



UNICAMP

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

Estabilidade e digestibilidade de emulsões contendo lecitina e proteínas do soro

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP) para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Raphaela de Araujo Mantovani

Engenheira de Alimentos, 2009 (UNICAMP)

Prof.^a Dr.^a Rosiane Lopes da Cunha

ORIENTADORA

Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

CO-ORIENTADOR

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida por Raphaela de Araujo Mantovani, aprovada pela comissão julgadora em __/__/____ e orientada pela Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha.

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M319e Mantovani, Raphaela de Araujo, 1986-
Estabilidade e digestibilidade de emulsões contendo
lecitina e proteínas do soro / Raphaela de Araujo
Mantovani. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha.
Coorientador: Ângelo Luiz Fazani Cavallieri.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas do soro. 2. Lecitina. 3. Interações
eletrostáticas. 4. Emulsões. 5. Estabilidade. I.
Cunha, Rosiane Lopes da. II. Cavallieri, Ângelo Luiz
Fazani. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Stability and digestibility of emulsions containing lecithin and
whey proteins

Palavras-chave em inglês:

Whey proteins

Lecithin

Electrostatic interactions

Emulsion

Stability

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Rosiane Lopes da Cunha [Orientador]

Ana Carla Kawazoe Sato

Izabel Cristina Freitas Moraes

Data da defesa: 03/04/2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

TITULAR

Dra. Ana Carla Kawazoe Sato

TITULAR

Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes

TITULAR

Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes

SUPLENTE

Profa. Dra. Flávia Maria Netto

SUPLENTE

**À minha família, pelo apoio e incentivo
em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha família e realizações.

Aos meus pais, Adauto e Geni, pelo apoio incondicional. Obrigada por tudo, em especial, pelos ensinamentos passados e por vibrarem a cada conquista alcançada.

Às minhas irmãs, Michelle e Nathane, pelo companheirismo, incentivo, apoio e pela torcida em todos os momentos.

Aos meus bebês, Pérola, Meg e Kiarah, pelo companheirismo e alegria incessante.

Agradeço a todos vocês por fazerem parte do meu dia a dia e da minha vida.

À Prof^a Rosiane Lopes da Cunha por acreditar em mim, pelas orientações, disponibilidade e paciência e ao Prof. Angelo Luiz Fazani Cavallieri pela co-orientação e pelo auxílio desde os tempos de iniciação científica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório de Engenharia de Processos, em especial à Joicinha, Rejane, Kátia e Fezinha, pelo auxílio no laboratório, sugestões e pelo agradável ambiente de trabalho.

À banca examinadora por contribuírem para a melhoria deste trabalho através das valiosas sugestões e correções.

À UNICAMP, funcionários e professores por viabilizarem a realização deste projeto.

Às minhas amigas, em especial à Glaucia, pela amizade neste período apesar da distância.

Aos meus tios e primos e por fim, a todos aqueles que fizeram parte da minha vida e contribuíram para esta conquista.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
RESUMO GERAL.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
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. Proteínas	9
2.2.1. Proteínas do soro de leite bovino.....	9
2.3. Lecitina.....	11
2.4. Adsorção da mistura de emulsificantes.....	12
2.4.1. Interações entre lecitina e proteínas.....	13
2.5. Processo de emulsificação.....	14
2.5.1. Homogeneização a alta pressão.....	15
2.6. Digestão lipídica	16
Capítulo 3 . MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material	21
3.2. Método.....	21
3.2.1. Preparo e caracterização das misturas de emulsificantes.....	21
3.2.2. Preparo das emulsões.....	22
3.2.2.1. Preparo das soluções estoque de isolado protéico de soro (WPI).....	22
3.2.2.2. Preparo das soluções de lecitina (Lec)	22
3.2.2.3. Preparo das emulsões	22
3.2.2.4. Simulação <i>in vitro</i> das condições químicas de digestão.....	24
3.2.3. Análises.....	25
3.2.3.1. Estabilidade das emulsões à cremeação	25
3.2.3.2. Microscopia óptica	26
3.2.3.3. Distribuição de tamanho das gotas ou partículas	26
3.2.3.4. Potencial zeta	27
3.2.3.5. Medidas Reológicas	27

3.2.3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	28
3.2.4. Análises Estatísticas.....	29
Capítulo 4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
Parte 1. Estudo das interações entre os emulsificantes em sistemas aquosos	31
4.1. Efeito do pH nas propriedades das proteínas de soro do leite e da lecitina.....	33
4.2. Concentração de saturação de lecitina na formação de complexos	38
Parte 2. Emulsões O/A estabilizadas por proteínas do soro e/ou lecitina	43
4.3. Caracterização das proteínas do soro utilizadas como agente emulsificante	45
4.4. Emulsões estabilizadas em pH abaixo do pI das proteínas do soro.....	47
4.4.1. Estabilidade à cremeação	47
4.4.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas	48
4.4.3. Carga superficial.....	52
4.4.4. Reologia	53
4.4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	56
4.5. Emulsões estabilizadas em pH próximo ao pI das proteínas do soro	58
4.5.1. Estabilidade à cremeação	58
4.5.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas	59
4.5.3. Carga superficial.....	63
4.5.4. Reologia	64
4.5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	66
4.6. Emulsões estabilizadas em pH acima do pI das proteínas do soro	69
4.6.1. Estabilidade à cremeação	69
4.6.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas	69
4.6.3. Carga superficial.....	73
4.6.4. Reologia	73
4.6.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	75
4.7. Efeito do pH na estabilidade das emulsões estabilizadas por lecitina e/ou WPI.....	77
4.8. Simulação de digestão <i>in vitro</i> em emulsões contendo lecitina e/ou WPI.....	79
4.8.1. Digestão gástrica.....	79
4.8.1.2. Estabilidade.....	79
4.8.1.3. Diâmetro e distribuição do tamanho de gota	80
4.8.2. Digestão entérica	82
4.8.2.1. Estabilidade.....	82

4.8.2.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gota	83
4.8.2.3. Carga superficial	86
Capítulo 5 . CONCLUSÕES GERAIS.....	89
Capítulo 6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Diâmetros médios de gota (d_{32}) em μm de emulsões em pH 3 contendo lecitina e proteínas do soro.....	50
Tabela 4.2. Potencial ζ (mV) de emulsões em pH 3 com 30% (m/m) de óleo de soja contendo lecitina e proteína do soro em diferentes razões.....	53
Tabela 4.3. Viscosidade Newtoniana (η), viscosidade aparente na taxa de deformação de 100s^{-1} ($\eta_{100\text{s}^{-1}}$) e índices de consistência (k) e de comportamento (n) de emulsões em pH 3 contendo lecitina e proteína do soro.....	55
Tabela 4.4. Diâmetros médios de gota (d_{32}) em μm de emulsões em pH 5,5 contendo lecitina e proteína do soro.....	61
Tabela 4.5. Potencial ζ (mV) de emulsões em pH 5,5 com 30% (m/m) de óleo de soja contendo lecitina e proteína do soro em diferentes razões.....	64
Tabela 4.6. Viscosidade Newtoniana (η), viscosidade aparente na taxa de deformação de 100s^{-1} ($\eta_{100\text{s}^{-1}}$) e índices de consistência (k) e comportamento (n) de emulsões em pH 5,5 contendo lecitina e proteína do soro.....	65
Tabela 4.7. Diâmetro médio de gota (d_{32}) em μm de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro.....	71
Tabela 4.8. Potencial ζ (mV) de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro em diferentes razões.....	73
Tabela 4.9. Viscosidade Newtoniana (η) de emulsões em pH 7 com 30% (m/m) de óleo de soja contendo lecitina e proteína do soro.....	74
Tabela 4.10. Diâmetros médios de gota (μm) de emulsões contendo lecitina e proteína do soro e homogeneizadas a 450 bar antes e após a incubação em condições gástricas.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1. Esquema dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/A. Fonte: McClements (2005).8
- Figura 3.1. Fluxograma para obtenção das emulsões estabilizadas por lecitina e WPI nas razões de 1:0, 1:1 e 0:124
- Figura 4.1. Efeito do pH na densidade de carga superficial (potencial ζ) de soluções aquosas contendo WPI (0,05% m/m), suspensões de lecitina (0,05% m/m), ou suas misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina). (a) Potencial ζ versus pH sendo (\blacklozenge) WPI, (\odot) lecitina e (\square) misturas; (b) o produto dos potenciais ζ dos sistemas puros de WPI e lecitina versus pH.34
- Figura 4.2. Efeito do pH no diâmetro médio de partículas (d_{32}) de (\blacksquare) suspensões de lecitina (0,05% m/m) e (\blacksquare) das misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes condições de pH e composições iguais. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre composições distintas para um mesmo pH. 36
- Figura 4.3. Curvas de distribuição de tamanho em função da fração volumétrica das partículas de (\square) suspensões de lecitina (0,05% m/m) e (\blacklozenge) das misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina) em diferentes condições de pH (3; 5,5 e 7). O destaque na parte superior indica a fração volumétrica de partículas menores que $6\mu\text{m}$ para os diferentes valores de pH sendo (\square) lecitina (0,05% m/m) e (\blacksquare) misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes condições de pH e composições iguais. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre composições distintas para um mesmo pH.38
- Figura 4.4. Efeito da concentração de lecitina na formação de complexos proteínas do soro-lecitina. (\blacksquare) Diâmetro médio de partículas (d_{32}) e (\square) carga superficial elétrica (potencial ζ) das misturas de biopolímeros contendo 0,05% m/m de WPI.40
- Figura 4.5. Curvas de distribuição de tamanho em função da fração volumétrica de partículas dos sistemas em pH 3. (\square) Suspensão de lecitina pura (0,05% m/m) e das misturas de proteínas do soro (0,05% m/m) e lecitina em diferentes concentrações: (\triangle) 0,025 %, (\blacklozenge) 0,05% e (\times) 0,1% m/m.41
- Figura 4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das soluções contendo 2% (m/m) de WPI. (A) SDS PAGE - não redutor, (B) SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente.....46

- Figura 4.7. Estabilidade à cremeação após 7 dias de estocagem. Emulsões com fase aquosa em pH 3 estabilizadas por lecitina : WPI nas razões de (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 e homogeneizadas a (P1) 250 bar, (P2) 450 bar e (P3) 600 bar.....48
- Figura 4.8. Índice de cremeação (IC) de emulsões em pH 3 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square) 1:1 e (\triangle) 1:0. Símbolo cheio: 250 bar, hachurado: 450 bar e vazio: 600 bar.....48
- Figura 4.9. Micrografia das emulsões em pH 3 contendo lecitina (Lec) e/ou WPI após 7 dias de estocagem. Barra da escala = 10 μ m.49
- Figura 4.10. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota das emulsões em pH 3 estabilizadas por lecitina e WPI em diferentes razões. t0: (—) 0:1, (—) 1:1 e (—) 1:0. t7: (.....) 0:1, (.....) 1:1 e (.....) 1:0.....51
- Figura 4.11. Curvas de escoamento de emulsões em pH 3 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square)1:1 (fase superior), (\odot)1:1 (fase inferior) e (\triangle) 1:0. Símbolo vazio: 250 bar, hachurado: 450 bar e cheio: 600 bar.54
- Figura 4.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das emulsões e m pH 3 contendo lecitina (L) e WPI (W) nas razões 0:1 e 1:1. (A) SDS PAGE - não redutor, (B) SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, Coluna 2: solução de WPI em pH 3. P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente. FS: fase superior e FI: fase inferior.....57
- Figura 4.13. Estabilidade à cremeação após 7 dias de estocagem. Emulsões com fase aquosa em pH 5,5 estabilizadas por lecitina e WPI nas razões de (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 e homogeneizadas a (P1) 250 bar, (P2) 450 bar e (P3) 600 bar.58
- Figura 4.14. Índice de cremeação (IC) de emulsões em pH 5,5 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square) 1:1 e (\triangle) 1:0. Símbolo cheio: 250 bar, hachurado: 450 bar e vazio: 600 bar.59
- Figura 4.15. Micrografia das emulsões em pH 5,5 contendo lecitina (Lec) e/ou WPI após 7 dias de estocagem. Barra da escala = 10 μ m.60
- Figura 4.16. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões em pH 5,5 estabilizadas por lecitina e WPI em diferentes razões. t0: (—) 0:1, (—) 1:1 e (—) 1:0. t7: (.....) 0:1, (.....) 1:1 e (.....) 1:0.....63
- Figura 4.17. Curvas de escoamento de emulsões em pH 5,5 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square) 1:1 e (\triangle) 1:0. Símbolo vazio: 250bar, hachurado: 450 bar e cheio: 600 bar.....65
- Figura 4.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das emulsões em pH 5,5 contendo lecitina (L) e WPI (W) nas razões 0:1 e 1:1. (A) SDS PAGE - não redutor, (B)

- SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, Coluna 2: solução de WPI em pH 3. P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente.68
- Figura 4.19. Estabilidade à cremeação após 7 dias de estocagem. Emulsões em pH 7 estabilizadas por lecitina e WPI nas razões de (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 e homogeneizadas a (P1) 250 bar, (P2) 450 bar e (P3) 600 bar.....69
- Figura 4.20. Micrografia das emulsões em pH 7 contendo lecitina (Lec) e/ou WPI após 7 dias de estocagem. Barra da escala = 10 μ m.71
- Figura 4.21. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões em pH 7 estabilizadas por lecitina e WPI em diferentes razões. No dia do preparo (0 dias): (—) 0:1, (—) 1:1 e (—) 1:0. Após 7 dias de estocagem: (.....) 0:1, (.....) 1:1 e (.....) 1:0.....72
- Figura 4.22. Curvas de escoamento de emulsões em pH 7 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square) 1:1 e (\triangle) 1:0. Símbolo vazio: 250 bar, hachurado: 450 bar e cheio: 600 bar.....74
- Figura 4.23. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das emulsões e m pH 7 contendo lecitina (L) e WPI (W) nas razões 0:1 e 1:1. (A) SDS PAGE - não redutor, (B) SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, Coluna 2: solução de WPI em pH 7. P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente.76
- Figura 4.24. Aspecto visual típico para emulsões contendo lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 após simulação de digestão gástrica.....80
- Figura 4.25. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões estabilizadas por lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0. Antes da digestão: (—) pH 3, (—) pH 5,5 e (—) pH 7. Após digestão gástrica: (.....) pH 3, (.....) pH 5,5 e (.....) pH 7.....82
- Figura 4.26. Aspecto visual típico para emulsões contendo lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 após simulação de digestão entérica83
- Figura 4.27. Micrografias de emulsões contendo lecitina e WPI em diferentes razões (I) anteriormente e após etapas de digestão (II) gástrica e (III) entérica. Barra da escala = 10 μ m.....84
- Figura 4.28. Diâmetro médio de gota (μ m) de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro. (\square) Emulsão, (\blacksquare) digestão gástrica e (\blacksquare) digestão entérica. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes composições e mesma etapa do processo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes etapas do processo e uma mesma composição.85

Figura 4.29. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões em pH 7 estabilizadas por lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0. (□) Emulsão, (×) após digestão gástrica e (◆) após digestão entérica.86

Figura 4.30. Potencial ζ de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro. (□) Emulsão e (■) após a digestão entérica. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes composições e mesma etapa do processo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) antes e após o processo digestivo para uma mesma composição.88

RESUMO GERAL

As proteínas do soro do leite (WPI) e lecitina de soja são amplamente utilizadas em alimentos devido às suas excelentes propriedades emulsificantes. Este trabalho visou avaliar as propriedades emulsificantes da mistura de WPI e lecitina em diferentes condições de pH e concentração dos ingredientes. A primeira etapa consistiu no estudo das interações entre os emulsificantes em meio aquoso em diferentes razões WPI:lecitina e condições de pH. Os resultados mostraram que na razão 1:1 e em pH abaixo do pI da proteína, no qual os emulsificantes encontravam-se opostamente carregados, foi favorecida a formação de complexos eletrostáticos. Na segunda etapa, emulsões O/A contendo proteínas do soro e/ou lecitina foram avaliadas através da estabilidade à cremação, microestrutura, distribuição do tamanho de gota, densidade de carga superficial, reologia, eletroforese em gel de poliacrilamida e digestão *in vitro*, verificando-se a influência do pH e da pressão de homogeneização. As emulsões estabilizadas somente por proteínas apresentaram separação de fases e comportamento não-Newtoniano somente em pH próximo ao pI. As emulsões contendo somente lecitina não separaram de fases e apresentaram comportamento Newtoniano. Os sistemas em pH abaixo do pI, contendo a mistura de emulsificantes apresentaram elevada instabilidade cinética devido à forte interação eletrostática entre os componentes. No entanto, em pH próximo ao pI da prote, a interação foi favorável e levou ao aumento da estabilidade das emulsões e a menores tamanhos de gota, resultando em fluidos pouco viscosos. O aumento da pressão de homogeneização, em emulsões com pH próximo e acima do pI favoreceu a formação de agregados de alta massa molecular, o que não foi observado em pH mais ácido. Também não foi notada a formação de agregados na presença de lecitina em nenhuma das condições de pH. Os ensaios de eletroforese deram indícios de que a interação entre os emulsificantes levou a modificações na estrutura das proteínas e revelaram maior afinidade da lecitina com a α -lactoalbumina (α -la). Finalmente, na etapa de

simulação do processo de digestão as proteínas mostraram-se mais resistentes, uma vez que a presença de lecitina promoveu a liberação do óleo da emulsão logo no início da etapa gástrica. De maneira geral, a utilização das proteínas do soro juntamente com a lecitina como emulsificante levou a resultados satisfatórios pois permitiu o desenvolvimento de sistemas estáveis à cremeação em diferentes valores de pH, inclusive em pH próximo ao pI, e consideravelmente resistentes às condições adversas do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: proteínas do soro, lecitina, interação eletrostática, emulsões, estabilidade, reologia, digestibilidade.

