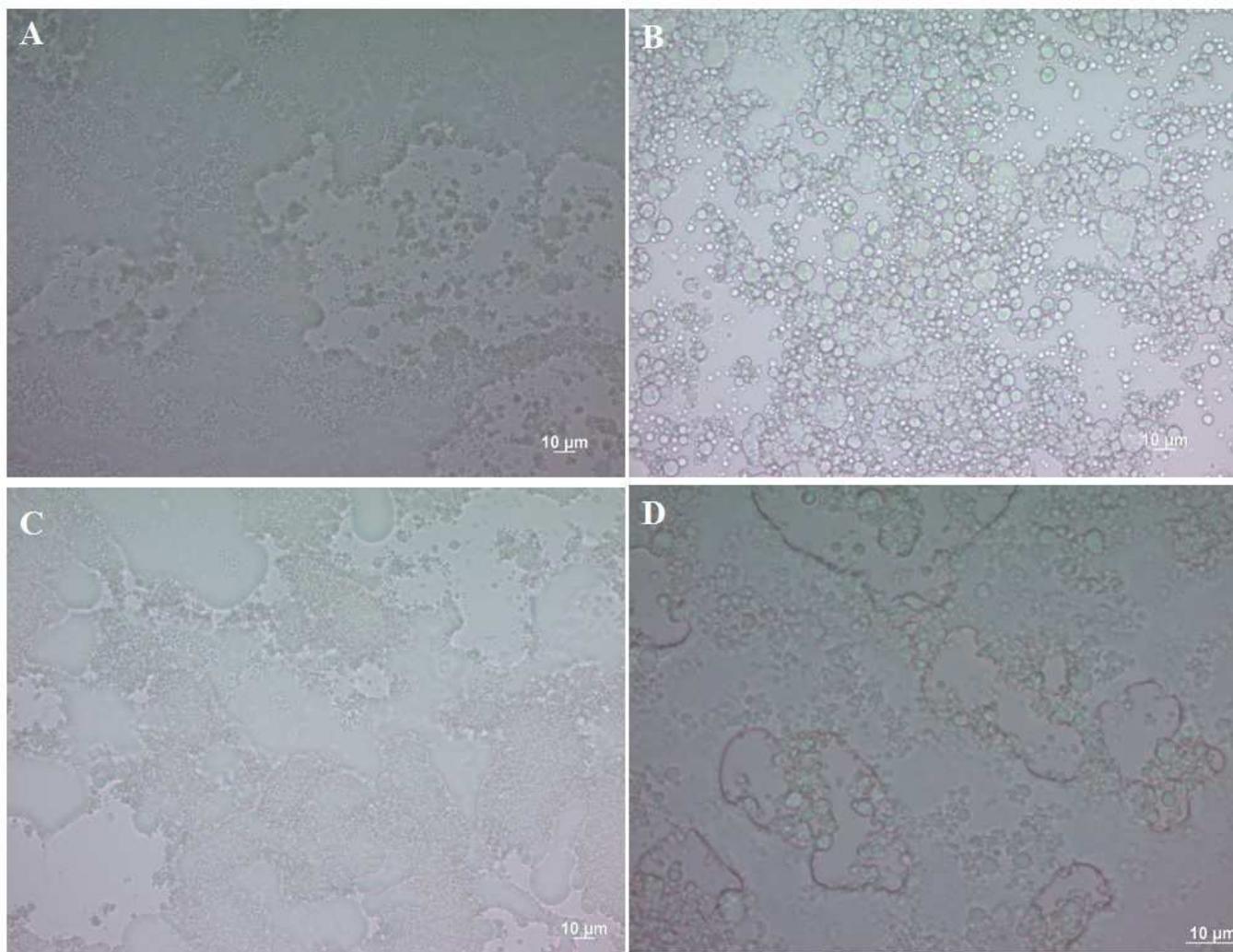
**Figura 4.23.** Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 4% (m/v) em pH 7. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



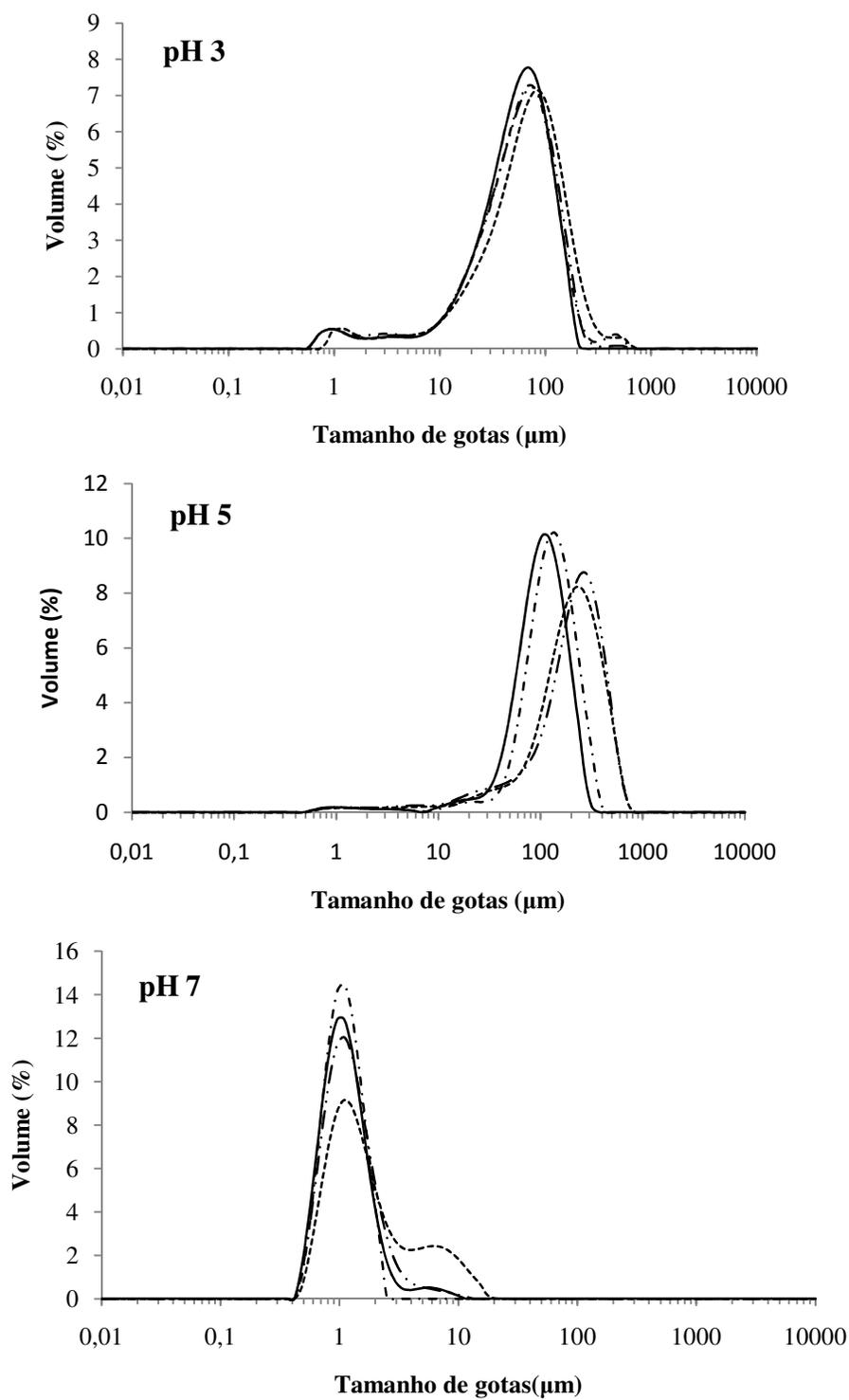
**Figura 4.24.** Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1% (m/v) em pH 7. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



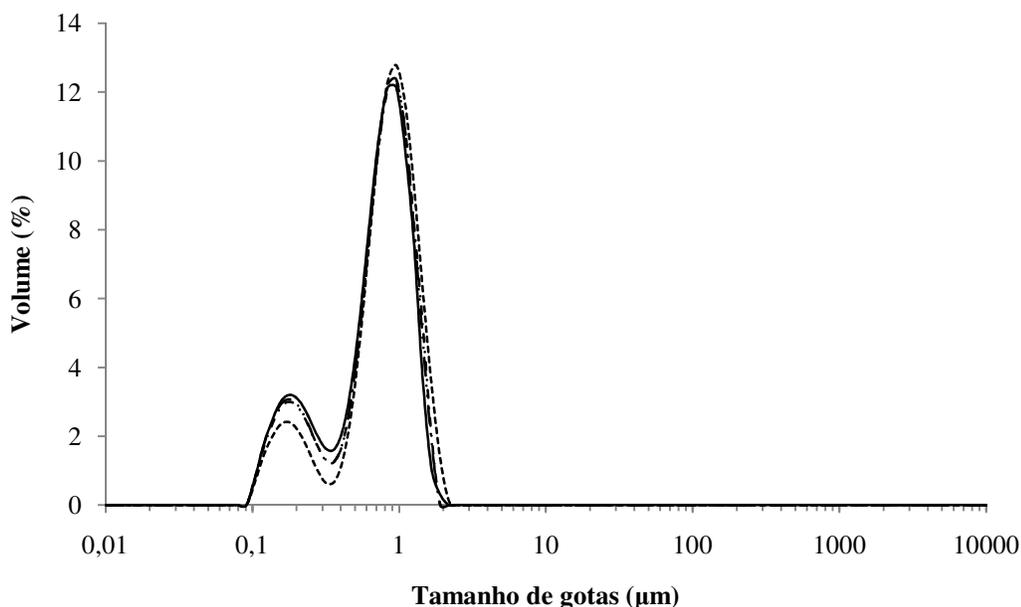
**Figura 4.25.** Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1% (m/v) em pH 5. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



**Figura 4.26.** Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1% (m/v) em pH 3. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



**Figura 4.27.** Distribuição de gota para emulsões estabilizadas com 1% (m/v) de proteína na presença de (—) 10 mM AF, (---) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, (-·-·-) 5 mM AF e (-··-) 5mM AF + 1 mg/mL LAC.