ABSTRACT

Whey proteins (WPI) and soybean lecithin are widely used in food due to its excellent emulsifying properties. This study aimed to evaluate the emulsifying properties of the mixture of whey protein and lecithin at different conditions of pH and concentration of ingredients. Firstly, the interactions between emulsifiers in an aqueous medium at different ratios (WPI:lecithin) and pH conditions were studied. The results showed that at mixing ratio of 1:1 and at pH below the isoelectric point of the protein (pI) in which the emulsifiers were oppositely charged, was favored the formation of electrostatic complexes. Afterwards, O/W emulsions containing WPI and/or lecithin were prepared and the influence of pH and pressure homogenization were studied. Stability, microstructure, droplet size distribution, surface charge density, rheology, electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and digestion *in vitro* were evaluated. The emulsions stabilized by proteins showed phase separation and non-Newtonian behavior only in pH close to the pI. The emulsions containing only lecithin were stable and showed Newtonian behavior. Systems containing the mixture of emulsifiers at pH below the pI showed high kinetic instability due to the strong electrostatic interactions between the components. However, at pH close to the pI the interaction was favorable and led to an increase of the emulsion stability and to smaller droplet sizes, resulting in lower viscosities. When the pressure homogenization was increased, emulsions at a pH close to and above the pI favored the formation of high molecular weight protein aggregates which was not observed in emulsions at lower pH. In the presence of lecithin, protein aggregates were not formed in any of the pH conditions. The SDS-PAGE analysis showed that the interaction between emulsifiers led to modifications in the structure of proteins and indicated a higher affinity of lecithin to α -lactalbumin (α -la). Finally, proteins were more resistant to digestion, since the presence of lecithin promoted release of oil emulsion at the beginning of gastric step. In general, the use of whey protein with lecithin as emulsifier led to satisfactory results

because it allowed the development of stable emulsions to creaming at different pH values, even at pH close to the pI, and substantially resistant to the adverse conditions of the gastrointestinal tract.

Keywords: whey proteins, lecithin, electrostatic interaction, emulsions, stability, rheology, digestibility

Capítulo 1 . INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

Uma ampla variedade de produtos alimentícios é constituída parcial ou integralmente por emulsões como o leite, o iogurte, molho para saladas, maionese, sorvete e muitos outros. Emulsões óleo em água (O/A) apresentam elevado potencial para a encapsulação de compostos bioativos, porém tratam-se de sistemas termodinamicamente instáveis, que podem apresentar separação dos componentes em fases distintas. O processo de homogeneização em altas pressões possibilita a formação de emulsões com reduzido tamanho de gota e é capaz de promover uma maior distribuição dos componentes emulsificantes sobre a interface das gotas formadas melhorando a sua estabilidade cinética (McClements, 2005).

Proteínas do soro do leite são consideradas como emulsificantes naturais (Kiokias et al., 2007) devido à sua capacidade de alterar as propriedades da interface das gotas de óleo dispersas, aumentando sua estabilidade frente à processos de cremação (Hu et al., 2003). No entanto, seu uso é limitado devido à elevada sensibilidade das proteínas frente às condições de pH e força iônica. Neste caso, interações com a lecitina, uma mistura de fosfolípídeos predominantemente aniônica, podem levar a mudanças na atividade de superfície da proteína, além de modificar sua estrutura e carga superficial (Comas et al., 2006). A lecitina também é considerada um importante emulsificante natural que tem a capacidade de formar ligações de hidrogênio com a água, além de interações com compostos não polares como os triacilgliceróis (Shukat e Relkin, 2011).

Um benefício potencial de sistemas de encapsulação deste tipo é que estes podem ser fabricados inteiramente a partir de ingredientes naturais considerados seguros (GRAS) (lipídios, proteínas, fosfolípídeos) e a partir de operações de processo relativamente simples (homogeneização a altas pressões ou agitação). Além disso, dependendo do tamanho e composição das gotas, bem como da estrutura e propriedades físico-químicas da camada interfacial, seria viável a produção de emulsões com diferenciadas propriedades físico-

químicas e sensoriais, bem como controlar as condições de liberação do óleo no trato gastrointestinal. Porém, as alterações nas características moleculares das proteínas globulares devido à interação com surfactantes podem levar a mudanças das suas características funcionais (Kelley e McClements, 2003). Dessa forma, é importante verificar a origem e natureza das interações proteína-surfactante e sua influência na funcionalidade da proteína, de forma a produzir emulsões estáveis e com características adequadas à sua finalidade.

1.2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar emulsões O/A estabilizadas por diferentes ingredientes naturais com atividade de superfície (proteínas do soro e/ou lecitina), avaliando a interação entre eles nas propriedades da emulsão.

Com este intuito, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- estudar as interações entre as proteínas do soro de leite e lecitina em diferentes condições de processo (pH e concentração dos ingredientes);
- avaliar a capacidade de estabilização das proteínas do soro e/ou lecitina em emulsões em diferentes condições do meio (pH) e processo (pressão de homogeneização);
- avaliar a digestibilidade das emulsões em condições do trato gastrointestinal.

Capítulo 2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Emulsões

Uma emulsão é composta por dois fluidos imiscíveis (usualmente óleo e água), com um deles disperso no outro na forma de pequenas gotas esféricas. Um sistema que consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase contínua aquosa é chamado emulsão óleo em água (O/A), como é o caso do leite, maionese, sopas e molhos (McClements, 2005).

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis do ponto de vista físico-químico devido à energia livre positiva necessária para aumentar a área entre as fases aquosa e oleosa. Além disso, a diferença de densidades entre as fases também favorece a separação de duas fases imiscíveis cuja velocidade (rápida ou lenta) depende da sua estabilidade cinética. Particularmente, para emulsões O/A existem diversos mecanismos de desestabilização. Os principais são a cremação, a sedimentação, a flocculação e coalescência, sendo que os dois primeiros são fenômenos de migração das gotas e os últimos são processos de variação do tamanho de gota (Figura 2.1) (McClements, 2005; Comas et al., 2006). A cremação ocorre quando a densidade das gotas é menor do que a fase contínua. Já na sedimentação, a densidade das gotas é maior do que a da fase contínua, ocorrendo a sua deposição. A flocculação consiste na associação das gotas em flocos, mantendo a sua integridade individual. A coalescência é o processo pelo qual duas ou mais gotas se fundem para formar uma única gota maior (McClements, 2005).

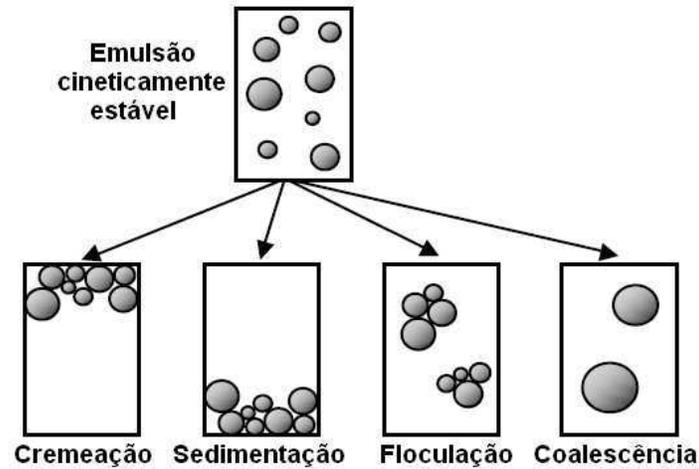


Figura 2.1. Esquema dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/A. Fonte: McClements (2005).

Por se tratarem de sistemas termodinamicamente instáveis, informações sobre a estabilidade cinética das emulsões são importantes para o desenvolvimento de produtos que apresentem propriedades desejáveis por um período de tempo suficientemente longo (Dickinson, 1992). Assim, emulsões estáveis por períodos consideráveis de tempo (semanas a anos) precisam ter a adição de substâncias químicas chamadas de emulsificantes e/ou estabilizantes e, em muitos casos, utilizar forças mecânicas (processo de homogeneização) para que ocorra a diminuição do tamanho de gotas (McClements, 2005). Emulsificantes são moléculas com atividade de superfície que se adsorvem na superfície das gotas dispersas, logo após estas terem sido formadas no processo de homogeneização. Uma vez presentes na superfície da gota, tais moléculas atuam reduzindo a tensão interfacial e formando uma membrana protetora em sua superfície, prevenindo a agregação das gotas (McClements, 2005). Existem duas grandes classes de agentes emulsificantes usadas no processamento de alimentos: surfactantes de baixa massa molecular (monoglicerídeos, polissorbatos, lecitina, etc.) e emulsificantes macromoleculares (geralmente proteínas, como as do leite e do ovo). Já os estabilizantes são definidos como componentes que conferem estabilidade às emulsões

através de modificação das propriedades da fase aquosa contínua, com o aumento da viscosidade ou mesmo a gelificação (Dickinson, 2003).

2.2. Proteínas

As proteínas apresentam grande aplicação na formulação de produtos alimentícios principalmente devido a algumas propriedades funcionais importantes tais como capacidade espumante, emulsificante e gelificante (Sgarbieri, 1996). Em especial, as propriedades emulsificantes das proteínas são resultado da sua capacidade de redução da tensão interfacial através da sua adsorção na interface óleo-água e da sua habilidade de formação de filmes através de uma combinação de interações eletrostáticas e estéricas (McClements, 2005).

As propriedades funcionais das proteínas são determinadas pelas suas características moleculares como massa molecular, conformação, flexibilidade, polaridade e hidrofobicidade (McClements et al., 2009). A eficiência de emulsificantes protéicos depende fortemente da densidade e estrutura das camadas de adsorção da proteína na superfície das gotas. Em geral, o processo de adsorção das moléculas de proteína consiste em pelo menos dois estágios: (1) ligação das moléculas na interface; (2) rearranjo estrutural das moléculas adsorvidas com possível desdobramento parcial e formação de ligações intermoleculares (Tcholakova et al., 2006). 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).

2.2.1. Proteínas do soro de leite bovino

As proteínas do soro de leite são muito utilizadas como emulsificantes/estabilizantes (Guzey e McClements, 2006; Walstra, 2003), além de possuir alto valor nutricional e serem consideradas seguras (GRAS) (Chen et al., 2006). Trata-se de proteínas globulares que

possuem habilidade de desnaturar, dissociar e agregar sob diferentes condições de pH, força iônica e temperatura, possibilitando a formação de partículas em uma ampla faixa de tamanhos (Chen et al., 2006).

As principais frações protéicas do soro incluem a β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactalbumina (α -La) e a albumina bovina sérica (BSA), cujos valores de ponto isoelétrico correspondem a 5,2, 4,2 e 4,7, respectivamente (De Wit, 1998). O ponto isoelétrico das proteínas do soro está em torno de 5,1 que é próximo ao ponto isoelétrico da β -Lg cuja quantidade é maior frente às demais frações protéicas (Livney, 2010).

A β -Lg, proteína mais abundante do soro de leite, corresponde a mais de 50% do teor protéico total. Trata-se de uma proteína globular que possui em sua estrutura duas pontes dissulfídicas e um grupo tiol livre (Sawyer et al., 2002). Vários modelos com diferentes graus de complexidade vêm sendo propostos para explicar a desnaturação térmica da β -Lg. O mais aceito envolve a dissociação dos dímeros em monômeros seguido da perda da estrutura globular e agregação por formação de pontes dissulfídicas e interações não covalentes intra ou intermoleculares (Hong e Creamer, 2002).

A α -La é a segunda proteína mais abundante do soro, representando 20% do total. Sua molécula tem a forma elipsóide e apresenta 4 ligações dissulfídicas, embora estas não sejam essenciais para manter sua estrutura (Sgarbieri, 2005) e, além disso, não possui grupos sulfidrilas livres (Morr e Ha, 1993). Muitos autores relatam que a α -La sozinha não forma agregados sob aquecimento (Havea et al., 2001, Hong e Creamer, 2002), sendo a presença de proteínas com grupos tiol livre, como a β -lg ou a BSA, um pré-requisito para induzir a formação destes agregados (Roefs e De Kruif, 1994).

A albumina bovina sérica (BSA) é uma proteína globular solúvel em água (Sgarbieri, 2005). Duas características estruturais importantes da BSA são a presença de grupo sulfidrilas livre e a existência de 17 pontes dissulfeto (Morr e Ha, 1993). O rompimento dessas ligações

resulta em modificações de algumas de suas propriedades físicas e estruturais (Sgarbieri, 2005).

As proteínas do soro combinam a habilidade para estabilizar emulsões, devido à repulsão eletrostática entre gotas carregadas, com a capacidade de interagir com biopolímeros de carga oposta. Porém, tal estabilidade é reduzida quando o pH se aproxima do pI e/ou a força iônica torna-se elevada (Livney, 2010). Assim, o pH pode modificar o comportamento de atividade superficial e as interações hidrodinâmicas entre as gotas de óleo em emulsões estabilizadas por estes componentes (McClements, 2005; Comas et al., 2006).

2.3. Lecitina

Os fosfolipídios são emulsificantes de baixa massa molecular muito utilizadas na indústria de alimentos quando não-iônicos ou aniônicos, já que, devido à toxicidade, os catiônicos não podem ser utilizados (Leser et al., 2006). A lecitina é um fosfolipídio negativamente carregado amplamente utilizado devido às suas propriedades emulsificantes, uma vez que possui a capacidade de se adsorver rapidamente na superfície das gotas de óleo formadas durante processos de homogeneização convencionais, resultando assim em emulsões com gotas muito pequenas e protegendo-as contra a agregação durante o processamento, estocagem e utilização da emulsão (Ogawa et al., 2003). De acordo com Ogawa et al. (2004), o valor do pKa dos grupos fosfato aniônicos na lecitina é tipicamente em torno de 1,5.

A lecitina pode ser extraída de uma variedade de fontes tais como grãos de soja e gema de ovo, sendo assim considerada um tensoativo de ocorrência natural (Surn et al., 2008). A lecitina de soja natural ou modificada tem sido incluída em diversos processos devido à sua versatilidade, podendo atuar como emulsificantes, reguladores de viscosidade e agentes dispersantes em alimentos como chocolate, produtos instantâneos (leite em pó),

margarinas e maionese. (McClements, 2005; Comas et al., 2006). Além disso, pode ser totalmente biodegradada e metabolizada, sendo assim não-tóxica (Surn et al., 2008).

2.4. Adsorção da mistura de emulsificantes

Quando uma mistura de compostos com atividade de superfície encontra uma interface, ambos podem competir pelo mesmo espaço ou interagir entre si de forma sinérgica, dependendo das suas características moleculares. Proteínas, assim como surfactantes de baixa massa molecular (lecitina), podem se adsorver na interface diminuindo a tensão interfacial. Porém, devido à sua elevada massa molecular, as proteínas difundem mais lentamente para a interface. As moléculas de proteína encontram-se dobradas quando em solução, sendo que os aminoácidos hidrofóbicos tendem a se situar no centro do glóbulo, permanecendo distante da água, enquanto os aminoácidos hidrofílicos permanecem na sua superfície. Quando a proteína alcança uma interface, ela se desdobra parcialmente, expondo seus grupos hidrofóbicos para a fase não aquosa e reduzindo a energia livre do sistema. Assim, no caso de uma solução contendo proteína e surfactante de baixa massa molecular, é mais provável que o surfactante prevaleça na interface após o equilíbrio, desde que a concentração seja suficientemente alta. Isto ocorre pois surfactantes de baixa massa molecular são muito menores além de possuírem estruturas mais simples que as proteínas, podendo reduzir a tensão interfacial mais eficientemente pela adsorção de um número muito maior de moléculas dentro de uma mesma área superficial (Pugnali et al., 2004).

Já os surfactantes iônicos podem também interagir diretamente com proteínas ligando-se a elas através de diferentes mecanismos físico-químicos, o que pode levar a mudanças na conformação da proteína. Neste caso, os grupos carregados dos surfactantes poderiam se ligar eletrostaticamente aos grupos de carga oposta da superfície da proteína. Outra possibilidade seria a interação hidrofóbica da cauda apolar do surfactante nas regiões não-polares da

proteína. Uma vez que o surfactante se liga à proteína, ele pode tanto estabilizar quanto desestabilizar sua estrutura, além da possibilidade de promover agregação protéica dependendo do tipo, concentração do surfactante e condições do meio (Kelley e McClements, 2003).

2.4.1. Interações entre lecitina e proteínas

Comas et al. (2004) verificaram que a presença de fosfolipídeos em macroemulsões O/A diminuiu a taxa de cremação, aumentando a atividade emulsificante em sistemas contendo proteína de soja nativa ou desnaturada termicamente. Estudos realizados posteriormente constataram que o pH (2 - 6,2) consiste em um importante fator na atividade emulsificante de misturas contendo proteínas e lecitina, sendo que em valores mais baixos de pH a lecitina pode exercer um efeito negativo na estabilização do sistema (Comas et al., 2006). Shukat e Relkin (2011) investigaram as características estruturais de nanoemulsões contendo lipídios na forma cristalina, estabilizadas por proteínas do soro e/ou lecitina e homogeneizadas em altas pressões (300, 800 e 1200 bar). Os autores observaram uma melhora da estabilidade das emulsões na presença de lecitina uma vez que sistemas contendo somente WPI, apesar de apresentarem menores tamanhos de gota após o preparo, mostraram diâmetros muito maiores após 8 semanas de estocagem quando comparadas aos sistemas contendo WPI e lecitina. Os sistemas também se mostraram eficientes para a encapsulação de α -tocoferol, porém esta eficiência foi reduzida com o aumento da pressão de homogeneização.

McCrae (1999) verificou que interações proteína-lecitina podem também melhorar a estabilidade frente ao calor de emulsões contendo proteínas do leite o que poderia ser atribuído aos seguintes mecanismos: (a) deslocamento ou interação da lecitina com a proteína adsorvida na superfície das gotas e (b) interação da lecitina com a proteína livre em solução.

Assim, as interações entre proteínas e fosfolípidos pode resultar em mudanças na atividade de superfície e modificações na estrutura da proteína e carga líquida, levando à formação de partículas com funcionalidades distintas de acordo com as condições de processo utilizadas.

2.5. Processo de emulsificação

A emulsificação ocorre em duas etapas: (1) deformação e ruptura da gota, com consequente aumento da área superficial, e (2) estabilização da interface a fim de prevenir a recoalescência das gotas formadas. As gotas formadas tendem a recoalescer quando não estão totalmente recobertas por moléculas de emulsificantes. Além disso, as gotas estão sujeitas à colisão devido ao movimento Browniano e à turbulência de alta intensidade característica dos processos de emulsificação. Dessa forma, o tamanho de gota final é resultado do equilíbrio dinâmico entre a quebra das gotas, colisões e posterior recoalescência durante o processo de homogeneização (Jafari et al., 2008).

O processo de emulsificação pode ser simplesmente uma forma de mistura ou pode ser realizado por dispositivos de alta pressão, ultrassônicos, tipo rotor-estator e sistemas de membrana. Em geral, é mais eficiente e conveniente produzir uma emulsão em duas etapas: (a) conversão de fases separadas de óleo e água em uma macroemulsão com tamanho de gota da ordem de micrômetros (geralmente por dispositivos do tipo rotor-estator) e então (b) redução final de tamanho de gota usando outra técnica de alta energia (ex. sistemas de alta pressão) (Jafari et al., 2008).

2.5.1. Homogeneização a alta pressão

A homogeneização em alta pressão visa a redução do tamanho das gotas da macroemulsão pré-formada por misturadores do tipo rotor-estator (McClements, 2005). As emulsões podem ser classificadas em nanoemulsões (ou microemulsões) (10-100 nm), miniemulsões (100-1000 nm) ou macro-emulsões (0,5 – 100µm) de acordo com o diâmetro das gotas formadas (Mason et al., 2006).

O processo de homogeneização em alta pressão consiste na passagem da macroemulsão por um estreito orifício sob uma pressão elevada, sendo que o fluido acelera rapidamente, alcançando uma velocidade de 300m/s nos microcanais. A energia fornecida pelo processo como resultado do cisalhamento, impacto e cavitação é representada como a energia livre adicional necessária para a redução do tamanho de gotas que leva à criação de uma grande área interfacial (Anton et al., 2008). O mecanismo de turbulência é responsável por este fenômeno, apesar do escoamento laminar e de cavitação desempenhar um papel importante na formação das novas gotas. Além do tamanho da gota, a distribuição do tamanho também afeta diretamente a textura e estabilidade das emulsões (Floury et al., 2000). Dependendo da taxa de adsorção interfacial do emulsificante, a distribuição do tamanho de gotas pode ser mono ou polidispersa, de modo que uma pequena fração de gotas terá um tamanho maior do que o diâmetro médio de gota (Jafari et al., 2008).

A estrutura primária das proteínas mantém-se intacta durante a homogeneização uma vez que as ligações covalentes praticamente não são afetadas por alta pressão (Mozhaev et al., 1996). Mudanças na estrutura secundária ocorrem em altas pressões, levando à desnaturação irreversível, já que as ligações de hidrogênio que a estabilizam são reforçadas em baixas pressões e rompidas em níveis muito altos de pressão (Huppertz et al., 2004). Assim, além da redução do tamanho de gotas e partículas, algumas reações ou alterações físicas são favorecidas em altas pressões, como a desnaturação das proteínas. No seu estado nativo, as

proteínas são estabilizadas por ligações covalentes e de hidrogênio, bem como por interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

2.6. Digestão lipídica

No estômago, os lipídeos e as proteínas são expostos a um meio altamente ácido (pH 1-3), onde encontram-se sujeitos à hidrólise enzimática (proteases e lipase gástrica) além da presença de várias substâncias com atividade de superfície (fosfolipídeos, mucinas e proteínas). Estas substâncias, nos fluidos do estômago, competem e podem substituir os emulsificantes presentes na superfície das gotas de óleo, alterando a composição interfacial e suas propriedades. No intestino delgado, os lipídeos são misturados aos sucos digestivos contendo sais biliares, fosfolipídeos, lipase pancreática, colipase, proteases, sais e bicarbonatos. O pH do intestino fica próximo da neutralidade devido à mistura do quimo com os sucos digestivos alcalinos. Assim como no estômago, substâncias com atividade de superfície no intestino podem competir e substituir materiais com atividade de superfície presentes na superfície das gotas. A lipase pancreática secretada torna-se ativa quando alcança a interface O/A, onde hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos livres. Os produtos da digestão lipídica são incorporados nas micelas e vesículas de sal biliar/fosfolipídeos, sendo transportados para posterior absorção nas células denominadas enterócitos (Hur et al., 2009).

Assim, a hidrólise lipídica consiste em um processo interfacial, que envolve a adsorção do sal biliar para a posterior adsorção da lipase na superfície das gotas de óleo, permitindo que a enzima tenha acesso aos triacilgliceróis (Wilde e Chu, 2011). Portanto, a natureza do emulsificante impacta na susceptibilidade das gotas de óleo quanto à coalescência e quebra dentro do trato gastrointestinal, alterando a área total superficial exposta à ação da lipase. Assim, as características da camada interfacial influenciam na adsorção e atividade da lipase na interface O/A. Um exemplo disso é o fato de que a lipase não é capaz de se adsorver

na superfície das gotas se existir uma concentração alta o suficiente de uma molécula com maior atividade superficial, inibindo, assim, sua ação (Hur et al., 2009).

Capítulo 3 . MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O isolado protéico de soro de leite (WPI) foi obtido da New Zealand Milk Products (Nova Zelândia). O teor de proteína, determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1996), foi de $90,63 \pm 0,50\%$ em base úmida. A lecitina de soja (SOLEC AE IP) foi obtida da Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda (Brasil). De acordo com o fornecedor a amostra continha cerca de 17% de fosfatidilcolina. O óleo de soja (Soya, Bunge Alimentos S.A., Brasil) foi obtido em um supermercado local. Os demais reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St Louis - USA).

3.2. Método

3.2.1. Preparo e caracterização das misturas de emulsificantes

Sistemas mistos diluídos foram estudados a fim de definir a melhor razão dos emulsificantes para o preparo das emulsões. Para isso, foram preparadas separadamente soluções de WPI (0-0,1% m/m) e dispersões de lecitina (0-0,1%) em água deionizada. Os valores de pH de cada sistema foram ajustados para 3; 5,5 ou 7 com auxílio de HCl 1N ou NaOH 1N imediatamente antes de serem misturados sob agitação magnética. Este processo resultou em sistemas compostos por lecitina e WPI nas razões de 0:1 (0,05% m/m de WPI), 1:1 (0,05% m/m de lecitina e 0,05% m/m de WPI) e 1:0 (0,05% m/m de lecitina). Em seguida, uma concentração fixa de proteína de 0,05% m/m foi utilizada e diferentes concentrações de lecitina foram estudadas (0, 0,025, 0,05 e 0,1% m/m) em pH 3, condição escolhida para garantir que os polieletrólitos estivessem opostamente carregados.

As amostras foram analisadas quanto à distribuição de tamanho de partícula (seção 3.2.3.3) e densidade de carga superficial (seção 3.2.3.4) imediatamente após o preparo. Por se tratar de lecitina fluida, não solúvel em água, a dispersão deste fosfolípideo em água foi

caracterizada como uma suspensão não-coloidal e turva, enquanto o WPI dissolvido em água resultou em uma solução transparente. Tais características foram determinantes para que a avaliação da distribuição de tamanho das partículas fossem realizadas por difração à *laser* e não por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

3.2.2. Preparo das emulsões

3.2.2.1. Preparo das soluções estoque de isolado protéico de soro (WPI)

A solução estoque de WPI (3% m/m) foi preparada pela dispersão do pó em água deionizada sob agitação magnética em temperatura ambiente por 2 h, garantindo a completa dissolução da proteína. O valor do pH da fase aquosa foi ajustado para 3; 5,5 ou 7 com HCl 1 N ou NaOH 1N, antes do preparo das emulsões. Azida sódica (0,01% m/m) foi adicionada à fase aquosa da emulsão como agente antimicrobiano.

3.2.2.2. Preparo das soluções de lecitina (Lec)

A lecitina foi dispersa em óleo (7% m/m) sob agitação magnética em temperatura ambiente até a sua completa dissolução antes de ser utilizada no preparo das emulsões (seção 3.2.2.3).

3.2.2.3. Preparo das emulsões

Após o ajuste do pH da fase aquosa, a fase oleosa contendo (30 % m/m) foi adicionada e então misturada com o auxílio de um rotor estator Ultra-Turrax IKA modelo T18 basic (Alemanha) a 14000 rpm por 5 minutos para a formação das macroemulsões. Com o intuito de produzir emulsões com tamanho de gota reduzido, as macro-emulsões foram homogeneizadas a altas pressões através de uma passagem por um homogeneizador de dois

estágios Panda 2K NS1001L, Niro Soave (Parma, Itália). As pressões estabelecidas no primeiro estágio foram de 250, 450 e 600 bar, enquanto no segundo estágio a pressão foi de 50 bar. As etapas do processo encontram-se descritas na Figura 3.1. Os seguintes sistemas foram avaliados:

- emulsões estabilizadas por lecitina e WPI nas razões de 0:1 (2% m/m de WPI), 1:1 (1% m/m de lecitina e 1% m/m de WPI) e 1:0 (2% m/m de lecitina), sendo o pH da fase aquosa previamente ajustado para 3 (abaixo do pI); 5,5 (próximo ao pI) ou 7 (acima do pI).

As emulsões foram analisadas em temperatura ambiente quanto à estabilidade frente ao processo de cremeação (seção 3.2.3.1), distribuição de tamanho de gotas (seção 3.2.3.3), microestrutura (seção 3.2.3.2), potencial zeta (seção 3.2.3.4), medidas reológicas (seção 3.2.3.5) e ensaios de eletroforese (seção 3.2.3.6), além de serem submetidas ao processo de digestão *in vitro* (seção 3.2.2.4).