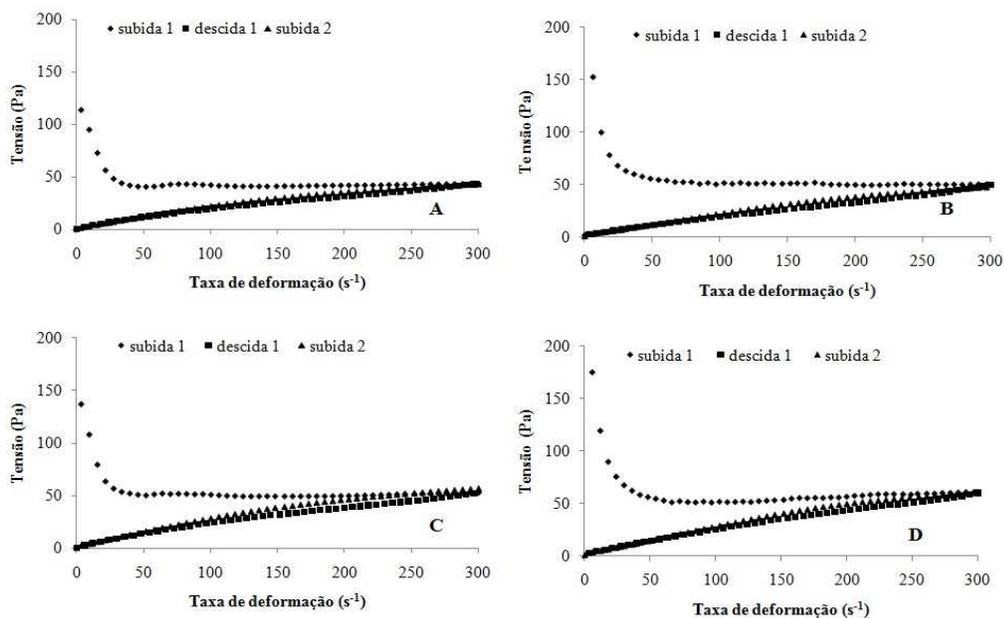
**Figura 4.28.** Distribuição de gota para emulsões estabilizadas com 4% (m/v) de proteína em pH 7 na presença de (—) 10 mM AF, (- -) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, (-·-·-) 5 mM AF e (-·-·-) 5mM AF + 1 mg/mL LAC.

Ma et al. (2011) estudaram emulsões estabilizadas com proteínas do soro modificadas com ácido vanílico, sendo o efeito da lacase verificado após o processo de homogeneização, ou seja, após a emulsificação. Eles verificaram que as curvas de distribuição de tamanho de gotas também foram polidispersas com aparecimento de picos menores. Além disso, o uso das proteínas modificadas e da lacase tiveram um leve aumento no tamanho médio volumétrico das gotas com relação às emulsões estabilizadas somente com proteína do soro.

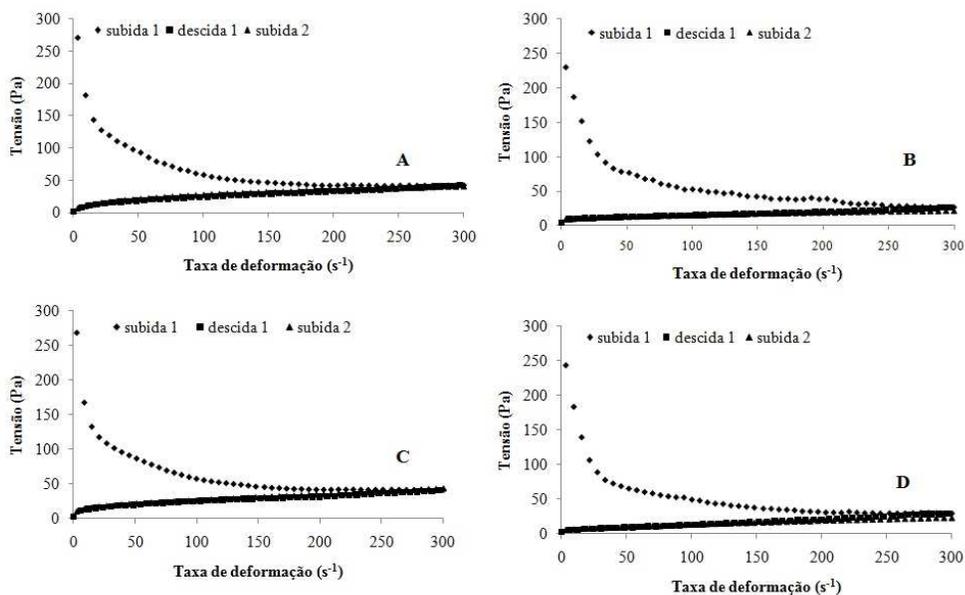
Alguns estudos têm associado o aumento no diâmetro médio com a agregação das gotas durante o processo de reticulação ou a formação de uma camada mais espessa em torno das gotas de óleo (CHEN et al., 2010). Assim, o aumento do diâmetro médio superficial ( $d_{32}$ ) pode estar associado à formação de uma camada interfacial mais espessa devido à modificação na estrutura do caseinato causada pelas ligações cruzadas.

### 4.4.3. Reologia

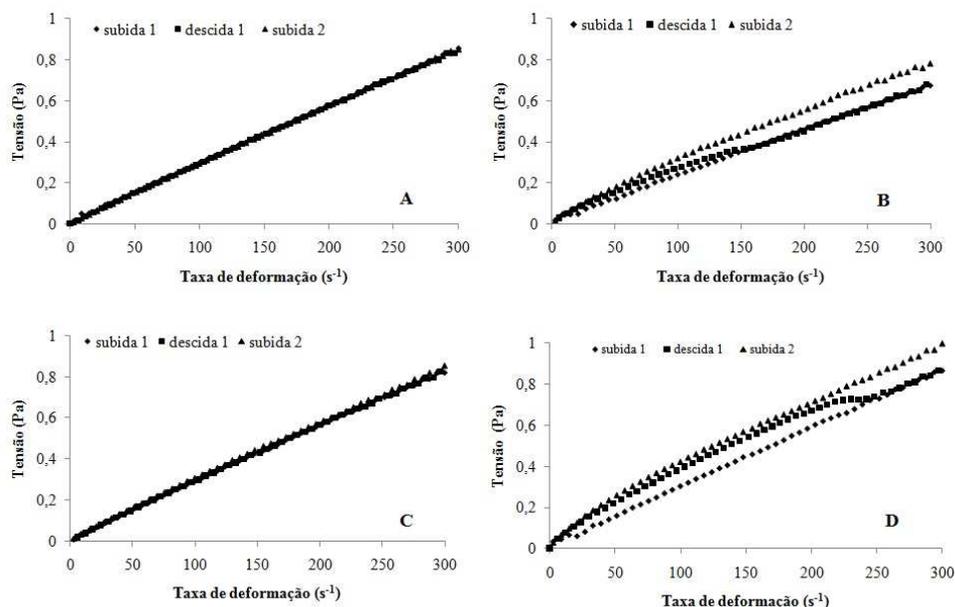
As propriedades reológicas foram avaliadas com a finalidade de se obter informações sobre as características de textura, estabilidade e interação entre o ácido ferúlico e a lacase nas emulsões estabilizadas com caseinato de sódio. Para verificar a influência desses ingredientes no comportamento dependente do tempo, as emulsões foram submetidas a diferentes ciclos de tensão de cisalhamento. Pelas Figuras 4.29 e 4.30 observa-se que a fase superior das emulsões em pH 3 e 5 apresentaram uma ruptura na rede de gel formada com a aplicação da tensão de cisalhamento, com redução da viscosidade aparente entre a subida 1 e a descida, o que caracteriza a tixotropia. Este mesmo comportamento foi observado nas emulsões estabilizadas apenas com o caseinato de sódio (controle), conforme apresentado nas Figuras 4.8A e C. Já as emulsões estabilizadas com 1% de proteína em pH 7 caracterizaram-se como fluido reopético na presença da lacase (Figuras 4.31B e D), ou seja, houve um aumento da viscosidade aparente com o tempo de cisalhamento para uma mesma taxa de deformação. Assim, a lacase aumentou a complexidade do comportamento reológico das emulsões com relação ao tempo, já que a viscosidade do controle (Figura 4.8E) variou somente com a taxa de deformação. Esse comportamento reopético pode ser explicado pelo aumento no contato entre as gotas devido à presença da lacase com o cisalhamento, levando à agregação das gotas. Pela Figura 4.32 observa-se que com 4% de caseinato nem a lacase nem o ácido ferúlico tiveram influência na dependência do tempo das emulsões, apresentando o mesmo comportamento do controle (Figura 4.8F).



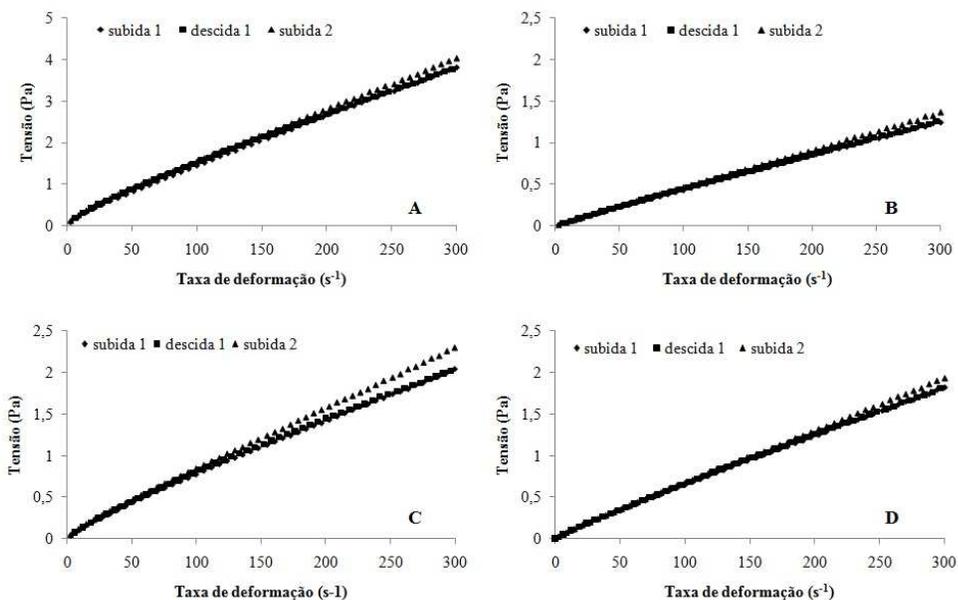
**Figura 4.29.** Curvas de escoamento das emulsões com 1% de CN-Na em pH 3 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF (fase superior), (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC (fase superior), (C) 5 mM AF (fase superior) e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



**Figura 4.30.** Curvas de escoamento da fase superior das emulsões com 1% de CN-Na em pH 5 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



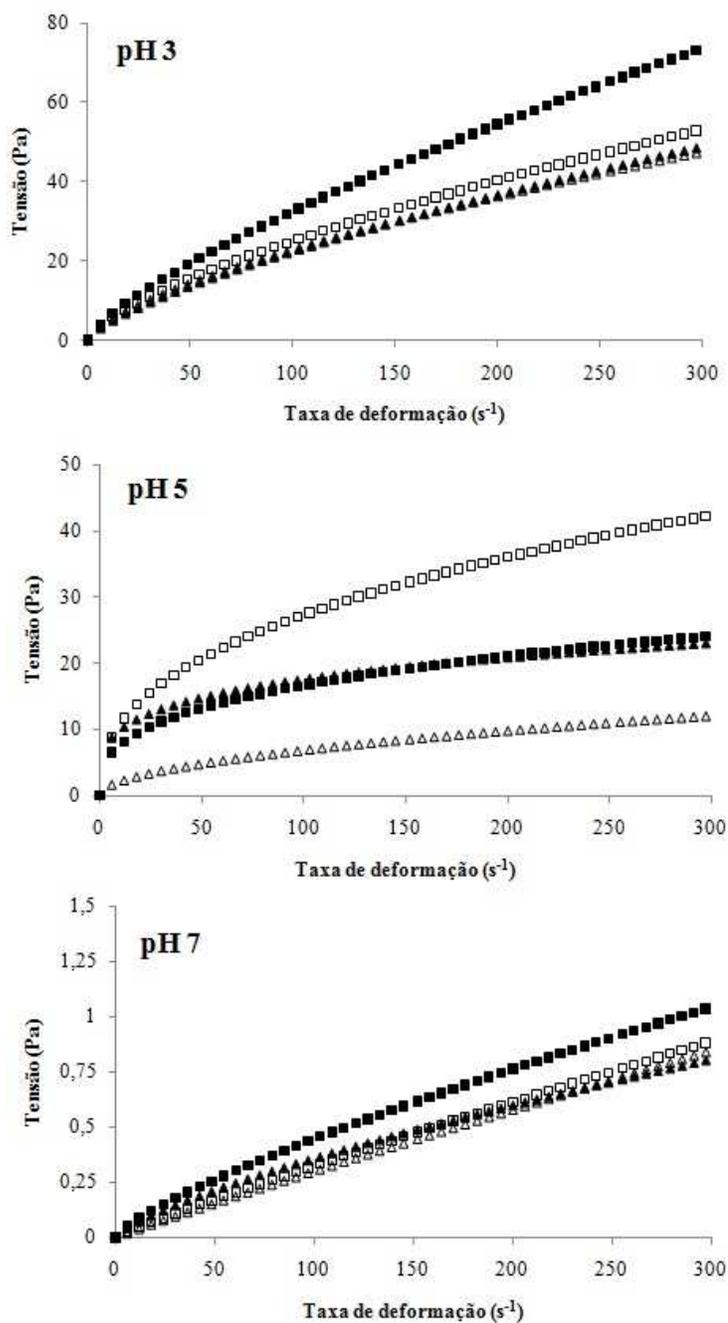
**Figura 4.31.** Curvas de escoamento das emulsões com 1% de CN-Na em pH 7 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



**Figura 4.32.** Curvas de escoamento das emulsões com 4% de CN-Na em pH 7 para avaliação da dependência do tempo de cisalhamento. Emulsões com: (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.

O comportamento reológico em estado estacionário foi avaliado para todas as emulsões que permaneceram cineticamente estáveis e para a fase superior das que apresentaram separação de fases. Pela Figura 4.33 pode-se observar que todos os tratamentos estudados exibiram um comportamento de fluido pseudoplástico, sendo assim, o modelo Lei da Potência foi ajustado às curvas de escoamento, com coeficiente de determinação maior do que 0,99. É interessante observar que as amostras contendo 5 mM de ácido ferúlico foram mais viscosas do que as que continham maior concentração deste ingrediente.

Os valores de índice de consistência (k), índice de comportamento (n) e viscosidade aparente a uma taxa de deformação de  $100 \text{ s}^{-1}$  ( $\eta_{100}$ ) estão apresentados na Tabela 4.10 para as emulsões que não apresentaram separação de fases. Para as emulsões estabilizadas com 1% de CN-Na em pH 7, a adição do ácido ferúlico e da lacase modificou o comportamento das emulsões, tornando-as pseudoplásticas, diferentemente do controle que se comportou como um fluido Newtoniano. A pseudoplasticidade foi mais pronunciada na presença da enzima, que diminuiu significativamente o índice de comportamento e aumentou o índice de consistência, levando ao aumento da viscosidade aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$ . Porém, apenas na presença do ácido ferúlico, essas emulsões não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle quanto à viscosidade aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$ . Uma explicação seria que atuação da lacase no caseinato de sódio levou à formação de ligações covalentes, as quais mudaram a estrutura da emulsão, e assim, aumentando a pseudoplasticidade. Além disso, essas emulsões tiveram um aspecto visual mais aglomerado.



**Figura 4.33.** Curvas de escoamento em estado estacionário das emulsões (pH 7) e da fase superior (pH 3 e 5), estabilizadas com 1% proteína na presença de ( $\Delta$ ) 10 mM AF, ( $\blacktriangle$ ) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, ( $\square$ ) 5 mM AF e ( $\blacksquare$ ) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC. Com 1% de CN-Na, pH 3 e 5 mM AF + 1 mg/mL LAC está apresentado o comportamento da emulsão.

**Tabela 4.10.** Efeito da concentração de ácido ferúlico e lacase nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas por CN-Na em pH 7.

Proteína (% m/m)	Tratamento	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\eta_{100}$ (Pa.s)
1	Controle	0,0030	1,0	0,0030
	10 mM AF	0,0040 <sup>a*</sup>	0,94 <sup>a*</sup>	0,0030 <sup>a</sup>
	10 mM AF + 5mg/mL LAC	0,0120 <sup>b*</sup>	0,74 <sup>b*</sup>	0,0035 <sup>a*</sup>
	5 mM AF	0,0047 <sup>a*</sup>	0,92 <sup>a*</sup>	0,0032 <sup>a</sup>
	5 mM AF + 1mg/mL LAC	0,0127 <sup>b*</sup>	0,77 <sup>b*</sup>	0,0045 <sup>b*</sup>
4	Controle	0,260	0,69	0,0608
	10 mM AF	0,0172 <sup>a*</sup>	0,88 <sup>a*</sup>	0,0098 <sup>a*</sup>
	10 mM AF + 5mg/mL LAC	0,0043 <sup>bc*</sup>	1,0 <sup>b*</sup>	0,0043 <sup>bc*</sup>
	5 mM AF	0,0128 <sup>ac*</sup>	0,90 <sup>a*</sup>	0,0081 <sup>ac*</sup>
	5 mM AF + 1mg/mL LAC	0,0065 <sup>c*</sup>	1,0 <sup>b*</sup>	0,0065 <sup>c*</sup>

Letras diferentes indicam diferenças significativas a ( $p < 0,05$ ). O símbolo \* significa que o tratamento foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) do controle. O controle são emulsões estabilizadas somente com CN-Na.

Já nas emulsões estabilizadas com 4% de CN-Na em pH 7, a adição do ácido ferúlico promoveu um aumento significativo no índice de comportamento, tornando as emulsões menos pseudoplásticas. Além disso, a redução nos valores do índice de consistência com a presença de ácido ferúlico refletiu na redução da viscosidade aparente a uma taxa de deformação de  $100 \text{ s}^{-1}$  (Tabela 4.10). O uso da lacase e do ácido ferúlico em conjunto, para as duas concentrações estudadas, tiveram um efeito mais pronunciado no comportamento das emulsões, as quais passaram a comportar-se como um fluido Newtoniano.

A mudança nos valores de pH teve grande influência nos parâmetros reológicos das emulsões tratadas enzimaticamente (Tabela 4.11). Em pH 5, a emulsão controle apresentou comportamento dilatante, enquanto as que foram tratadas com ácido ferúlico e lacase foram altamente pseudoplásticas, apresentando elevado índice de consistência e baixo índice de comportamento. Contudo, somente o uso de ácido ferúlico não alterou significativamente a viscosidade aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$ , sendo igual ao valor da emulsão controle.

**Tabela 4.11.** Efeito da concentração de ácido ferúlico e lacase nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das fases superiores estabilizadas por 1% de CN-Na.