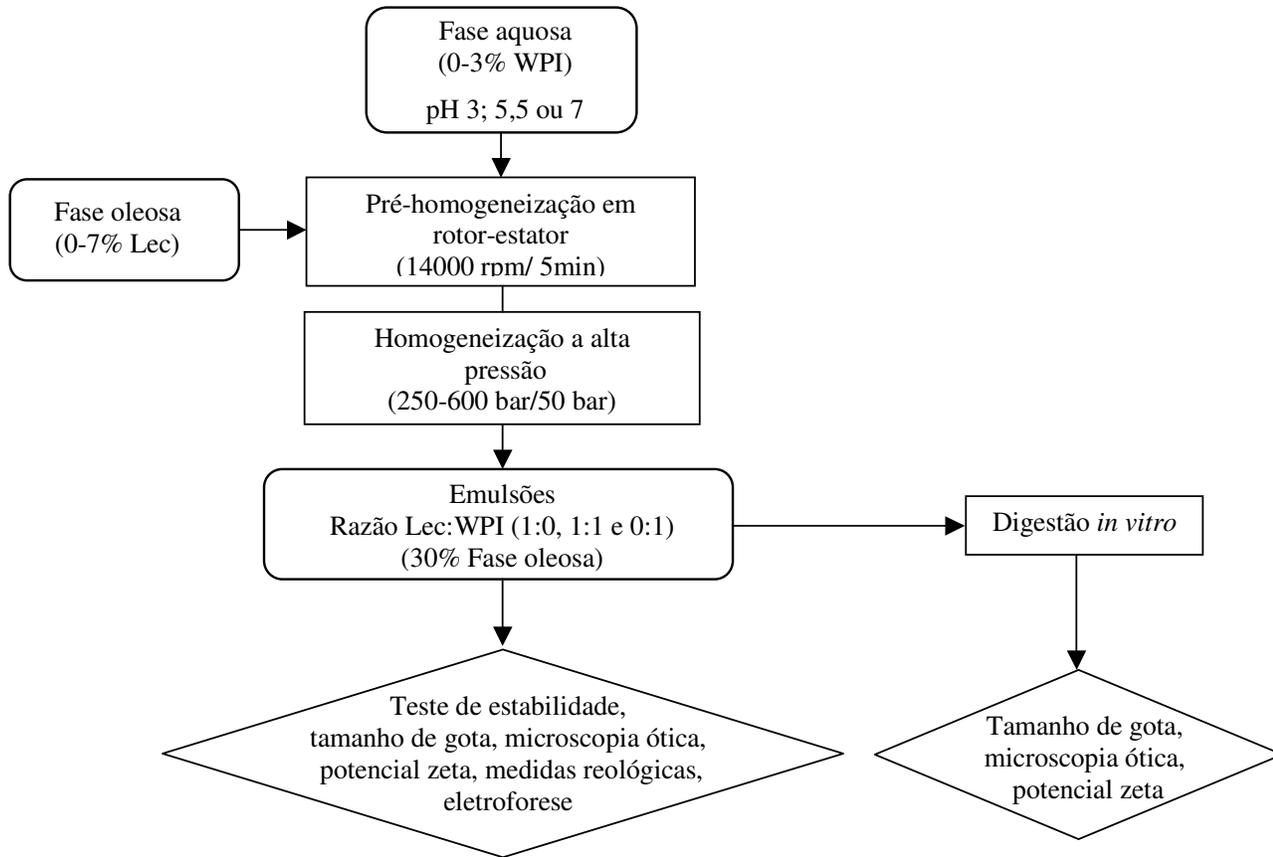


Figura 3.1. Fluxograma para obtenção das emulsões estabilizadas por lecitina e WPI nas razões de 1:0, 1:1 e 0:1

3.2.2.4. Simulação *in vitro* das condições químicas de digestão

As emulsões contendo diferentes razões de proteínas do soro e lecitina foram submetidas a ensaios de simulação de digestão *in vitro* pelo método estático. Na etapa de simulação da digestão bucal, as emulsões foram misturadas em tampão fosfato (5 mM, pH 6,9; NaCl 0,04%; CaCl₂ 0,004 M) (de acordo com o método de Hoebler et al. (2002) com pequenas modificações) e acondicionadas até que atingissem a temperatura de 37 °C. As etapas de digestão gástrica e entérica foram simuladas seguindo a metodologia de Garret et al. (1999). Assim, uma mistura composta por pepsina porcina (40 mg/mL em 0,1 M HCl) foi adicionada de modo a simular o suco gástrico, em uma proporção de 0,5g de pepsina por 100g

de amostra (Miller et al., 1981) e o pH foi ajustado a 2 com HCl 6 M. Após uma hora de incubação, procedeu-se a digestão entérica. Nesta etapa, a mistura resultante da digestão gástrica foi neutralizada até pH 5,3 com o auxílio de solução de bicarbonato de sódio 0,9 M, antes da adição de 9 mL de uma mistura de extrato de bile e pancreatina (2 mg/mL pancreatina + 12 mg/mL extrato de bile porcina; 0,1M de bicarbonato de sódio). O pH do sistema foi ajustado a 7 com NaOH 0,1M, antes da incubação das amostras por mais 2 horas. A incubação foi realizada em uma incubadora com agitação orbital ("shaker"), modelo TE-420 (Tecnal, Brasil), com temperatura controlada de modo que os sistemas permanecessem a 37 °C e agitação constante de 100 rpm. Foram retiradas amostras no final de cada etapa da digestão.

Estas amostras foram submetidas a análises de microscopia ótica (seção 3.2.3.2) e determinação do tamanho médio de partícula (seção 3.2.3.3), para a verificação da integridade das gotas após a digestão gástrica. Ao fim da digestão entérica, além das análises realizadas para a digestão gástrica também foi determinada a densidade de carga superficial (seção 3.2.3.4).

3.2.3. Análises

3.2.3.1. Estabilidade das emulsões à cremeação

Imediatamente após o processo de homogeneização, alíquotas de emulsão foram transferidas para tubos graduados de 50 mL (diâmetro interno = 25 mm, altura = 95 mm), os quais foram selados e armazenados por 7 dias à temperatura ambiente, sendo o volume da fase inferior quantificado diariamente. O índice de cremeação (IC) foi determinado de acordo com a Equação 3.1.

$$IC(\%) = \left(\frac{H}{H_0} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

onde H representa a altura da fase inferior e H_0 corresponde à altura inicial.

3.2.3.2. Microscopia óptica

Foi realizada microscopia ótica a fim de observar os processos de flocculação e coalescência nas emulsões. Assim, a análise foi realizada após 7 dias de estocagem (t7). A análise de microscopia ótica foi realizada em microscópio ótico Axio Scope-A1, Carl Zeiss (Alemanha). Para isso, uma alíquota de emulsão foi colocada em lâmina, coberta com lamínula e visualizada com um aumento de 40x ou 100x.

3.2.3.3. Distribuição de tamanho das gotas ou partículas

A distribuição do tamanho de gotas ou partículas foi determinada através da técnica de difração à laser utilizando-se um Multi-Angle Static Light-Scattering Mastersizer (Malvern Instruments, UK). O tamanho médio das gotas ou partículas foi caracterizado em termos de diâmetro médio superficial, d_{32} , obtido pela Equação 3.2.

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (3.2)$$

onde n_i é o número de partículas com diâmetro d_i .

As medidas foram realizadas imediatamente após o preparo das misturas aquosas diluídas de proteína e lecitina. Já para as emulsões, as medidas foram realizadas imediatamente (t0) e também após 7 dias de estocagem (t7). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente.

3.2.3.4. Potencial zeta

Para determinar a densidade de carga elétrica superficial das partículas, as misturas aquosas, assim como as emulsões, foram diluídas a uma concentração de aproximadamente 0,005% (m/m) em solução tampão citrato-fosfato (pH 3; 5,5 ou 7), antes de serem colocadas na câmara de medição de microeletroforese (ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Este aparelho determina a carga elétrica (potencial ζ) superficial das partículas através da medição da direção e velocidade das partículas em um campo elétrico (Littoz e McClements, 2008). As medidas foram realizadas em triplicata e em temperatura ambiente.

3.2.3.5. Medidas Reológicas

Para a determinação das propriedades reológicas das emulsões foi utilizado um reômetro de tensão controlada AR1500ex (TA Instruments, England). Todas as medidas foram feitas em triplicata a 25°C. As análises reológicas das emulsões foram realizadas após 7 dias de estocagem, utilizando geometria de placa rugosa de aço inoxidável de 50 mm de diâmetro.

As curvas de escoamento foram obtidas através de um programa de passos múltiplos usando intervalos de tensões de cisalhamento diferentes para cada amostra, porém que correspondessem a um intervalo entre 0-300 s⁻¹, aproximadamente. Desta maneira, pode-se avaliar a relação entre viscosidade (η) e taxa de deformação. Os modelos para fluidos Newtoniano (Equação 3.3) e pseudoplástico (Equação 3.4) foram utilizados para ajustar as curvas de escoamento.

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad (3.3)$$

$$\sigma = k \left(\dot{\gamma} \right)^n \quad (3.4)$$

onde σ corresponde ao valor de tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ à taxa de deformação (s^{-1}), η à viscosidade (Pa.s), n o índice de comportamento (-) e k índice de consistência (Pa.sⁿ). Os sistemas foram então analisados quanto aos valores de viscosidade Newtoniana (η) ou viscosidade aparente na taxa de deformação de $100s^{-1}$ (η_{ap}), índice de consistência (k) e comportamento (n), dependendo das características da emulsão.

3.2.3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu a caracterização da agregação das proteínas frente a altas pressões de homogeneização. Para a preparação do gel foram utilizadas lâminas verticais de vidro (Bio-Rad, Hercules-CA), em que a poliacrilamida ainda não polimerizada foi adicionada. Os ensaios foram realizados em gel de poliacrilamida com concentrações de 15% para o gel de resolução e de 5% para o gel de empacotamento. As soluções de proteína foram diluídas em água deionizada e 15 μ g de amostra foram aplicados nos compartimentos formados no topo do gel de empacotamento de poliacrilamida. A amostra foi diluída na razão de 1:1 em um tampão de amostra pH 6,8 contendo 50 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 10% de glicerol (v/v), 0,1% (m/v) de Comassie Brilliant Blue e 5% (v/v) de β -mercaptoetanol para as análises de SDS-PAGE_R (desnaturante e redutor). Nas análises em condições desnaturante e não redutora (SDS-PAGE_{NR}) foi utilizado o mesmo tampão descrito para o SDS-PAGE_R, exceto pela exclusão do β -mercaptoetanol. 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% (m/v) 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 etanol e 2,5% (m/v) de ácido acético. Foi utilizado como padrão um marcador comercial de massa molecular entre 6 – 180 kDa (Invitrogen™, The Bench Marker Pre-stained Protein Ladder, Bioagency International, Jacksonville, USA).

3.2.4. Análises Estatísticas

A avaliação dos dados foi realizada com auxílio de análise estatística, a partir da comparação entre médias dos resultados utilizando o teste de Tukey e Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância. Para isso, foi utilizado o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

Capítulo 4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte 1. Estudo das interações entre os emulsificantes em sistemas aquosos

O objetivo desta etapa foi investigar a formação e propriedades dos complexos eletrostáticos entre as proteínas do soro e a lecitina, pois o entendimento do comportamento das misturas de polieletrólitos é fundamental para otimizar a formação de partículas com aplicações em recobrimentos, emulsões, entre outras (Bengoechea et al., 2011). Primeiramente, ambos os emulsificantes foram avaliados individualmente. Em seguida, avaliou-se o efeito do pH na formação dos complexos quando misturados na razão 1:1, além do efeito da concentração de lecitina mantendo-se a concentração final de proteína fixa. Estes resultados permitiram a determinação de uma concentração de lecitina para o posterior preparo das emulsões.

4.1. Efeito do pH nas propriedades das proteínas de soro do leite e da lecitina

Inicialmente, foram caracterizados a carga elétrica e o comportamento de agregação dos polieletrólitos usados na formação dos complexos moleculares. Baixa concentração total de polieletrólitos foi utilizada neste estudo, pois elevadas concentrações de polieletrólitos favorecem a formação de partículas maiores e que podem ser menos estáveis (Chuah et al., 2009). Os valores de pH estudados foram determinados a fim de verificar os tipos de interações que podem ocorrer em situações distintas quando a proteína do soro encontra-se em pH abaixo, próximo ou acima do seu ponto isoelétrico (pI), que encontra-se em torno de 5,1 (Livney, 2010).

A dependência da carga superficial com relação ao pH final da mistura de polieletrólitos encontra-se na Figura 4.1. O potencial ζ das proteínas do soro mudou de positivo para negativo com o aumento do pH de 3 para 7, enquanto o potencial ζ da lecitina foi negativo e em torno de -40 mV nos três valores de pH avaliados. Este resultado indica que em pH 3 a lecitina já se encontra completamente dissociada e aniônica, por se tratar de um valor de pH acima do pKa do grupo fosfato que é igual a 1,5 (Chuah et al., 2009). As medidas

das propriedades elétricas da solução de WPI e da suspensão de lecitina indicaram que os sinais de suas cargas encontram-se opostos apenas em pH 3 (Figura 4.1b), e portanto, seria esperado que houvesse uma formação de complexos somente nesta condição.

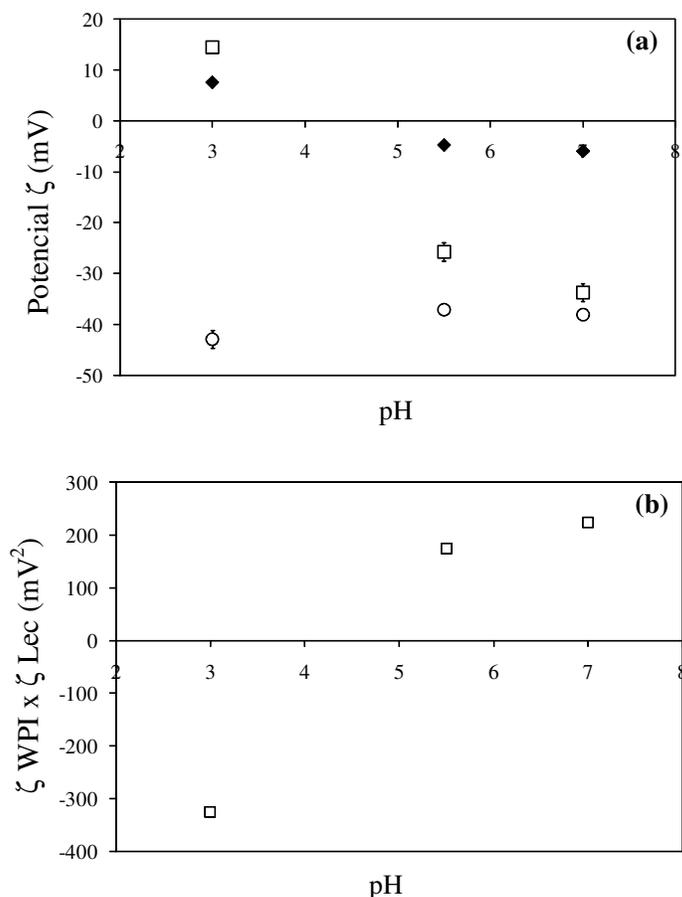


Figura 4.1. Efeito do pH na densidade de carga superficial (potencial ζ) de soluções aquosas contendo WPI (0,05% m/m), suspensões de lecitina (0,05% m/m), ou suas misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina). (a) Potencial ζ versus pH sendo (◆) WPI, (○) lecitina e (□) misturas; (b) o produto dos potenciais ζ dos sistemas puros de WPI e lecitina versus pH.

O diâmetro médio de partículas na solução de WPI não pode ser detectado por difração à *laser*, pois não foi possível atingir as condições de obscuração do equipamento necessárias para a realização da medida de maneira confiável (diâmetro inferior a 0,1 μm). Dessa forma, a medida foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e os valores obtidos em pH 3 e 5,5 foram $541,3 \pm 146,8$ nm e $808,5 \pm 69,2$ nm, respectivamente. Hong e

McClements (2007) mediram o tamanho médio de partícula de uma solução de β -Lg 0,5% m/m em termos de *z-average* e observaram tamanhos na escala nanométrica em pH 3 - 4 e 6 - 8, o que foi atribuído à predominância de monômeros e dímeros nessas condições. No entanto, em pH em torno de 5, estes autores observaram turbidez e tamanhos maiores de partícula (5 - 10 μ m), que foram atribuídos a uma auto-associação das moléculas de β -Lg devido à baixa carga superficial nessas condições de pH.