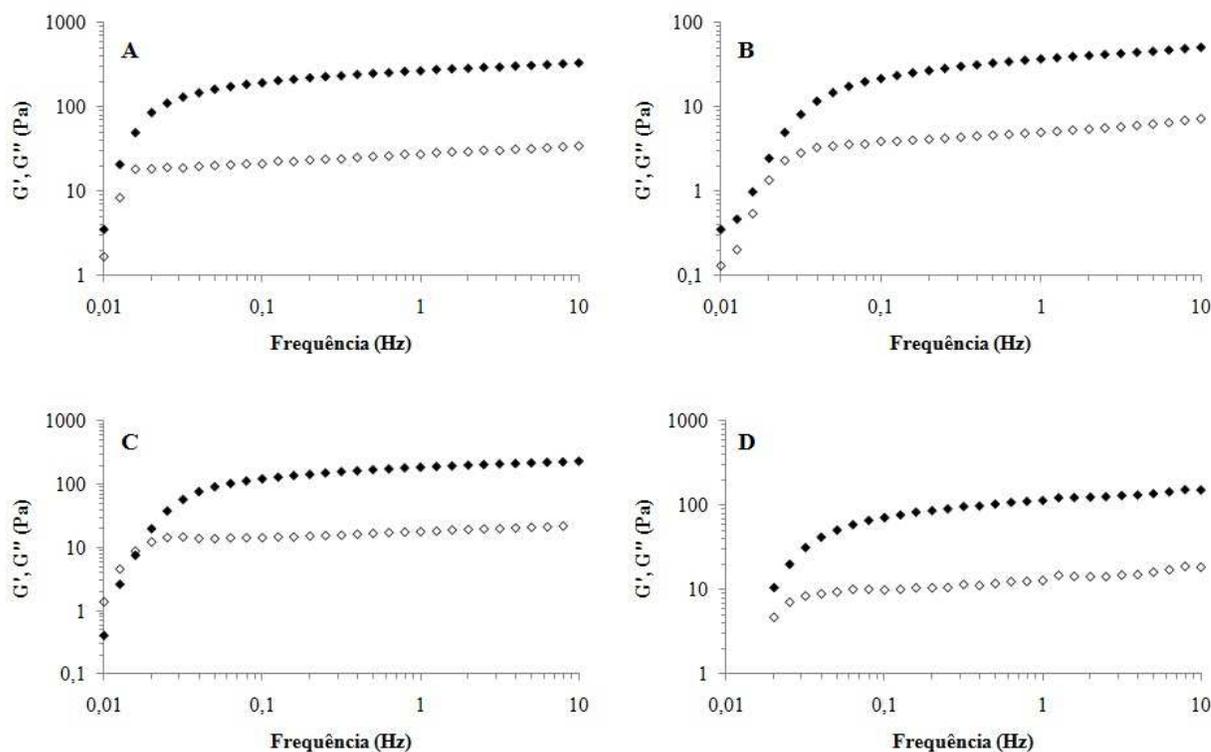
pH	Tratamento	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\eta_{100}$ (Pa.s)
5	Controle	0,08	1,28	0,2726
	10 mM AF	2,97 <sup>a*</sup>	0,44 <sup>a*</sup>	0,2023 <sup>ab</sup>
	10 mM AF + 5mg/mL LAC	5,54 <sup>a*</sup>	0,25 <sup>b*</sup>	0,1748 <sup>a*</sup>
	5 mM AF	4,32 <sup>a*</sup>	0,40 <sup>ab*</sup>	0,2723 <sup>b</sup>
	5 mM AF + 1mg/mL LAC	3,57 <sup>a*</sup>	0,33 <sup>ab*</sup>	0,1593 <sup>a*</sup>
3	Controle	2,95	0,28	0,1100
	10 mM AF	1,07 <sup>a*</sup>	0,67 <sup>a*</sup>	0,2286 <sup>a*</sup>
	10 mM AF + 5mg/mL LAC	0,87 <sup>a*</sup>	0,71 <sup>ab*</sup>	0,2231 <sup>a*</sup>
	5 mM AF	1,07 <sup>a*</sup>	0,68 <sup>ab*</sup>	0,2527 <sup>ab*</sup>
	5 mM AF + 1mg/mL LAC #	1,05 <sup>a*</sup>	0,75 <sup>b*</sup>	0,3235 <sup>b*</sup>

Letras diferentes indicam diferenças significativas a ( $p < 0,05$ ). O símbolo \* significa que o tratamento foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) do controle. O controle são emulsões estabilizadas somente com CN-Na. Tratamento com símbolo # não apresentou separação de fases.

As emulsões em pH 3 tratadas enzimaticamente foram significativamente diferentes do controle para todos os parâmetros analisados. Pela Tabela 4.11 observa-se que a adição da lacase não afetou significativamente o índice de consistência nem o índice de comportamento das emulsões ( $p < 0,05$ ). Porém, o uso da enzima tendeu a diminuir o índice de consistência e a pseudoplasticidade. Já a viscosidade aparente não apresentou nenhuma clara tendência com o uso da enzima.

As mudanças causadas nas proteínas devido à ação da lacase podem alterar sua tensão superficial e hidrofobicidade, resultando na modificação das suas propriedades funcionais (STEEFFENSEN et al, 2008) e, assim, no comportamento reológico das emulsões.

As medidas reológicas dinâmicas das emulsões estão apresentadas na Figura 4.34 e da fase superior das emulsões que apresentaram separação de fases na Figura 4.35. Para as emulsões com 1% de proteína em pH 7, observa-se que o módulo elástico ( $G'$ ) e o módulo viscoso ( $G''$ ) se cruzam em baixas frequências, sendo esta solução classificada como semi-diluída ou semi-concentrada (PERRECHIL, 2008). O ponto de cruze entre  $G'$  e  $G''$  foi aproximadamente em 0,02 Hz, ou seja, a partir desta frequência  $G'$  foi maior do que  $G''$ . As emulsões com 4% de proteína em pH 7 também tiveram esse mesmo comportamento e estão apresentadas no Anexo 2 (Figura E). Já para as emulsões em pH 3 e 5 o módulo de armazenamento foi maior que o módulo de dissipação ao longo de toda a frequência estudada, indicando um comportamento de um sistema mais estruturado (Anexo 2, Figuras C e D), do tipo gel.

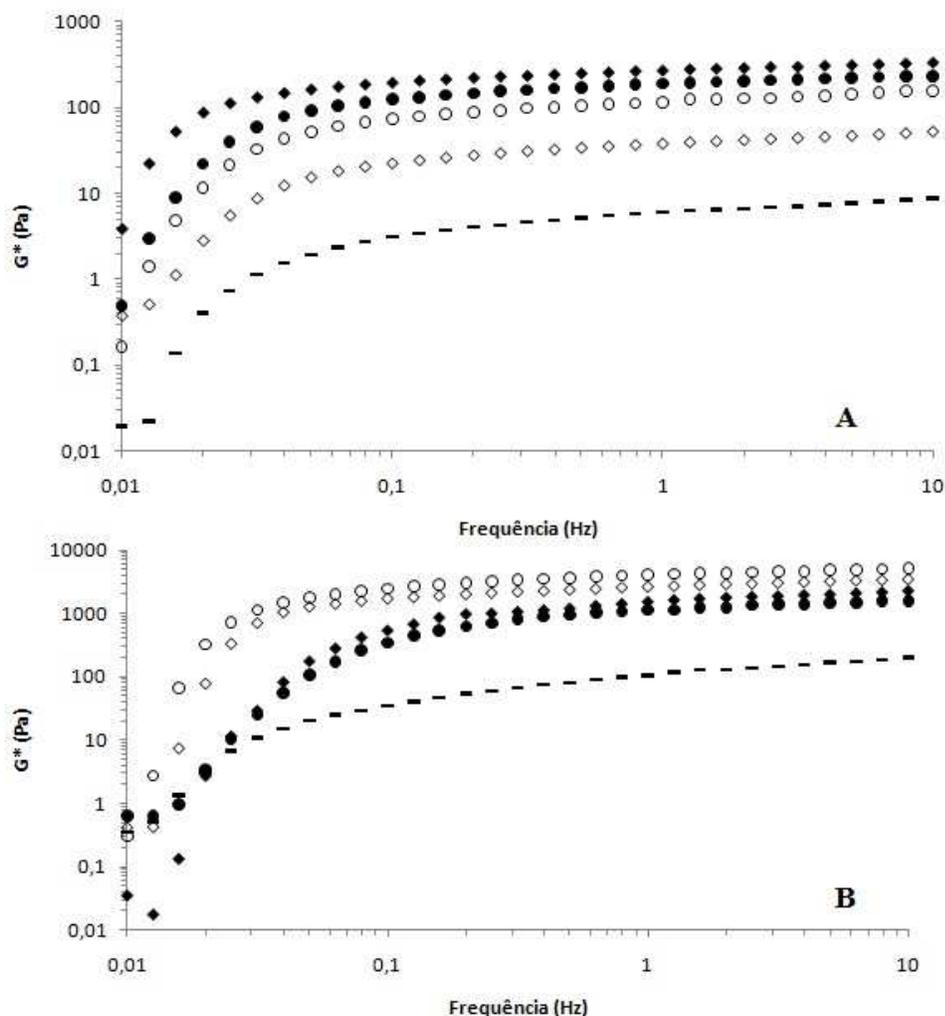


**Figura 4.34.** Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsão estabilizada com 1% de CN-Na em pH 7. (A) 10 mM AF, (B) 10 mM AF + 5 mg/ml LAC, (C) 5 mM AF e (D) 5mM AF + 1 mg/mL LAC. Módulo elástico  $G'$ : símbolos fechados e módulo viscoso  $G''$ : símbolos abertos.

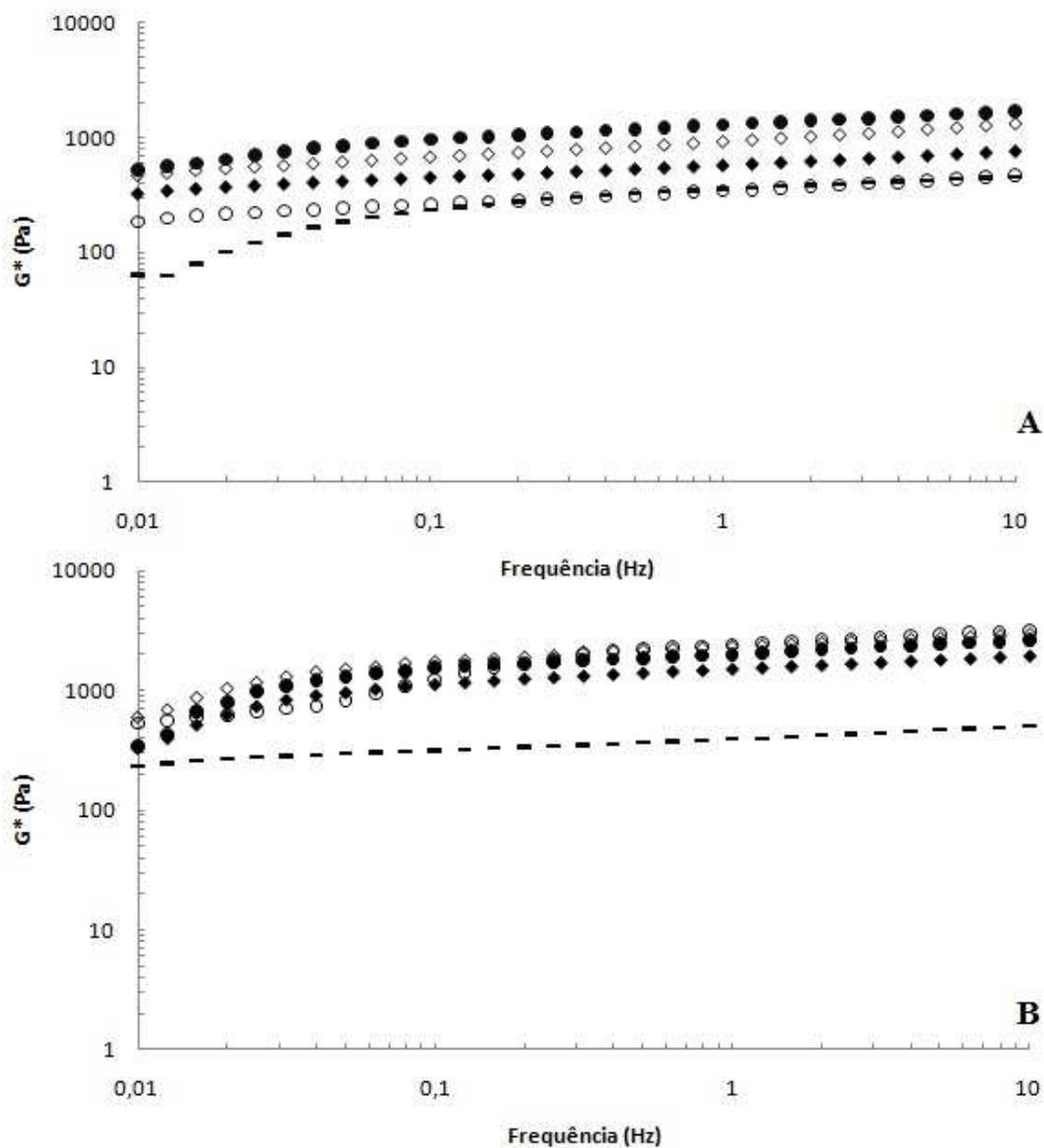
Os valores de módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões em pH 7 tratadas com ácido ferúlico e lacase apresentaram dependência em relação à frequência, assim como o controle (Figura 4.35). Para as emulsões estabilizadas com 1% de CN-Na, o uso da lacase promoveu uma diminuição em  $G^*$  quando comparado com as emulsões na presença apenas do ácido ferúlico. Porém, nas emulsões com 4% de CN-Na foi observado um comportamento contrário. Associando esses resultados com o comportamento das curvas de escoamento (Tabela 4.10), pode-se verificar que as emulsões que foram mais pseudoplásticas indicaram a presença de estrutura composta por uma rede mais frágil.

Esse comportamento também foi verificado para as emulsões em pH 5, porém em pH 3 todas as emulsões tratadas apresentaram um comportamento semelhante, sendo mais estruturadas apenas em relação ao controle. As emulsões em pH 3 e 5 tratadas com ácido ferúlico e lacase

apresentaram os valores de módulo complexo ( $G^*$ ) com pouca dependência da frequência, assim como o controle (Figura 4.36).



**Figura 4.35.** Influência da concentração de ácido ferúlico e lacase no módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões O/A em pH 7. (A) 1% de CN-Na e (B) 4% de CN-Na. (◆) 10 mM AF, (◇) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (●) 5 mM AF, (○) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC e (—) controle.



**Figura 4.36.** Influência da concentração de ácido ferúlico e lacase no módulo complexo ( $G^*$ ) das emulsões estabilizadas com 1% de CN-Na. (A) pH 5 e (B) pH 3. ( $\blacklozenge$ ) 10 mM AF, ( $\diamond$ ) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, ( $\bullet$ ) 5 mM AF, ( $\circ$ ) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC e ( $---$ ) controle.

O efeito da adição de ácido ferúlico e lacase nas propriedades viscoelásticas das emulsões podem ser melhor visualizadas na Tabela 4.12, onde os valores de  $G'$  e  $G''$  foram obtidos em uma condição fixa de frequência, 1 Hz. Para as emulsões estabilizadas com 1% (m/v) de proteína, a

adição de ácido ferúlico e lacase aumentou os valores de  $G'$  e  $G''$  quando comparados ao controle. Essas emulsões tratadas enzimaticamente apresentaram maiores diâmetros de gotas (Tabela 4.9) do que a emulsão controle, o que pode ser associado ao aumento na viscosidade aparente (Tabela 4.11) e nas propriedades viscoelásticas. Assim, mesmo com o aumento no tamanho das gotas, as características reológicas refletiram no aumento da estabilidade das emulsões acidificadas quando tratadas com ácido ferúlico e lacase.

As emulsões em pH 5 também apresentaram aumento nos valores de  $G'$  e  $G''$ , a 1 Hz, na presença do mediador e da enzima. Contudo, esses valores foram inferiores quando comparados as emulsões em pH 3. Esse resultado pode estar relacionado a formação de uma rede gel mais fraca, conforme observado na análise de estabilidade (Seção 4.4.1). É interessante observar que, para este pH, a emulsão com 5 mM de ácido ferúlico apresentou maior valor de módulo elástico (Tabela 4.12), o que implica na formação de uma emulsão mais estruturada em relação aos demais sistemas, que também corresponde a emulsão com menor índice de separação de fases (Tabela 4.8).

Assim como observado nos outros valores de pH, as emulsões com 1% (m/v) de caseinato de sódio em pH 7 tiveram aumento nos valores de  $G'$  e  $G''$  quando comparados ao controle (Tabela 4.12). Porém, nesta condição, a adição de lacase diminuiu os valores dos parâmetros viscoelásticos dos sistemas em relação as emulsões tratadas somente com ácido ferúlico, o que é pertinente com o aspecto visual mais flocoado (particulado) dessas emulsões. Comparando com os demais valores de pH, as emulsões em pH 7 (1% CN-Na) apresentaram menores valores de módulo elástico e viscoso, que está associado aos menores valores de  $\eta_{100}$  e maiores valores no índice de comportamento (Tabela 4.10), o que pode ser atribuído à não formação de uma rede de gel, como observado nos pHs 3 e 5. Contudo, essas emulsões são estáveis devido ao menor diâmetro médio superficial das gotas (Tabela 4.9).

Para as emulsões estabilizadas com 4% (m/v) de proteína, os valores de  $G'$  e  $G''$  foram pelo menos 10 vezes maiores quando comparados ao controle (Tabela 4.12), sendo que a ação conjunta de mediador e enzima tornaram as emulsões mais estruturadas, apesar de apresentarem comportamento menos pseudoplástico e não possuem diferença no tamanho de gotas (Tabela

4.9). A obtenção de emulsões de estrutura mais rígida pode estar associada à formação de ligações covalentes pela ação da enzima.

**Tabela 4.12.** Módulos de armazenamento ( $G'$ ) e dissipação ( $G''$ ) obtidos em frequência de 1 Hz em ensaios oscilatórios de emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.