A dependência do diâmetro médio de partícula (d_{32}) somente da lecitina e da mistura de emulsificantes em meio aquoso é mostrada na Figura 4.2. O diâmetro médio da lecitina foi ao redor de 25 μ m independente do pH, com dimensões não-coloidais devido a sua baixa solubilidade em água. Nesta faixa de pH, o valor da densidade de carga superficial da lecitina (Figura 4.1) não mostra grande variação, resultando em intensidades semelhantes de repulsão eletrostática entre as partículas. A carga superficial e a agregação das misturas contendo WPI (0,05% m/m) e lecitina (0,05% m/m) (Figuras 4.1 e 4.2). Em pH 3, o potencial ζ da mistura (+14,4 mV) foi maior que da solução pura de WPI (+7,58 mV). Em estudos similares realizados com quitosana e caseinato de sódio (Anal et al., 2008) e pectina e lactoferrina (Bengoechea et al., 2011), o potencial ζ da mistura apresentou valores intermediários entre os valores das soluções puras, ou seja, contendo apenas um dos biopolímeros, em toda a faixa de pH. Porém, Hong e McClements (2007) avaliaram a formação de complexos entre β -lg e quitosana e também observaram densidade de carga superficial da mistura de biopolímeros maior que àquela observada para as soluções contendo somente quitosana ou β -lg em determinados valores de pH. Estes resultados sugerem que este aumento do potencial ζ após a mistura pode estar relacionado a mudanças na conformação da proteína ao interagir com outro polieletrólito.

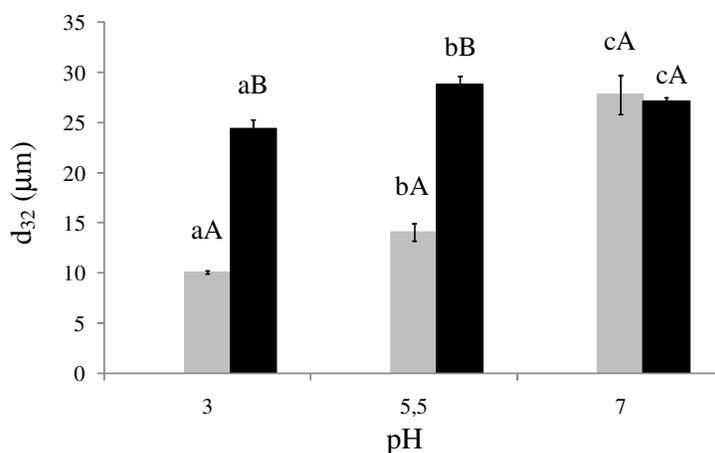


Figura 4.2. Efeito do pH no diâmetro médio de partículas (d_{32}) de (■) suspensões de lecitina (0,05% m/m) e (■) das misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes condições de pH e composições iguais. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre composições distintas para um mesmo pH.

O aumento do pH para 5,5 fez com que a carga superficial das partículas se tornasse negativa (-25,7 mV), sendo um pouco mais negativa em pH 7 (-33,7 mV). Como os valores das misturas foram diferentes daqueles observados na solução de WPI e dispersão de lecitina puras, possivelmente, ocorreu a formação de complexos entre eles. Porém o fato de que os valores tornam-se cada vez mais negativos e próximos daquele observado para a lecitina pura leva a crer que há uma diminuição do número de complexos formados com o aumento do pH. Presumidamente, tais complexos foram formados pelas interações eletrostáticas entre grupos carregados negativamente na lecitina ($-\text{PO}_3^-$) e grupos carregados positivamente nas proteínas do soro ($-\text{NH}_3^+$). Em pH 3, a maioria dos grupos amino na proteína encontra-se protonada e, portanto, ocorre um grande número de interações. No entanto, com o aumento dos valores de pH, há uma diminuição na quantidade de grupos protonados que leva à formação de cada vez menos complexos moleculares. Assim, o aumento do pH gera uma carga líquida negativa na proteína, o que não significa que todos os grupos amino encontram-se desprotonados. Isso explicaria o porquê da observação de complexos em valores de pH acima do pI da proteína,

onde ambos os emulsificantes encontram-se negativamente carregados (Hong e McClements, 2007).

A dependência do diâmetro médio de partícula com relação ao pH das misturas foi diferente daquela observada para a dispersão de lecitina pura (Figura 4.2). Nos valores de pH 3 e 5,5, os diâmetros médios de partícula da mistura de WPI e lecitina foram mais baixos (10,1 e 14,1 μm) que o valor obtido para a suspensão de lecitina pura, apesar de maior densidade polimérica, uma vez que a lecitina consiste em surfactante de baixa massa molecular enquanto proteínas são emulsificantes macromoleculares (Dickinson, 2003). Isto indica que houve formação de complexos entre os emulsificantes com o consequente aumento da solubilidade da lecitina nesses valores de pH. Já em pH 7, não houve diferença significativa entre os tamanhos de partícula na mistura e na dispersão de lecitina pura, o que pode ser um indício de que houve a formação de um número bem menor de complexos. Isto é devido a uma maior quantidade de grupos carboxílicos da proteína carregados negativamente (Hong e McClements, 2007) que levam a uma maior repulsão da lecitina nessas condições, pois se trata de um valor de pH acima e mais distante do pI da proteína.

As curvas de distribuição de tamanho em função da fração volumétrica das partículas para a dispersão de lecitina pura e a mistura de emulsificantes nos diferentes valores de pH encontram-se na Figura 4.3. As curvas das suspensões foram bimodais, sendo que o primeiro pico apresentou partículas com tamanho entre 1 e 6 μm . Em pH 7, como as proteínas se encontram com maior quantidade de grupos carboxílicos carregados negativamente, a curva de distribuição da mistura foi muito semelhante a da lecitina, sugerindo que nessa condição houve menos interação entre as proteínas e a lecitina. Com a diminuição do pH, as curvas das misturas e da suspensão de lecitina pura foram se diferenciando principalmente devido ao aumento do teor de partículas de tamanhos menores, o que também indica que houve mais interações entre os emulsificantes, devido à protonação dos grupos amino da proteína. A

fração de partículas com tamanho abaixo de 6 μm nos sistemas contendo a mistura decresceu de $13,89 \pm 0,18\%$ para $3,53 \pm 0,34\%$ com o aumento do pH de 3 para 7. Por este motivo, o diâmetro médio de partícula nos valores de pH mais baixos foi menor quando comparado ao valor medido em pH 7.

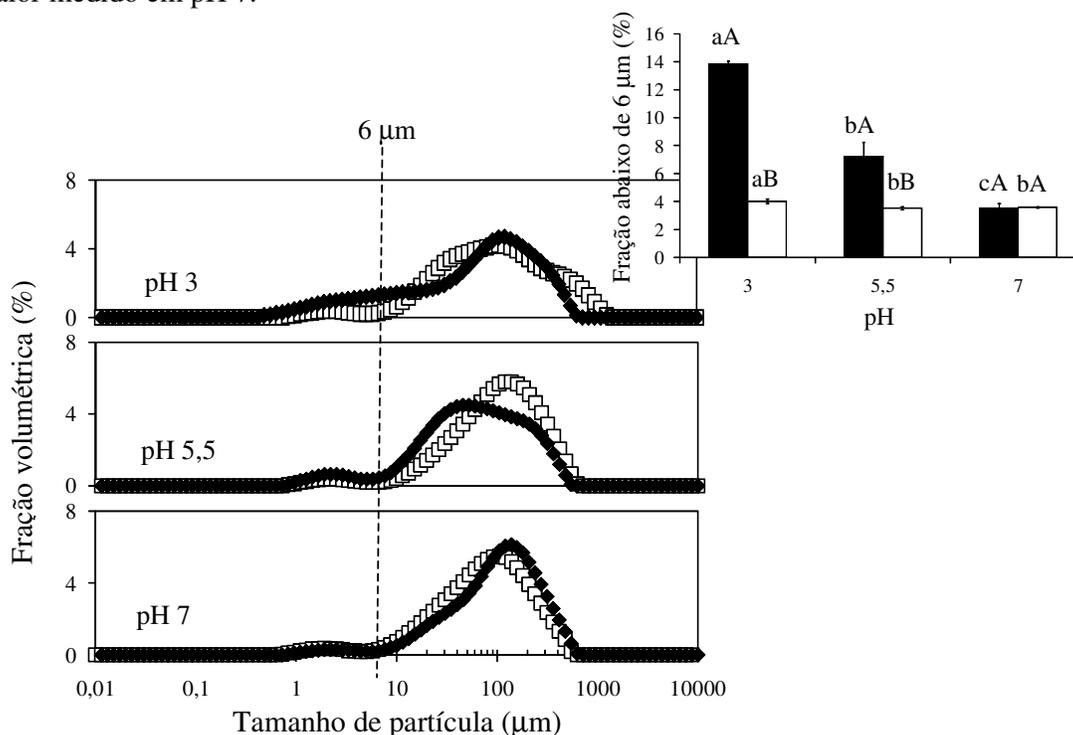


Figura 4.3. Curvas de distribuição de tamanho em função da fração volumétrica das partículas de (\square) suspensões de lecitina (0,05% m/m) e (\blacklozenge) das misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina) em diferentes condições de pH (3; 5,5 e 7). O destaque na parte superior indica as fração volumétrica de partículas menores que 6 μm para os diferentes valores de pH sendo (\square) lecitina (0,05% m/m) e (\blacksquare) misturas (0,05% WPI e 0,05% m/m lecitina). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes condições de pH e composições iguais. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre composições distintas para um mesmo pH.

4.2. Concentração de saturação de lecitina na formação de complexos

Este estudo foi realizado com o intuito de estabelecer a razão de lecitina e WPI para o preparo das emulsões. A carga superficial e a agregação das misturas contendo WPI (0,05% m/m) e lecitina em diferentes concentrações (0 - 0,1% m/m) e pH 3 foram medidas (Figura 4.4). Este valor de pH foi utilizado a fim de garantir que ambos os emulsificantes se

encontrassem com cargas opostas, favorecendo assim o processo de complexação. Os valores de potencial ζ dos sistemas mistos diminuíram com o aumento da concentração de lecitina de 0,025 para 0,1% m/m ($\zeta = +15,6$ para $+7,97$ mV), o que indica que as proteínas do soro e a lecitina formaram complexos. Como citado anteriormente, não foi possível determinar o tamanho de partícula da solução de proteínas do soro por difração à *laser*. Assim, os valores de diâmetro médio de partícula obtidos foram comparados somente com o tamanho observado na suspensão contendo somente lecitina. Em todas as concentrações de lecitina avaliadas nas misturas, o tamanho médio de partícula foi menor que o da dispersão de lecitina pura (24,4 μm). Houve uma diminuição do tamanho de partícula de 14,2 para 10,1 μm com o aumento da concentração de lecitina de 0,025% para 0,05% m/m, sugerindo maior interação entre os emulsificantes e formação de mais complexos eletrostáticos. Por outro lado, o aumento da concentração de 0,05% para 0,1% m/m levou ao aumento do diâmetro médio de 10 para 14 μm . É possível que a presença de um excesso de lecitina tenha favorecido o aumento da repulsão superficial, resultando assim no aumento do tamanho de partícula. Além disso, a magnitude do potencial ζ nos complexos formados com 0,05% m/m foi consideravelmente mais alta que aquela encontrada na maior concentração de lecitina. Este resultado é um indício de que a agregação das moléculas foi dificultada devido à maior repulsão eletrostática (Hong e McClements, 2007), levando a menores tamanhos de partícula nesta razão de componentes.

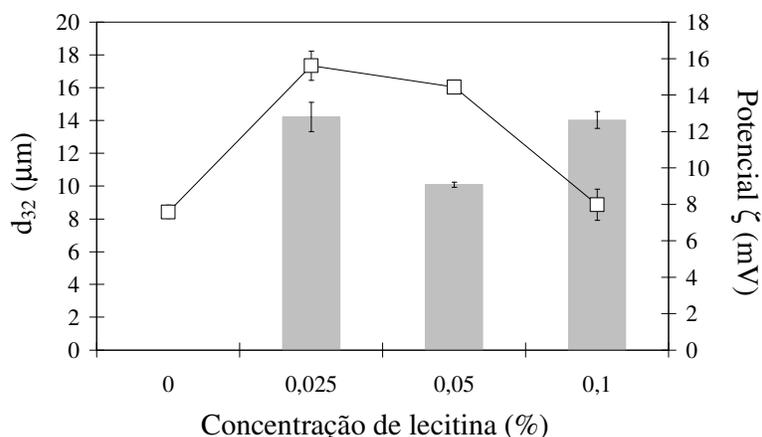


Figura 4.4. Efeito da concentração de lecitina na formação de complexos proteínicos do soro-lecitina. (■) Diâmetro médio de partículas (d_{32}) e (□) carga superficial elétrica (potencial ζ) das misturas de proteínas e lecitina contendo 0,05% m/m de WPI.

As curvas de distribuição de tamanho com relação à fração volumétrica das partículas para a suspensão de lecitina pura e as misturas contendo diferentes concentrações de lecitina em pH 3, encontram-se na Figura 4.5. Uma modificação do pico referente às partículas de menor volume foi observada com o aumento da concentração de lecitina. Na ausência de WPI, a curva de distribuição de partículas apresentou dois picos claramente definidos, sendo o primeiro referente ao volume ocupado por partículas menores (1 - 6 μm) e o segundo por partículas de tamanhos maiores (10 - 1000 μm). Já na presença de WPI (0,05% m/m) e na menor concentração de lecitina (0,025% m/m) houve o aparecimento de vários picos, principalmente em maiores tamanhos de partícula. Com o aumento da concentração de lecitina de 0,025% para 0,05% m/m foi observado um aumento do volume ocupado pelas partículas menores e desaparecimento do pico em torno de 800 μm que, conseqüentemente, refletiu na diminuição do valor de d_{32} . Porém, um posterior aumento na concentração de lecitina de 0,05% para 0,1% m/m levou à diminuição do volume ocupado pelas partículas menores e ao aumento do volume ocupado por partículas de tamanhos maiores, resultando

novamente na formação de dois picos bem definidos, o que acabou refletindo no aumento do valor do d_{32} .

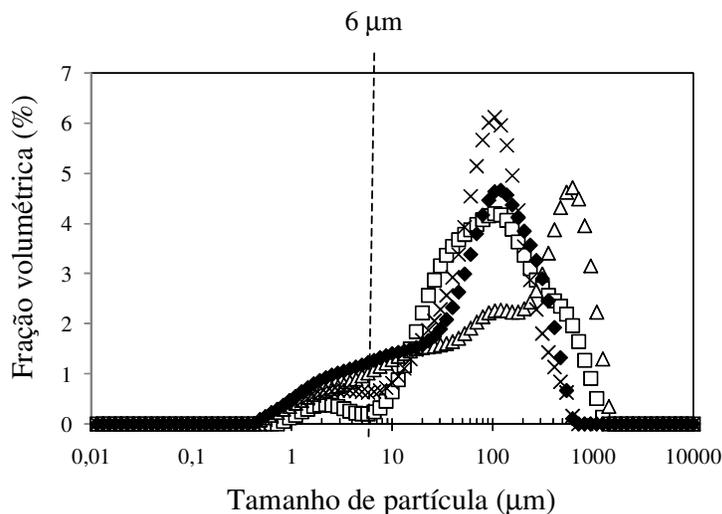


Figura 4.5. Curvas de distribuição de tamanho em função da fração volumétrica de partículas dos sistemas em pH 3. (□) Suspensão de lecitina pura (0,05% m/m) e das misturas de proteínas do soro (0,05% m/m) e lecitina em diferentes concentrações: (Δ) 0,025 %, (◆) 0,05% e (×) 0,1% m/m.

Dessa forma, definiu-se a concentração de 0,05% m/m de lecitina como a concentração de saturação para misturas contendo 0,05% m/m de proteínas do soro. Chuah et al. (2009) avaliaram a formação de nanopartículas através de interações eletrostáticas entre a quitosana e lecitina modificada e verificaram que, embora o tamanho de partícula tenha variado para diferentes concentrações de polieletrólitos, a carga superficial das nanopartículas mostrou-se independente da concentração total de polieletrólitos, desde que a mesma razão entre eles fosse mantida. Assim, para o preparo das emulsões foram utilizadas concentrações de emulsificantes superiores às aquelas aplicadas neste estudo a fim de estabelecer uma melhor condição de estabilidade à cremeação, porém mantendo-se sempre a razão de 1:1 de lecitina:WPI, definida como a melhor condição entre as estudadas para a formação de complexos.

Capítulo 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte 2. Emulsões O/A estabilizadas por proteínas do soro e/ou lecitina

O efeito da pressão de homogeneização foi avaliado em emulsões O/A compostas por 30% (m/m) de fase oleosa e estabilizadas por 2% (m/m) de lecitina e proteína em diferentes razões (1:0, 1:1 e 0:1), variando-se o pH da fase aquosa (3; 5,5 e 7). Inicialmente foi realizada uma homogeneização primária seguida de homogeneização secundária (250-600 bar / 50 bar). A homogeneização primária consiste na formação das gotas e pré-mistura dos componentes do sistema, enquanto na homogeneização secundária, uma grande quantidade de energia deve ser suprida ao sistema de forma a promover o rompimento e a diminuição do tamanho das gotas já existentes. Além disso, este processo promove uma melhor distribuição dos emulsificantes sobre a interface das gotas formadas aumentando a sua estabilidade frente à separação de fases (McClements, 2005). As emulsões apenas podem ser consideradas estáveis quando não existem mudanças na distribuição do tamanho de gotas, estado de agregação ou arranjo espacial dentro de um sistema coloidal durante um determinado período de observação (Chuah et al., 2009). Assim, as medidas de tamanho de gota foram realizadas no dia do preparo e após 7 dias de estocagem a fim de verificar a ocorrência de mecanismos físicos de desestabilização (coalescência ou floculação).

4.3. Caracterização das proteínas do soro utilizadas como agente emulsificante

A Figura 4.6 mostra os perfis eletroforéticos das suspensões de proteínas do soro em diferentes condições de pH (abaixo, próximo e acima do pI) e após homogeneização em altas pressões. De maneira geral, os resultados observados para as diferentes soluções foram muito semelhantes, independente do pH e das pressões de homogeneização. Nas condições não redutoras e redutoras, para todas as condições de pressão, são visualizadas bandas nítidas no gel de resolução na região de massa molecular entre 19 e 6 kDa. Estas bandas correspondem respectivamente às frações de β -lactoglobulina (β -Ig) e α -lactoalbumina (α -Ia), que são as frações mais abundantes nas proteínas do soro do leite. Nos mesmos géis de poliacrilamida,

pode-se observar bandas referentes à fração de albumina bovina sérica (BSA) e dímeros de β -Lg. As suspensões não apresentaram agregados de alta massa molecular e, em geral, não foi possível observar diferenças marcantes entre as bandas referentes às frações protéicas para as colunas das amostras diluídas em tampão redutor e não redutor. Isto indica que o processo de homogeneização não levou à exposição dos sítios para a formação de pontes dissulfídicas entre moléculas como consequência de uma provável desnaturação da proteína devido ao efeito da pressão. Tal exposição poderia ser favorecida submetendo-se a proteína à desnaturação térmica antes da etapa de homogeneização (Kiokias e Bot, 2007).

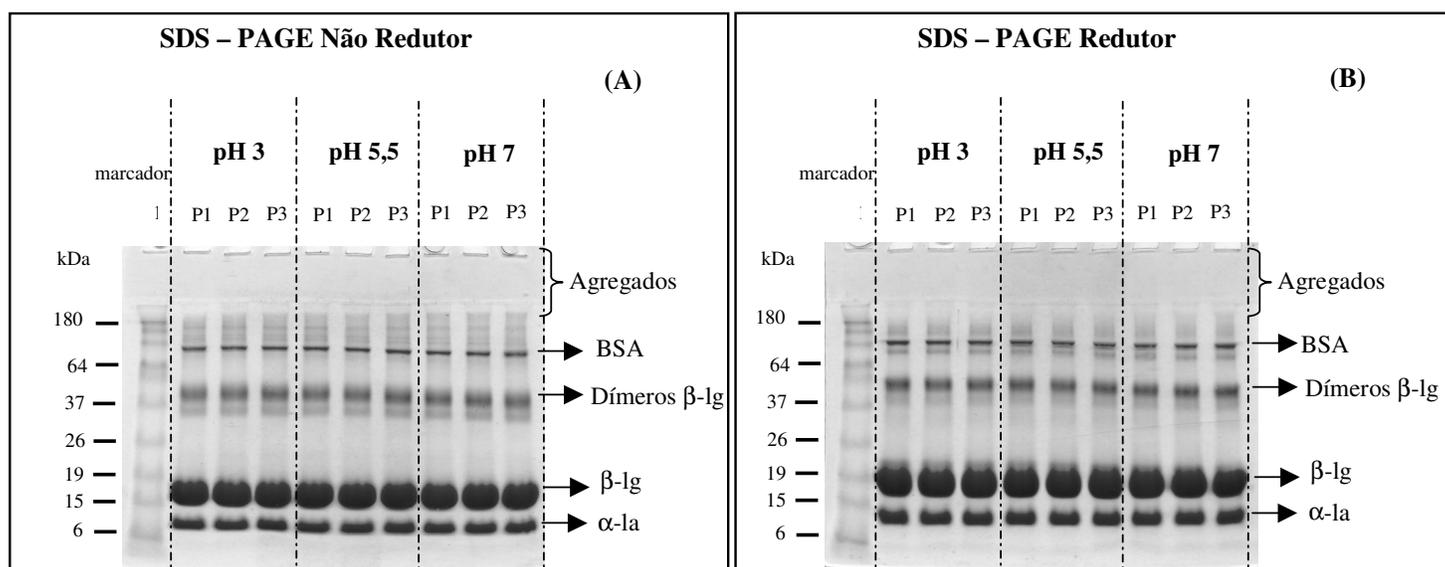


Figura 4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das soluções contendo 2% (m/m) de WPI. (A) SDS PAGE - não redutor, (B) SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente.

4.4. Emulsões estabilizadas em pH abaixo do pI das proteínas do soro

4.4.1. Estabilidade à cremeação

Os resultados de estabilidade (Figura 4.7) mostraram que, dentre as razões de lecitina e WPI avaliadas, somente as emulsões preparadas na razão de 1:1 apresentaram separação de fases após 7 dias de estocagem para todas as pressões de homogeneização. A desestabilização destas emulsões resultou na formação de 2 fases, uma inferior aquosa límpida e uma superior oleosa, de coloração amarela e aparência coagulada. Já as emulsões estáveis apresentaram coloração branca, sendo que a emulsão estabilizada somente com lecitina mostrou-se levemente amarelada na região superior.

As emulsões que separaram de fases apresentaram elevada instabilidade cinética uma vez que o processo de desestabilização teve início imediatamente após o preparo das mesmas. Provavelmente tal efeito deve-se à interação eletrostática entre os dois polieletrólitos, já que em pH 3 (abaixo e distante do pI) a proteína encontra-se positivamente carregada enquanto a lecitina apresenta densidade de carga negativa (Figura 4.1). Além disso, em aproximadamente 1 hora os sistemas atingiram o equilíbrio de fases e seus índices de cremeação (Figura 4.8) foram em torno de 50% (v/v), independente da pressão de homogeneização. O teor de proteínas das fases separadas foi quantificado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1996) e os valores obtidos foram em torno de 1,4% (m/m) e 0,3% (m/m) para as fases superior e inferior, respectivamente, sendo que também não houve diferença significativa com o aumento da pressão de homogeneização.

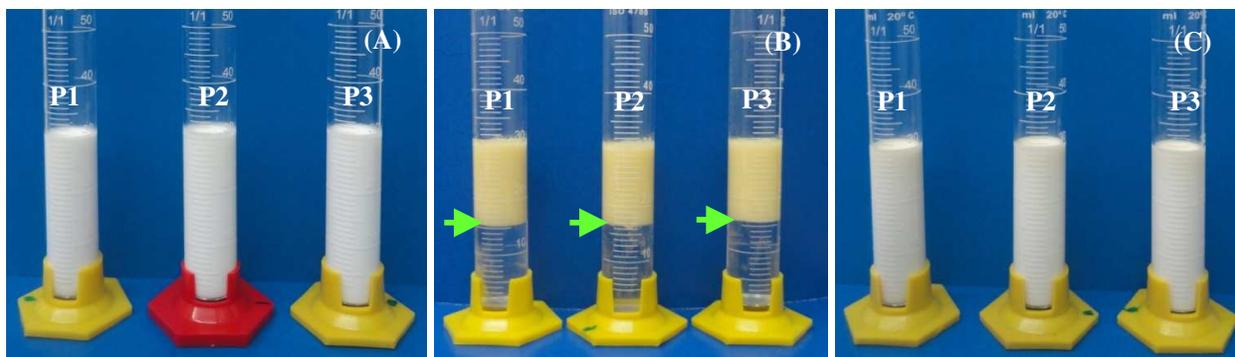


Figura 4.7. Estabilidade à cremeação após 7 dias de estocagem. Emulsões com fase aquosa em pH 3 estabilizadas por lecitina : WPI nas razões de (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 e homogeneizadas a (P1) 250 bar, (P2) 450 bar e (P3) 600 bar.

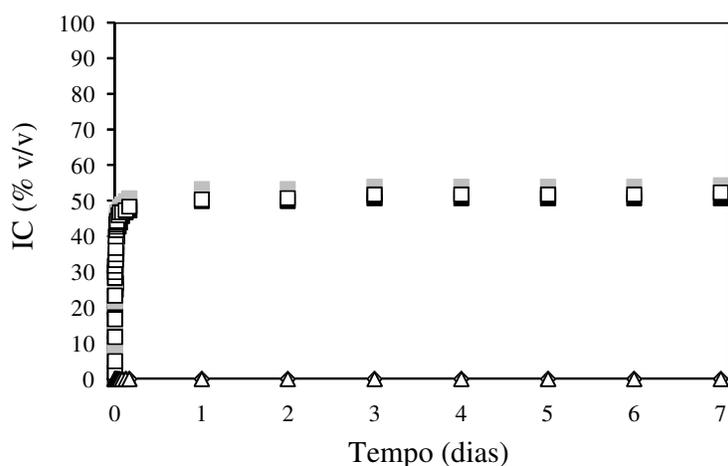


Figura 4.8. Índice de cremeação (IC) de emulsões em pH 3 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (◇) 0:1, (□) 1:1 e (△) 1:0. Símbolo cheio: 250 bar, hachurado: 450 bar e vazio: 600 bar.

4.4.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas

A partir das microscopias das emulsões em pH 3 (Figura 4.9) fica evidente a diferença estrutural entre as composições de emulsificantes. Nas razões de lecitina e WPI de 1:0 e 0:1 há a formação de uma emulsão verdadeira, ou seja, a dispersão de gotas em meio aquoso, enquanto que na razão de 1:1 não é possível visualizar a formação de gotas, apesar de não ter ocorrido separação de óleo livre (Figura 4.7). Além disso, foi observado que as emulsões

formadas por WPI apresentaram-se mais polidispersas quando comparadas às contendo lecitina, sendo que esta polidispersão foi reduzida com o aumento da pressão de homogeneização.

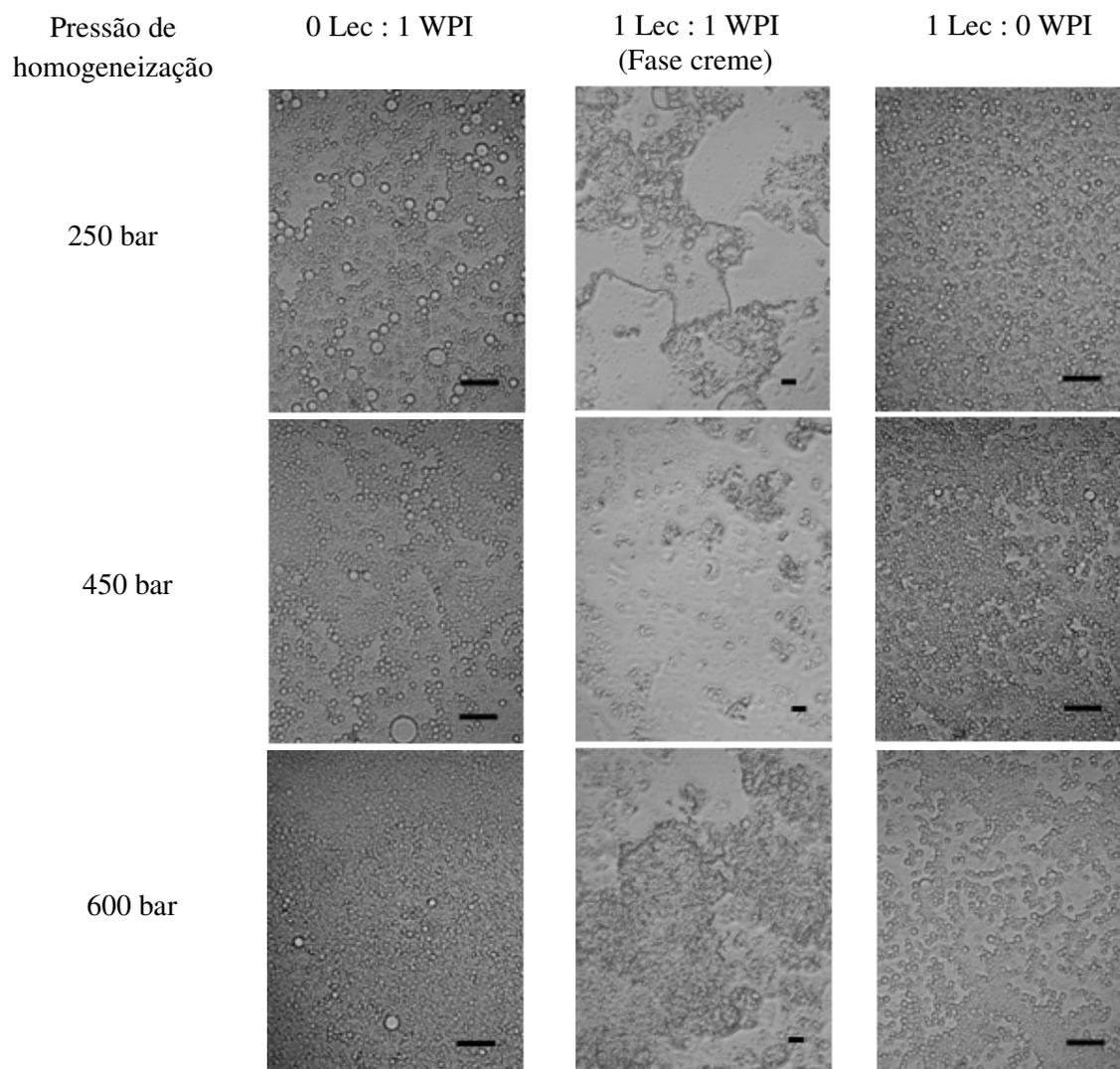


Figura 4.9. Micrografia das emulsões em pH 3 contendo lecitina (Lec) e/ou WPI após 7 dias de estocagem. Barra da escala = 10 μm .