Sistemas	1% proteína						4% proteína	
	pH 3		pH 5		pH 7		pH 7	
	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
Controle	437	70,3	352	61,7	5,92	0,716	103	22,4
10 mM AF	1520	210	563	99,1	266	27,1	1530	273
10 mM AF + 5mg/mL LAC	2330	364	899	207	37,5	4,98	2610	439
5 mM AF	1990	259	1280	217	188	18,2	1110	183
5 mM AF + 1mg/mL LAC	2400	346	337	69,1	116	12,8	4050	482

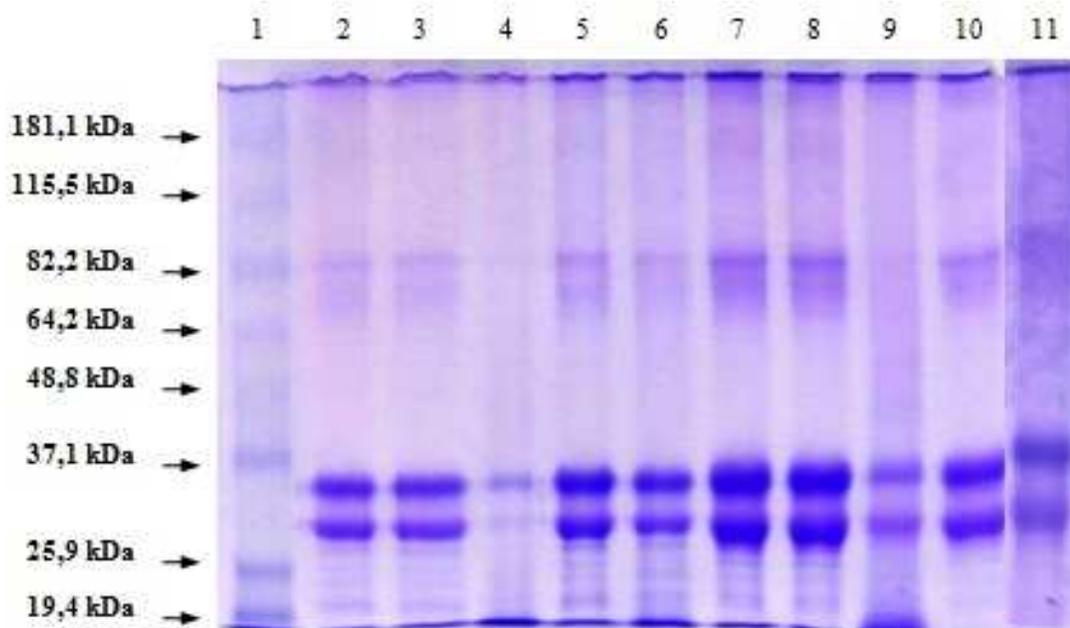
#### 4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A Figura 4.37 apresenta o perfil de eletroforese das emulsões preparadas pela homogeneização das soluções de caseinato de sódio tratadas com ácido ferúlico e lacase. Essa análise foi realizada com o intuito de avaliar qualitativamente a reação de oxidação catalisada pela lacase na formação de ligações covalentes, ou seja, na formação de conjugados proteína – proteína, proteína – ácido ferúlico ou ácido ferúlico – ácido ferúlico nas diferentes condições de tratamento enzimático. Como referência foi utilizado um marcador de massa molecular que cobre a faixa entre 6 e 181,8 kDa, além das emulsões de caseinato de sódio puro como controle (colunas 2 e 7).

Na emulsão com caseinato de sódio foi possível identificar as frações típicas de caseína ( $\alpha_s$  e  $\beta$ -caseínas), que apresentam massa molecular na faixa entre 25,9 e 37,1 kDa (O'REGAN &

MULVIHILL, 2009). Além disso, pode-se observar que o arraste de moléculas de maior massa molecular (entre 37 e 85 kDa) foi mais intenso nas emulsões sem a lacase. Outro fator a ser observado é que o tratamento com 10 mM de ácido ferúlico e 5 mg/mL de lacase promoveu maior diminuição nas bandas proteicas referentes às frações  $\alpha_s$  e  $\beta$ -caseínas, bem como na banda de massa molecular de 82,2 kDa, para as emulsões com 1% e 4% de caseinato de sódio. Isso pode indicar que a lacase não fragmentou o caseinato de sódio, mas originou a formação de agregados de elevada massa molecular, ficando retidos no topo do gel. Steffensen et al. (2008) verificaram que a  $\alpha$ -caseína não foi fragmentada nem ligada covalentemente quando tratada apenas com a lacase. Porém, a adição de ácido ferúlico levou à formação de agregados com massa molecular maior do que 206 kDa.

Pode-se concluir que o mecanismo de reação de oxidação utilizando a enzima lacase para formação de ligações cruzadas covalentes não é completamente conhecido. Porém, sabe-se que o processo de reticulação em proteínas que contém resíduos de tirosina é baseado na formação de ligações iso-ditirosina, com pequenas quantidades de ligações ditirosina e ligações dissulfeto (MATTINEN et al., 2005). Ácidos fenólicos, como ácido ferúlico, são pequenas moléculas que podem facilmente interagir com a enzima ou o substrato proteico, capazes de melhorar a reticulação. Essas moléculas podem transferir elétrons para a proteína, que pode ser ligada via radical ou pela ligação direta entre dois resíduos de tirosina presentes na proteína (MA et al., 2011). Assim, a análise de eletroforese confirmou a reticulação promovida pela ação da lacase em substrato proteico (caseinato de sódio) usando o ácido ferúlico como mediador da reação.



**Figura 4.37.** Eletroforese SDS-PAGE das emulsões estabilizadas com caseinato de sódio em pH 7. (1) marcador de massa molecular, (2) emulsão 4% de CN-Na (controle 1), (3) Controle 1 + 10 mM AF, (4) Controle 1 + 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (5) Controle 1 + 5 mM AF, (6) Controle 1 + 5 mM AF + 1 mg/mL LAC, (7) emulsão 1% de CN-Na (controle 2), (8) Controle 2 + 10 mM AF, (9) Controle 2 + 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, (10) Controle 2 + 5 mM AF e (11) Controle 2 + 5 mM AF + 1 mg/mL LAC.



## **CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS**



Os resultados obtidos neste trabalho permitiram avaliar a influência da concentração de proteína, do pH e da intensidade das forças mecânicas na estabilidade, microestrutura e reologia das emulsões. Sistema do tipo rotor-estator levou à formação de macroemulsões cineticamente instáveis e com a fase creme comportando-se como fluido Herschel-Bulkley. Contudo, o aumento na concentração de caseinato de sódio resultou na menor separação de fases devido ao aumento da viscosidade. De modo geral, o processo de homogeneização a altas pressões reduziu consideravelmente o tamanho das gotas, quando comparado aos resultados das macroemulsões obtidos por a Perrechil (2008), produzindo emulsões cineticamente mais estáveis e com comportamento pseudoplástico. Em relação ao pH das emulsões, pode-se concluir que as emulsões foram mais estáveis em pH 7, condição em que as proteínas estão carregadas negativamente, promovendo uma forte repulsão eletrostática entre as gotas. Por outro lado, as emulsões com 4% de proteína apresentaram baixo índice de separação de fases quando o pH estava próximo ao ponto isoelétrico da proteína, ocorrendo assim agregação das moléculas de proteína que estão adsorvidas na superfície das gotas, levando à formação de uma rede elástica e imobilização das gotas dispersas. Porém, emulsões estabilizadas com 1% de caseinato de sódio apresentaram separação de fases em pH ácido devido à baixa densidade de cargas e/ou à baixa viscosidade, que não foram suficientes para promover estabilidade eletrostática e/ou estérica.

O estudo sobre as propriedades mecânicas dos géis de caseinato de sódio permitiram avaliar o efeito da lacase e do ácido ferúlico na formação de uma rede de gel mais estruturada. De maneira geral, o uso de ambos promoveu mudanças nos géis, apresentando maior tensão na ruptura e módulo de elasticidade, assim como menor deformação na ruptura. Essas mudanças nas propriedades mecânicas dos géis de caseinato de sódio podem estar associadas à reticulação promovida pela lacase, que ocasionou na formação de géis mais rígidos, firmes e menos deformáveis. Assim, as concentrações de lacase e ácido ferúlico que formaram géis mais fortes e resistentes foram usadas para a produção de emulsões com o intuito de aumentar a estabilidade em pH ácido.

O estudo das emulsões de caseinato de sódio tratado enzimaticamente mostrou que o uso da lacase aumentou a estabilidade em condição de pH abaixo do pI, indicando que o processo de reticulação aumentou a capacidade da proteína de se ligar ao óleo. Além disso, a utilização da

enzima e do ácido ferúlico tenderam a diminuir a polidispersão na distribuição de tamanho de gotas e formaram emulsões mais estruturadas, com elevados valores de módulo de armazenamento ( $G'$ ), aumentando assim a estabilidade cinética. Também foram verificadas mudanças no comportamento reológico em pH 7, sendo que as emulsões com 1% de caseinato de sódio passaram de fluido Newtoniano para pseudoplástico e o comportamento contrário foi observado para as emulsões com 4% de proteína.

De maneira geral, foi possível a produção de emulsões de estruturas diferenciadas a partir do caseinato de sódio tratado ou não enzimaticamente. O uso da lacase melhorou a funcionalidade do caseinato de sódio como emulsificante, evitando a formação de produtos tóxicos, como poderia ocorrer com reações químicas. Porém, estudos posteriores são necessários para entender o mecanismo de ação da lacase e do ácido ferúlico como mediador da reação de oxidação, no processo de formação de ligações covalentes em moléculas de proteínas e no processo de estabilização de emulsões ácidas.

## **CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ALLEN, K.E., DICKINSON, E., MURRAY, B (2006). Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. **LWT – Food Science and Technology**, 39, 225-234.

ANTON, N., BENOIT, J., SAULNIER, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, 128, 185–199.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1992). **Official Method of Analysis of AOAC International**, 12th edition, 2, 1115.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**, 5th ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1994.

BRAGA, A. L., AZEVEDO, A., MARQUES, M. J., MENOSSI, M., CUNHA, R. L. (2006). Interactions between soy protein isolate and xanthan in heat-induced gels: The effect of salt addition. **Food Hydrocolloids**, 20, 1178–1189.

BUCHERT, J., SELINHEIMO, E., KRUIUS, K., MATTINEN, M. L., LANTTO, R., AUTIO, K (2007). Using crosslinking enzymes to improve textural and other properties of food. In R. Rastall (Ed.), **Novel enzyme technology for food applications**. Cambridge, UK: CRC Press, 101-139.

BUCHERT, J. et al. (2010) Crosslinking Food Proteins for Improved Functionality. **Annual Review of Food Science and Technology**, 1, 113 – 138.

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

CHEFTEL J.C., CUQ J.L., LORIENT D. (1996). Aminoácidos, peptidos y proteínas, in: Fennema O.R. (Ed.), **Química de los alimentos**, Editorial Acirbia, Zaragoza, 275-414.