Na Tabela 4.1 é possível observar que os valores de diâmetro médio (d_{32}) dos sistemas avaliados apresentaram variações muito pequenas ou nulas, indicando que não ocorreu

coalescência ou flocculação das gotas durante o período de estocagem (7 dias). Para as emulsões estabilizadas somente com WPI, houve uma diminuição do diâmetro de gota de cerca de 0,3 μm (17%) com o aumento da pressão de homogeneização de 250 para 600 bar. Já para as emulsões estabilizadas somente com lecitina, a variação de diâmetro entre o maior e o menor valores obtidos ficou em torno de 0,1 μm , sendo que houve uma suave diminuição do tamanho de gota com o aumento da pressão de 250 para 450 bar, seguida de um aumento com o posterior aumento da pressão para 600 bar. Assim, para ambos os sistemas puros a variação da pressão de homogeneização no diâmetro de gota da emulsão não resultou em grandes alterações do d_{32} . Os valores de d_{32} apresentados na Tabela 4.1 para os sistemas contendo a mistura dos emulsificantes na razão 1:1 correspondem ao tamanho de partícula dos agregados formados na fase creme já que, neste caso, não houve formação de gotas de emulsão.

Tabela 4.1. Diâmetros médios de gota (d_{32}), em μm , de emulsões em pH 3 contendo lecitina e proteínas do soro.

Pressão (bar)	0 Lec : 1 WPI		1 Lec : 1 WPI*		1 Lec : 0 WPI	
	t0	t7	t0	t7	t0	t7
250	1,76 ^{Bc}	1,70 ^{Ac}	109,87 ^{Aa}	120,69 ^{Ba}	1,57 ^{Ab}	1,59 ^{Bb}
450	1,59 ^{Ab}	1,56 ^{Ab}	122,39 ^{Aa}	129,11 ^{Aa}	1,52 ^{Aa}	1,53 ^{Aa}
600	1,46 ^{Aa}	1,47 ^{Aa}	121,57 ^{Aa}	110,33 ^{Aa}	1,62 ^{Ac}	1,60 ^{Ac}

* As medidas foram realizadas na fase creme do sistema.

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre os tempos de estocagem para um mesmo sistema. Letras minúsculas: diferenças dentro da mesma coluna.

As curvas de tamanho mostraram distribuição monomodal (Figura 4.10). É possível observar que as curvas de distribuição dos sistemas não apresentaram variação com relação à pressão de homogeneização ou com o tempo de estocagem, confirmando a ausência de um processo de coalescência durante o período de estocagem avaliado. Além disso, na maior parte dos casos, as curvas de distribuição das emulsões contendo somente WPI ou lecitina se sobrepuseram, sugerindo que ambos emulsificantes possuem atividades de superfície similar

na concentração de 2% (m/m) e condições de processo avaliadas, exceto na pressão de 250 bar em que foi constatada maior polidispersão na presença de proteína (Figura 4.9). Nas curvas referentes aos sistemas mistos (contendo WPI e lecitina) após 7 dias de estocagem foi observada uma menor polidispersão, caracterizada pelo estreitamento da base e pico mais alto. Isto se deve ao fato de que, no dia do preparo, os sistemas foram mantidos sob agitação branda a fim de se evitar a separação de fases para obtenção dos valores de tamanho inicial que pode ter levado ao rompimento dos agregados e após o período de estocagem a análise foi realizada somente na fase superior (creme) sem agitação prévia.

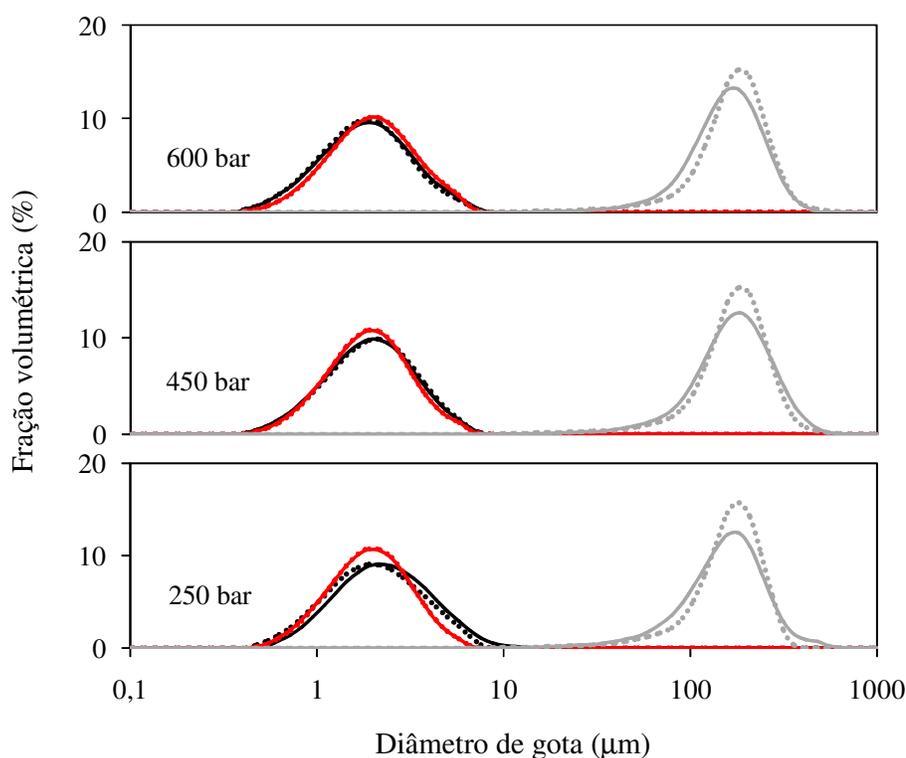


Figura 4.10. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota das emulsões em pH 3 estabilizadas por lecitina e WPI em diferentes razões. t₀: (—) 0:1, (—) 1:1 e (—) 1:0. t₇: (.....) 0:1, (.....) 1:1 e (.....) 1:0.

4.4.3. Carga superficial

A magnitude do potencial ζ da partícula é um dos fatores determinantes na estabilidade de emulsões e suspensões. Suspensões com valores absolutos do potencial ζ acima de 60 mV mostram uma excelente estabilidade, enquanto que aquelas abaixo de 30 mV são moderadamente estáveis. Abaixo de 20 mV, as suspensões são pouco estáveis, sendo que abaixo de 5 mV ocorre pronunciada agregação (Chuah et al., 2009). Isto porque estes valores encontram-se diretamente relacionados à intensidade das forças repulsivas entre as partículas. Dessa forma, forças repulsivas mais intensas impedem a agregação e, conseqüentemente, promovem maior estabilidade da suspensão.

Os valores de potencial ζ para os sistemas avaliados em pH 3 encontram-se descritos na Tabela 4.2. As emulsões estabilizadas somente por WPI apresentaram gotas com densidade de carga superficial altamente positiva (+39 mV), resultante da protonação dos grupos amino já que o pH do meio encontra-se abaixo e distante do pI da proteína. Já as emulsões estabilizadas por lecitina apresentaram gotas negativamente carregadas. Em ambos os casos, os valores absolutos de potencial ζ foram relativamente altos, o que provavelmente promoveu maior estabilidade eletrostática devido à intensa força de repulsão entre as gotas, evitando a desestabilização dos sistemas, seja por coalescência ou floculação das gotas durante o período de estocagem. A fase creme dos sistemas contendo a mistura de emulsificantes na razão 1:1 apresentaram partículas com carga superficial positivamente carregadas e em torno de 10 mV. Assim, a instabilidade cinética observada pode ser atribuída a uma repulsão eletrostática insuficiente para manter as gotas dispersas em somente uma fase devido à reduzida magnitude do potencial ζ da emulsão.

Em geral, o efeito da pressão não foi significativo na definição da carga superficial das partículas, dado que se trata de uma propriedade dependente da composição dos sistemas.

Tabela 4.2. Potencial ζ (mV) de emulsões em pH 3 com 30% (m/m) de óleo de soja contendo lecitina e proteína do soro em diferentes razões.

Pressão (bar)	0 Lec : 1 WPI	1 Lec : 1 WPI*	1 Lec : 0 WPI
250	38,54 ^a (\pm 1,11)	11,11 ^a (\pm 1,39)	-50,32 ^a (\pm 2,04)
450	39,20 ^a (\pm 1,52)	10,33 ^a (\pm 1,53)	-50,12 ^a (\pm 1,91)
600	39,36 ^a (\pm 0,71)	14,10 ^b (\pm 1,42)	-50,26 ^a (\pm 2,41)

* As medidas foram realizadas na fase creme do sistema.

As letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma coluna

4.4.4. Reologia

O efeito de diferentes condições de processo e composição na estabilidade das emulsões podem ser melhor entendidos através de medidas reológicas (Perrechil e Cunha, 2010). As curvas de escoamento em estado estacionário estão apresentadas na Figura 4.11. Nos sistemas que resultaram na formação de emulsões verdadeiras, ou seja, naqueles que continham lecitina e WPI nas razões 1:0 e 0:1 em suas composições, foi observado um comportamento de fluido Newtoniano, com o índice de comportamento (n) igual a 1. No entanto, as fases inferior e a superior dos sistemas contendo lecitina e WPI na razão 1:1 apresentaram comportamentos de fluido Newtoniano e pseudoplástico, respectivamente, sendo o último caracterizado por apresentar $n < 1$.

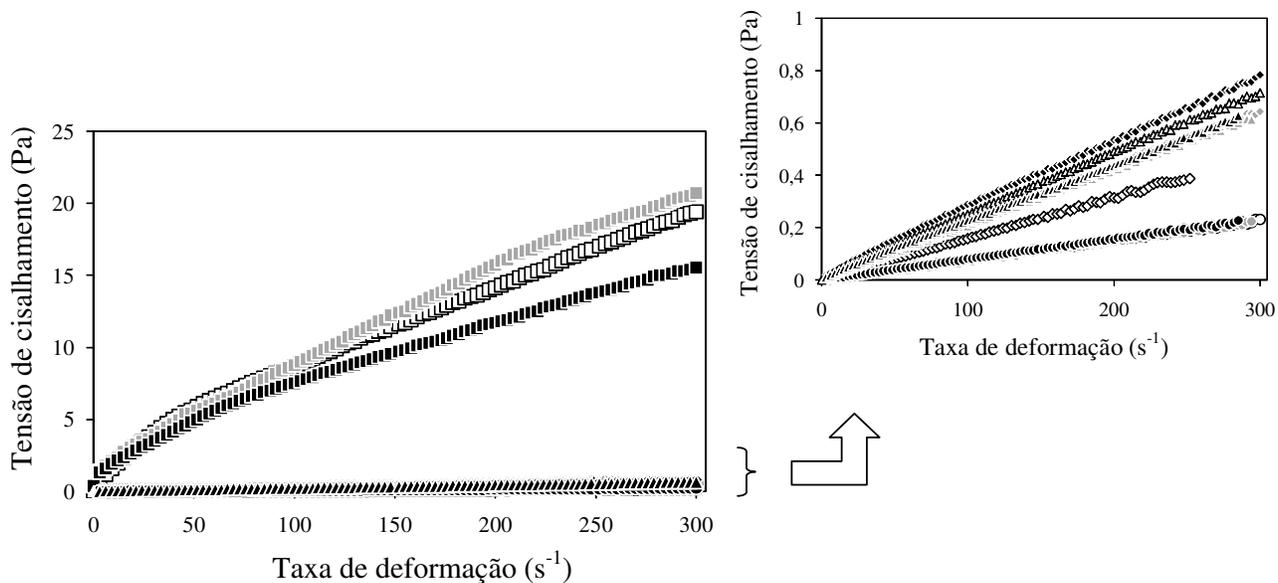


Figura 4.11. Curvas de escoamento de emulsões em pH 3 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square) 1:1 (fase superior), (\odot) 1:1 (fase inferior) e (\triangle) 1:0. Símbolo vazio: 250 bar, hachurado: 450 bar e cheio: 600 bar.

Os dados das curvas de escoamento que apresentaram comportamento Newtoniano permitiram a determinação de sua viscosidade newtoniana, enquanto que para a fase superior os dados foram ajustados a um modelo lei da potência. O coeficiente de determinação (R^2) foi maior que 0,999 em todos os sistemas estudados. Os dados referentes ao ajuste do modelo, bem como os valores de viscosidade aparente a uma taxa de deformação de 100 s^{-1} encontram-se apresentados na Tabela 4.3. Este parâmetro reológico foi avaliado nessa taxa de deformação pois é o valor típico para processos tais como escoamento através de uma tubulação, agitação ou mastigação (McClements, 2005).

Tabela 4.3. Viscosidade Newtoniana (η), viscosidade aparente na taxa de deformação de 100s^{-1} ($\eta_{100\text{s}^{-1}}$) e índices de consistência (k) e de comportamento (n) de emulsões em pH 3 contendo lecitina e proteína do soro.

Razão (Lec : WPI)	Pressão (bar)		k (Pa.s ⁿ)	n	$\eta_{100\text{s}^{-1}}$ (mPa.s)	η (mPa.s)
0 : 1	250		-	1	-	1,59 ^b
	450		-	1	-	2,20 ^c
	600		-	1	-	2,65 ^e
1 : 1	250	FS	0,377 ^a	0,69 ^a	88,00 ^b	-
		FI	-	1	-	0,77 ^a
	450	FS	0,304 ^a	0,74 ^a	89,55 ^b	-
		FI	-	1	-	0,74 ^a
	600	FS	0,341 ^a	0,67 ^a	73,70 ^a	-
		FI	-	1	-	0,77 ^a
1 : 0	250		-	1	-	2,47 ^d
	450		-	1	-	2,11 ^c
	600		-	1	-	2,21 ^c

As letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma coluna.

FS = fase superior e FI = fase inferior

Emulsões estabilizadas somente com WPI apresentaram viscosidade mais elevada com o aumento da pressão de homogeneização, enquanto que nas emulsões contendo somente lecitina foi observada uma redução da viscosidade apenas entre 250 e 450 bar. A fase inferior dos sistemas contendo a mistura dos emulsificantes na razão 1:1 apresentou viscosidade mais baixa quando comparada às viscosidades das emulsões verdadeiras, provavelmente devido à elevada quantidade de água resultante da separação de fases, e manteve-se igual e independente da pressão de homogeneização aplicada. Além disso, a fase inferior apresentou também valores de viscosidade menores que o da água, o que pode ser atribuído a uma reduzida sensibilidade da geometria utilizada para a realização desta medida em fluidos de viscosidade muito baixa. Já a fase superior destes sistemas apresentou viscosidade mais baixa na maior pressão, porém não foi observada uma modificação significativa nos índices de comportamento (n) e consistência (k) em relação à pressão aplicada.