CHEN, J., DICKINSON, E., EDWARDS, M. (1999). Rheology of acid-induced sodium caseinate stabilized emulsion gels. **Journal of Texture Studies**, 30, 377-396.

CHEN, B., MCCLEMENTS, D. J., GRAY, D. A., DECKER, E. A. (2010). Stabilization of soybean oil bodies by enzyme (laccase) cross-linking of adsorbed beet pectin coatings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 9259-9265.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. (2006). Food protein based material as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, 17, 272-283.

CLAUS, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Arch Microbiol**, 179, 145–150.

---

COUTO, S. R., HERRERA, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, 24, 500-513.

CURA, D. E., LANTTO, R., LILLE, M., ANDBERG, M., KRUIIS, K., BUCHERT, J. (2009). Laccase-aided protein modification: Effects on the structural properties of acidified sodium caseinate gels. **International Dairy Journal**, 19, 737-745.

DICKINSON, E (1992). **An introduction to food hydrocolloids**, Oxford, UK: University Press chapter 1.

DICKINSON, E. (1998). Proteins at interfaces and in emulsions: Stability, rheology and interactions. *Journal of the Chemical Society*, **Faraday Transactions**, 94, 1657-1669.

DICKINSON, E. (1999). Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**, 9, 305-312.

DICKINSON, E. (2003). Hydrocolloids at interface and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, 17, 25-39.

DICKINSON, E. (2006). Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 288, 3-11.

DICKINSON, E., GOLDING, M. (1997). Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, 191, 166-176.

DICKINSON, E., GOLDING, M., POVEY, M. J. W. (1997). Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**, 185, 515-529.

ELIOT, C., DICKINSON, E. (2003). Thermoreversible gelation of caseinate-stabilized emulsions at around body temperature. **International Dairy Journal**, 13, 679-684.

FÆRGEMAND, M., MURRAY, B. S, DICKINSON, E. (1997). Cross-Linking of milk proteins with transglutaminase at the oil-water interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 2514-2519.

FÆRGEMAND, M., OTTE, J., QVIST, K. B. (1998). Cross-Linking of Whey Proteins by Enzymatic Oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 1326-1333.

FOX, P. F., KELLY, A. L. The caseins. (2004). In: YADA, R. Y. **Proteins in food processing**. Washington: CRC Press, 29-62.

HUNTER, R. J. (1993). **Introduction to Modern Colloid Science**, Oxford University Press, Oxford, UK. 338 p.

KIISKINEN, L-L., VIIKARI, L., KRUUS, K. (2002). Purification and characterization of a novel laccase from the ascomyte melanocarpus albomyces. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, 198–204.

KOCHER, P. N., FOEGEDING, E. A. (1993). Microcentrifuge-based method for measuring water-holding of protein gels. **Journal of Food Science**, 58, 1040–1046.

KOHYAMA, K., NISHINARI, K. (1993). Rheological studies on the gelation process of soybean 7s and 11s proteins in the presence of glucono-delta-lactone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41, 8-14.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.685-689, 1970.

LANTTO, R., PUOLANNE, E., KALKKINEN, N., BUCHERT, J., AUTIO, K. (2005). Enzyme-aided modification of chicken-breast myofibril proteins: effect of laccase and transglutaminase on gelation and thermal stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 9231-9237.

LEHNINGER, A. L. (2006). **Princípios de bioquímica**. 4 ed: São Paulo. Sarvier.

LITTOZ, F., MCCLEMENTS, D. J. (2008). Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase. **Food Hydrocolloids**, 22, 1203-1211.

MA, H., FORSSELL, P., PARTANEN, R., BUCHERT, J., BOER, H. (2011). Improving laccase catalyzed cross-linking of whey protein isolate and their application as emulsifiers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 1406–1414.

MACEDO, J. A., CAVALLIERI, A. L. F., CUNHA, R. L., SATO, H. H. (2010). The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. **International Dairy Journal**, 20, 673-679.

MARTINS, L. O., SOARES, C. M., PEREIRA, M. M., TEIXEIRA, M., COSTA, T., et al. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the Bacillus subtilis endospore coat. **The Journal of Biological Chemistry**, 277, 18849–59.

MATTINEN, M. L., HELLMAN, M., PERMI, P., AUTIO, K., KALKKINEN, N., BUCHERT, J. (2006). Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 8883-8890.

MATTINEN, M. L., KRUUS, K., BUCHERT, J., NIELSEN, J. H., ANDERSEN, H. J., STEFFENSEN, C. L. (2005). Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides. **FEBS Journal**, 272, 3640-3650.

MAYER, A. M., STAPLES, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60, 551–565.

MCCLEMENTS, D. J. (2005) Food emulsions: principles, practice, and techniques. Washington: CRC Press.

MCCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A., PARK, Y., WEISS, J. (2009) Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 577–606.

MEWIS, J., MACOSKO, C. W. (1994). Suspension rheology. In: **Rheology: Principles, Measurements and Applications**, Macosko, C.W., Ed., VCH Publishers, New York, Chap. 10.

MINUSSI, R. C., PASTORE, G. M., DURAN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 205-216, 2002.

NEWSTEIN, M. C., WANG, H., BALSARA, N. P., LEFEBVRE, A. A., SHNIDMAN, Y., WATANABE, H., OSAKI, K., SHIKATA, T., NIWA, H., MORISHIMA, Y. (1999) Microstructural changes in a colloidal liquid in the shear thinning and shear thickening regimes. **Journal of Chemical Physics**, 111, 4827.

NORDE, W. (2003). Colloids and Interfaces in Life Sciences. New York: Marcel Dekker. Capítulo 18.

O'REGAN, J., MULVIHILL, D. M. (2009). Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate–maltodextrin conjugates. **Food Chemistry**, 115, 1257–1267.

OU, S., KWOK, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84, 1261-1269.

PARKINSON, E. L., DICKINSON, E. (2004). Inhibition of heat-induced aggregation of a  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized emulsion by very small additions of casein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 39, 23–30.

PERRECHIL F. de A. (2008). **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**. 117p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PERRECHIL, F. A., CUNHA, R. L. (2010). Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: Influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. **Journal of Food Engineering**, 97, 441–448.

ROEFS, S. M., VAN VLIET, T. (1990). Structure of acid casein gels. 1. Formation and model network. **Colloids and Surfaces**, 50, 141-159.

SANTANA R. de C. (2009). **Emulsões estabilizadas por colágeno: efeito da hidrólise térmica e do processo de homogeneização**, 111p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SANTANA, R. C., PERRECHIL, F. A., SATO, A. C. K., CUNHA, R. L. (2011). Emulsifying properties of collagen fibers: Effect of pH, protein concentration and homogenization pressure. **Food Hydrocolloids**, 25, 604-612.

SELINHEIMO, E., KRUUS, K., BUCHERT, J., HOPIA, A., AUTIO, K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. **Journal of Cereal Science**, 43, 152–159.

SELINHEIMO, E., LAMPILA, P., MATTINEN, M. L., BUCHERT, J. (2008). Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 3118-3128.

SGARBIERI, V. C. (1996). **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. Livraria Varela Ltda, São Paulo, p. 139-157.

STEFFENSEN, C. L., ANDERSEN, M. L., DEGN, P. E., NIELSEN, J. H. (2008). Cross-linking proteins by laccase-catalyzed oxidation: importance relative to other modifications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 12002-12010.

SURH, J., DECKER, E. A., MCCLEMENTS, D. J. (2006). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, 20, 596–606.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, 108-109, 303-318.

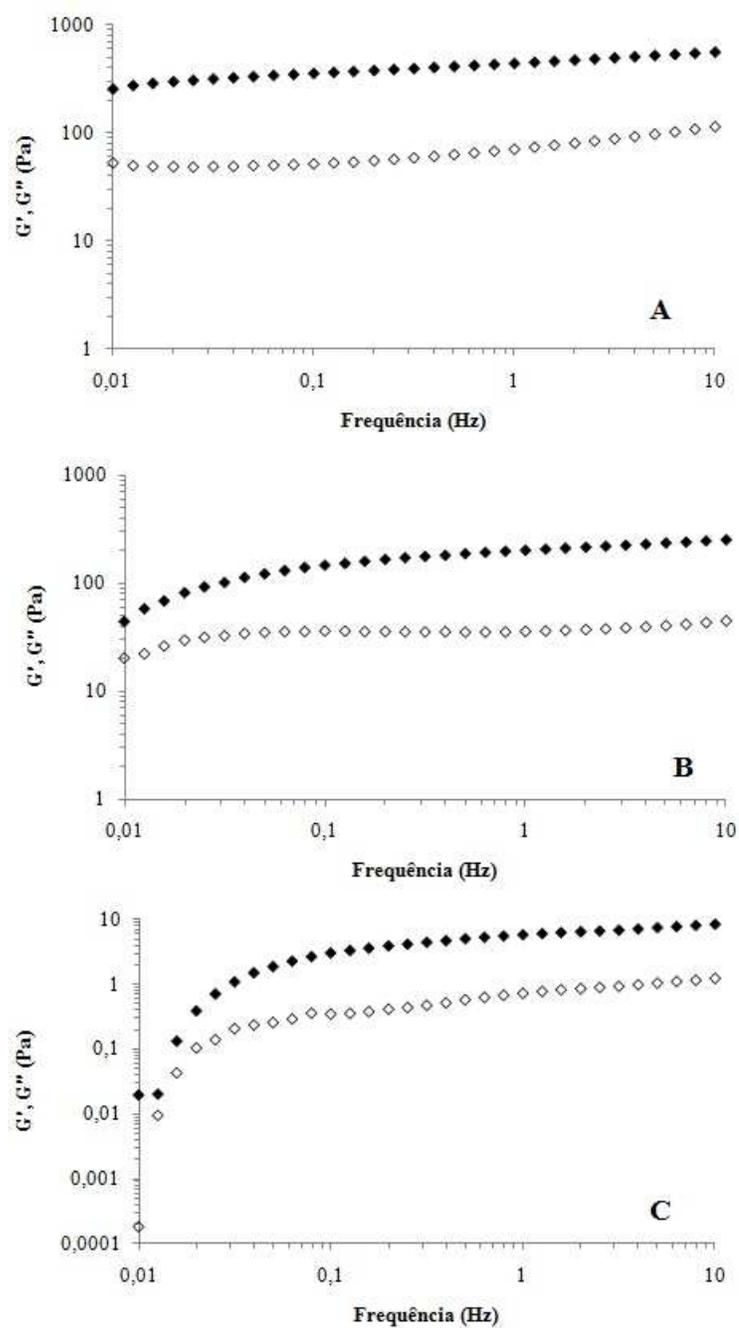
THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. (1994). **Microbiology**, 140, 19-26.

WONG, D. W. S; CAMIRAND, W. M.; PAVLATH, A.E. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v 36, p. 807-844.

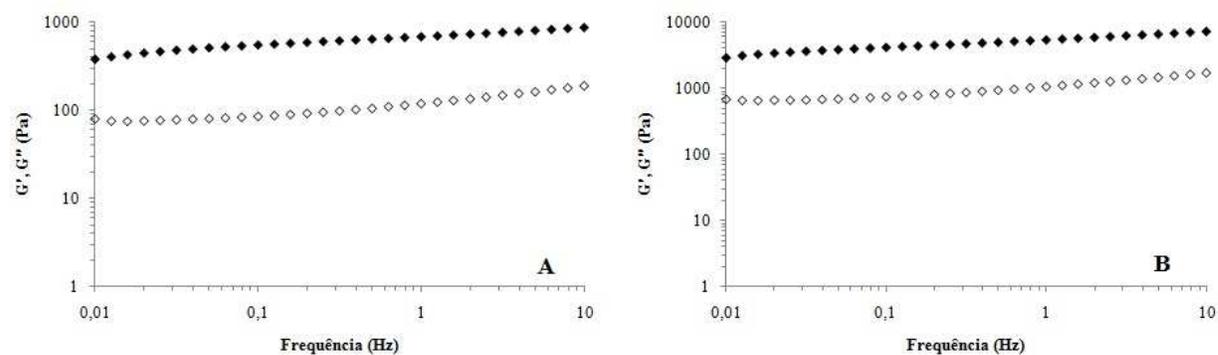


**ANEXO 1. Medidas reológicas das emulsões estabilizadas por 1 e 4 % (m/v)  
CN-Na em pH 3, 5 e 7**





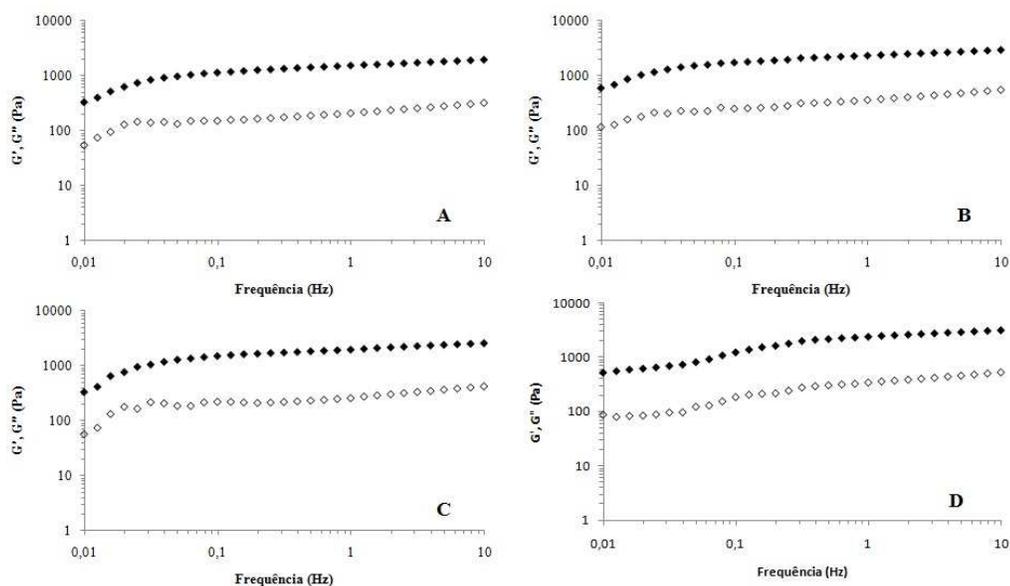
**Figura A.** Espectro mecânico de emulsão estabilizada com 1% de CN-Na. A) pH 3 (fase superior), B) pH 5 (fase superior) e C) pH 7. (♦) Módulo elástico ( $G'$ ) e (◇) Módulo viscoso ( $G''$ ).



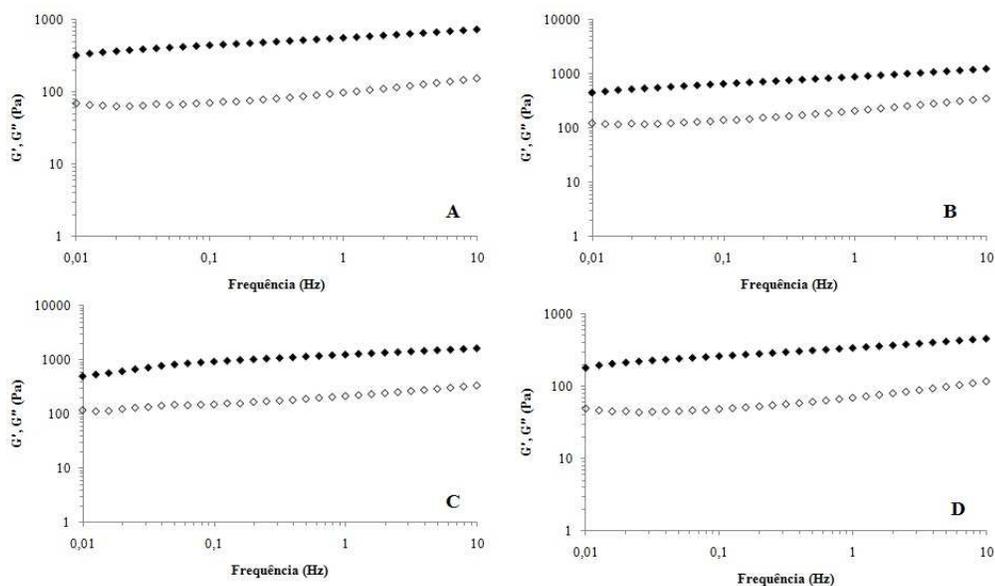
**Figura B.** Espectro mecânico de emulsão estabilizada com 4% de CN-Na. A) pH 3 e B) pH 5. (♦) Módulo elástico ( $G'$ ) e (◇) Módulo viscoso ( $G''$ ).

**ANEXO 2. Medidas reológicas das emulsões estabilizadas por 1 e 4 % (m/v)  
CN-Na tratadas enzimaticamente**

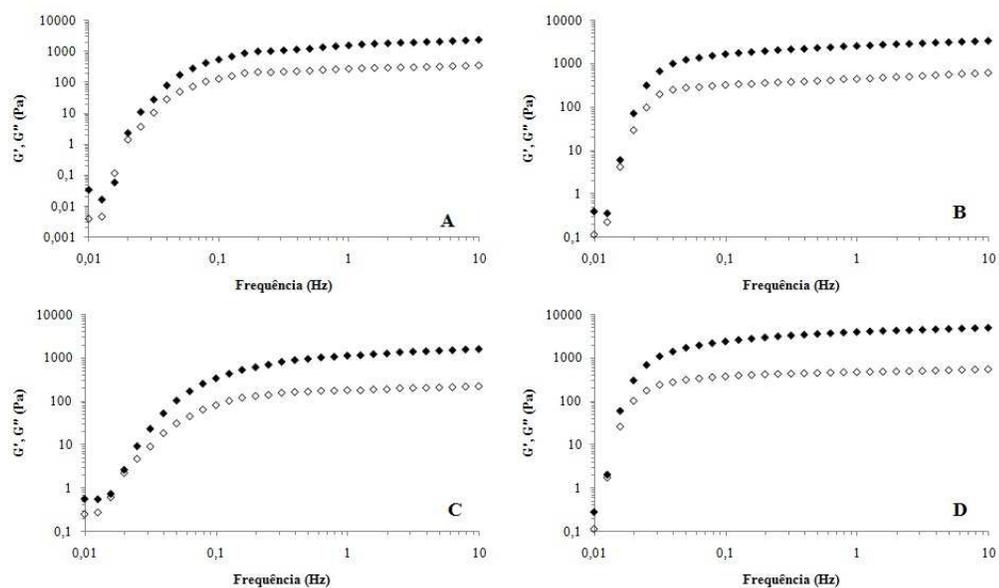




**Figura C.** Espectro mecânico de emulsões estabilizadas com 1% de CN-Na em pH 3. A) 10 mM AF (fase superior), B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC (fase superior), C) 5 mM AF (fase superior) e D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC. (♦) Módulo elástico ( $G'$ ) e (◇) Módulo viscoso ( $G''$ ).



**Figura D.** Espectro mecânico da fase superior de emulsões estabilizadas com 1% de CN-Na em pH 5. A) 10 mM AF, B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, C) 5 mM AF e D) 5 mM AF + 1 mg/mL LAC. (♦) Módulo elástico ( $G'$ ) e (◇) Módulo viscoso ( $G''$ ).



**Figura E.** Espectro mecânico da fase superior de emulsões estabilizadas com 4% de CN-Na em pH 7. A) 10 mM AF, B) 10 mM AF + 5 mg/mL LAC, C) 5 mM AF e D) 5 mM AF +1 mg/mL LAC. (♦) Módulo elástico ( $G'$ ) e (◇) Módulo viscoso ( $G''$ ).