4.4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida das emulsões e das fases separadas encontram-se apresentados na Figura 4.12. Nas condições não redutoras e redutoras, foram observadas para todas as condições de homogeneização, bandas bem marcadas no gel de resolução correspondentes às frações de β -Lg. Em geral, não foram observados grandes diferenças dos perfis eletroforéticos com relação à pressão de homogeneização. Nos géis de poliacrilamida não redutor, não foi visualizada a formação de agregados protéicos de alta massa molecular (> 200 kDa). Segundo estudos de Lee et al. (2008), altas pressões em torno de 500 a 2000 bar, aplicadas a emulsões O/A com 10% (m/m) de óleo de soja e 0,5% (m/m) de proteínas do soro causaram um desdobramento parcial e exposição de grupos hidrofóbicos das proteínas que facilitaram as interações das proteínas com a fase oleosa, aumentando a estabilidade da emulsão. Porém, as altas pressões de homogeneização forneceram mais energia para induzir mudanças adicionais na estrutura das proteínas e em sua interação com a fase oleosa, sendo o processo de desnaturação associado a um maior cisalhamento durante o processo de homogeneização. Assim, os resultados para sistemas contendo somente WPI apresentados na Figura 4.12 sugerem que as pressões aplicadas foram suficientes para expor grupos hidrofóbicos que interagissem com a fase oleosa resultando em emulsões estáveis frente à separação de fases. No entanto, não foram altas o bastante para promover a formação de agregados protéicos via ponte dissulfeto. A ausência de agregados poderia estar relacionada também ao favorecimento das interações eletrostáticas repulsivas (proteína-água) ao invés de ligações dissulfídicas, devido à elevada densidade de carga superficial neste pH. Nos sistemas que apresentaram separação de fases foi possível visualizar que as frações de β -Lg permaneceram mais evidentes na fase inferior do sistema, por se tratarem de frações mais hidrofílicas. Por outro lado, as bandas correspondentes às frações de α -La ocorreram somente na fase superior, onde bandas mais

intensas de BSA também foram observadas. Isto indica maior afinidade destas frações com a fase mais apolar e/ou a lecitina, provavelmente devido às suas características mais hidrofóbicas. Além disso, é possível observar o espalhamento das bandas a α -la e um arraste de frações menores que a α -la após a diluição da fase superior em tampão redutor. Isto sugere que as interações com a lecitina levaram a uma modificação na estrutura da proteína, uma vez que para as emulsões contendo somente WPI o mesmo não foi visualizado.

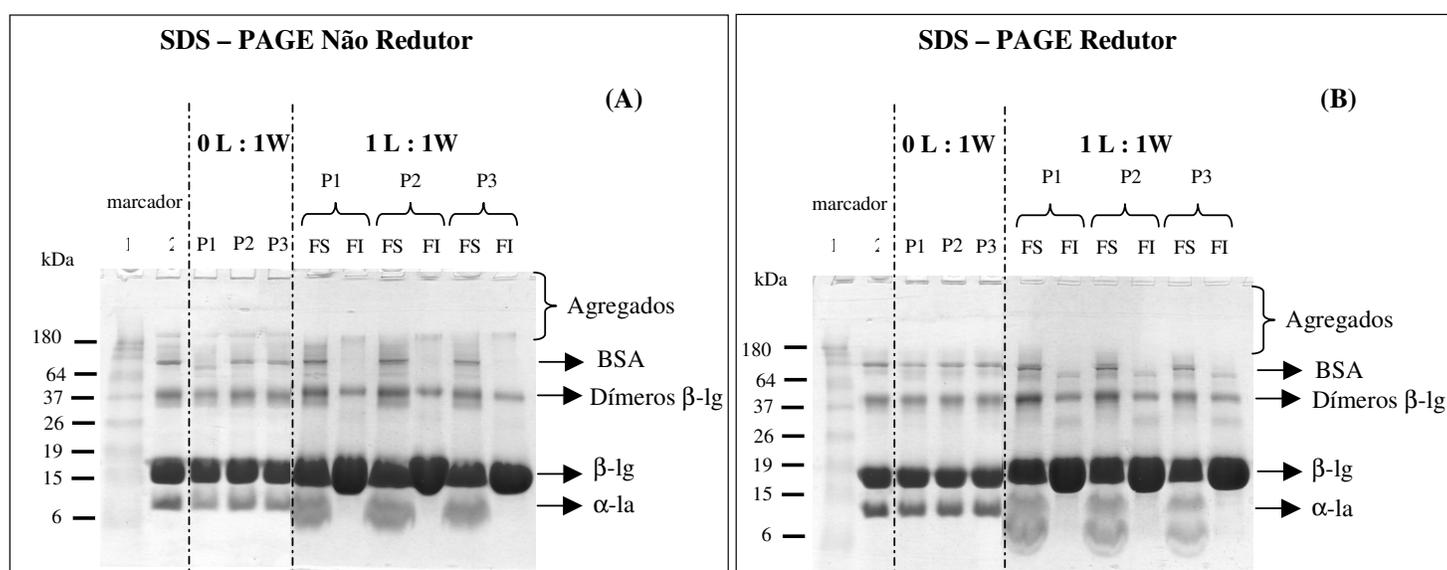


Figura 4.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das emulsões e m pH 3 contendo lecitina (L) e WPI (W) nas razões 0:1 e 1:1. (A) SDS PAGE - não redutor, (B) SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, Coluna 2: solução de WPI em pH 3. P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente. FS: fase superior e FI: fase inferior.

4.5. Emulsões estabilizadas em pH próximo ao pI das proteínas do soro

4.5.1. Estabilidade à cremeação

A estabilidade das emulsões em pH 5,5 pode ser observada na Figura 4.13. Dentre as razões de lecitina e WPI avaliadas, somente as emulsões preparadas com WPI (razão de 0:1) e homogeneizadas a 250 e 450 bar apresentaram separação de fases. O processo de desestabilização destas emulsões teve início 6 dias após o preparo das mesmas e seus índices de cremeação (Figura 4.14) foram de 1,3% e 0,3% (v/v) para as pressões de 250 e 450 bar, respectivamente. Estes resultados indicam que o aumento da pressão de homogeneização promoveu um aumento na estabilidade destes sistemas, provavelmente devido a uma maior exposição de grupos hidrofóbicos da proteína disponíveis para interação com o óleo. Devido ao pequeno volume da fase inferior observada nessas emulsões, todos os resultados apresentados a seguir foram obtidos somente na fase creme. Os resultados obtidos mostraram que a interação entre a proteína e a lecitina neste pH foi vantajosa, uma vez que os sistemas contendo ambos os emulsificantes não apresentaram separação de fases, diferentemente daqueles contendo somente WPI.



Figura 4.13. Estabilidade à cremeação após 7 dias de estocagem. Emulsões com fase aquosa em pH 5,5 estabilizadas por lecitina e WPI nas razões de (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 e homogeneizadas a (P1) 250 bar, (P2) 450 bar e (P3) 600 bar.

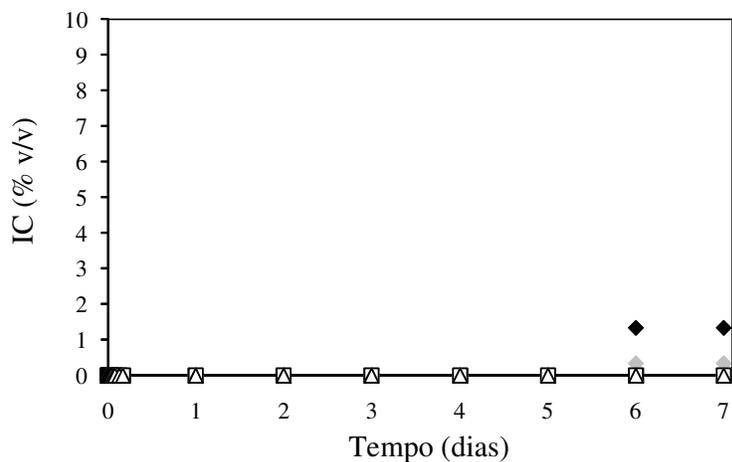


Figura 4.14. Índice de cremação (IC) de emulsões em pH 5,5 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (◇) 0:1, (□) 1:1 e (△) 1:0. Símbolo cheio: 250 bar, hachurado: 450 bar e vazio: 600 bar.

4.5.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas

As microscopias das emulsões estão apresentadas na Figura 4.15. A partir delas foi possível observar uma desestabilização devido aos processos de floculação e coalescência das gotas de óleo para as emulsões contendo somente WPI durante o período de estocagem (7 dias), sobretudo para as pressões de 250 e 600 bar. No entanto, para as demais razões de emulsificantes não foram observadas alterações nas micrografias quanto ao tamanho ou dispersão de tamanho das gotas como efeito da pressão ou tempo de estocagem.

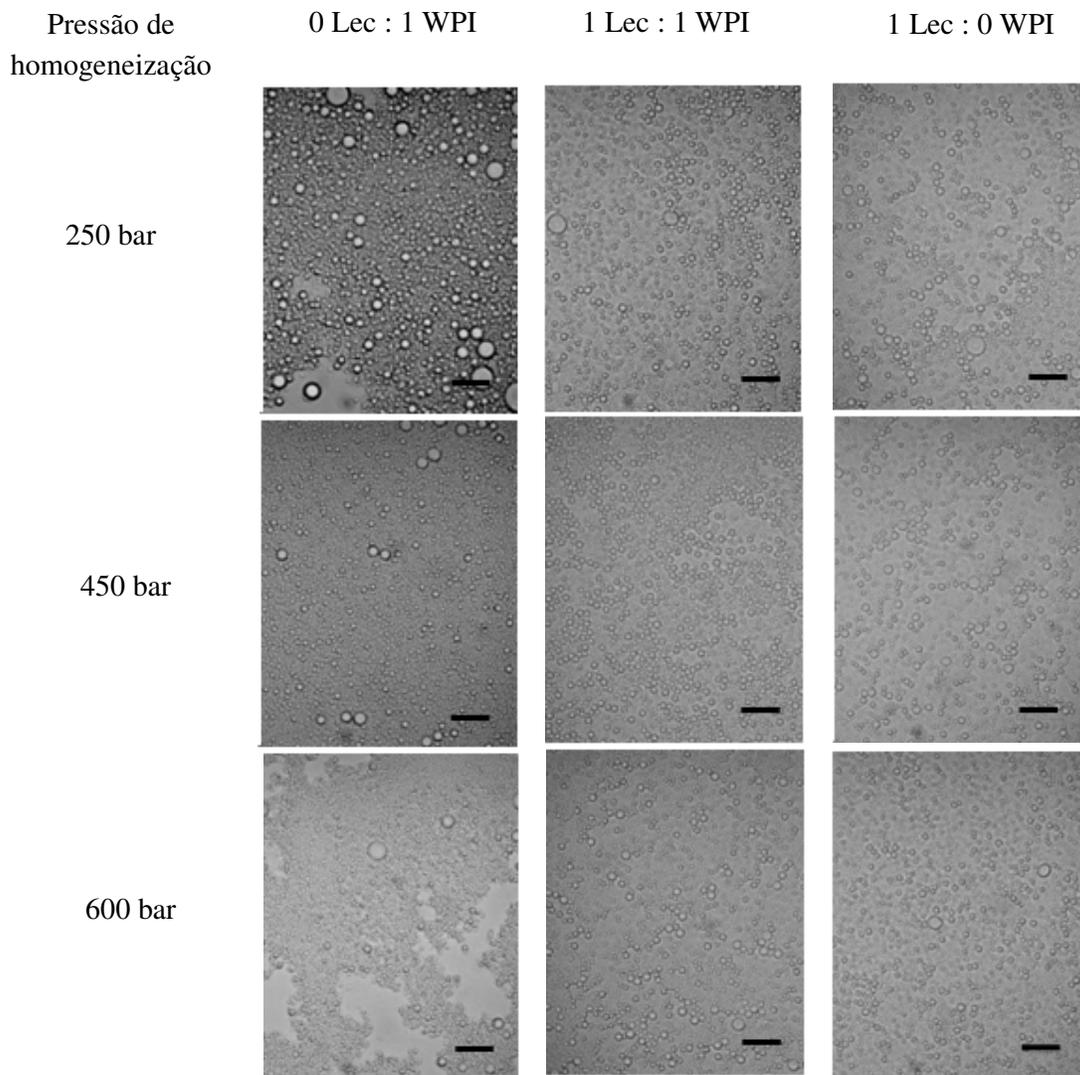


Figura 4.15. Micrografia das emulsões em pH 5,5 contendo lecitina (Lec) e/ou WPI após 7 dias de estocagem. Barra da escala = 10 μm .

Na Tabela 4.4 é possível observar que, imediatamente após o preparo, as emulsões contendo WPI apresentaram uma redução estatisticamente significativa dos valores de diâmetro médio (d_{32}) de 1,49 para 0,91 μm com o aumento da pressão de homogeneização. Porém, tais emulsões mostraram-se instáveis durante o período de estocagem de 7 dias, apresentando aumento de 50 e 70% nas pressões de 250 e 450 bar, respectivamente, e de 1,15 μm (aumento de 126%) para a pressão de 600 bar, sugerindo que estes sistemas passaram por processos de desestabilização que promoveram aumento do diâmetro de gota como havia sido

observado nas micrografias. Estes processos provavelmente foram viabilizados pela fraca repulsão eletrostática entre as gotas devido à proximidade do pH ao pI das proteínas. Já as emulsões estabilizadas somente por lecitina apresentaram uma pequena variação do tamanho de gota com o aumento da pressão, indicando que trata-se de um emulsificante menos sensível à aplicação de altas pressões. Nos sistemas contendo ambos os emulsificantes na razão 1:1 foi observada uma diminuição gradativa do d_{32} com o aumento da pressão de homogeneização de 250 para 600 bar. A interação das proteínas com a lecitina mostrou-se favorável pois levou à estabilização das emulsões em pH próximo ao pI da proteína do soro, uma vez que não houve variação dos diâmetros durante o período de estocagem. Além disso, os tamanhos de gota observados para as maiores pressões foram menores que aqueles observados para as emulsões contendo somente lecitina, o que pode contribuir com o aumento da estabilidade das emulsões. Comas et al. (2006) também verificaram menores tamanhos de gota em emulsões estabilizadas por proteína de soja e lecitina em pH próximo ao pI da proteína e atribuiu este resultado a uma maior interação entre as proteínas, já que estas se encontram menos carregadas, e a lecitina.

Tabela 4.4. Diâmetros médios de gota (d_{32}) em μm de em pH 5,5 contendo lecitina e proteína do soro.

Pressão (bar)	0 Lec : 1 WPI		1 Lec : 1 WPI		1 Lec : 0 WPI	
	t0	t7	t0	t7	t0	t7
250	1,49 ^{Ac}	2,25 ^{Bc}	1,55 ^{Bc}	1,49 ^{Ac}	1,43 ^{Aa}	1,43 ^{Aab}
450	1,08 ^{Ab}	1,85 ^{Ba}	1,27 ^{Bb}	1,24 ^{Ab}	1,40 ^{Ba}	1,39 ^{Aa}
600	0,91 ^{Aa}	2,07 ^{Bb}	1,10 ^{Ba}	1,09 ^{Aa}	1,53 ^{Bb}	1,49 ^{Ab}

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre os tempos de estocagem para um mesmo sistema. Letras minúsculas: diferenças dentro da mesma coluna.

A Figura 4.16 mostra a distribuição do tamanho de gotas das emulsões estabilizadas por WPI e/ou lecitina. Observa-se que para todos os sistemas e condições de pressão as curvas apresentaram uma distribuição monomodal. Além disso, a maior parte dos sistemas, com

exceção daqueles estabilizados somente por WPI, não apresentaram diferenças em suas curvas de distribuição de tamanho de gota ao longo do período de estocagem avaliado. As curvas das emulsões estabilizadas por WPI apresentaram um deslocamento para a direita (maiores diâmetros de gota), sendo este deslocamento mais acentuado na maior pressão de homogeneização. Dessa forma, a pressão encontra-se diretamente relacionada aos processos de coalescência e floculação ocorridos, sendo os mecanismos de desestabilização do sistema mais intensos quanto mais severas foram as condições de processo. Já as emulsões contendo somente lecitina apresentaram maior polidispersão quando homogeneizadas na pressão de 600 bar, o que acabou refletindo no aumento do diâmetro médio (Tabela 4.4). As curvas de distribuição das emulsões contendo WPI e lecitina na razão 1:1 foram muito semelhantes às curvas dos sistemas puros de lecitina para as pressões mais baixas, porém não apresentaram um aumento na polidispersão na pressão de 600 bar. Além disso, as curvas apresentaram um leve e gradativo deslocamento para a esquerda (menores diâmetros de gota) com o aumento da pressão, resultado este que levou a uma diminuição do d_{32} em maiores pressões (Tabela 4.4).

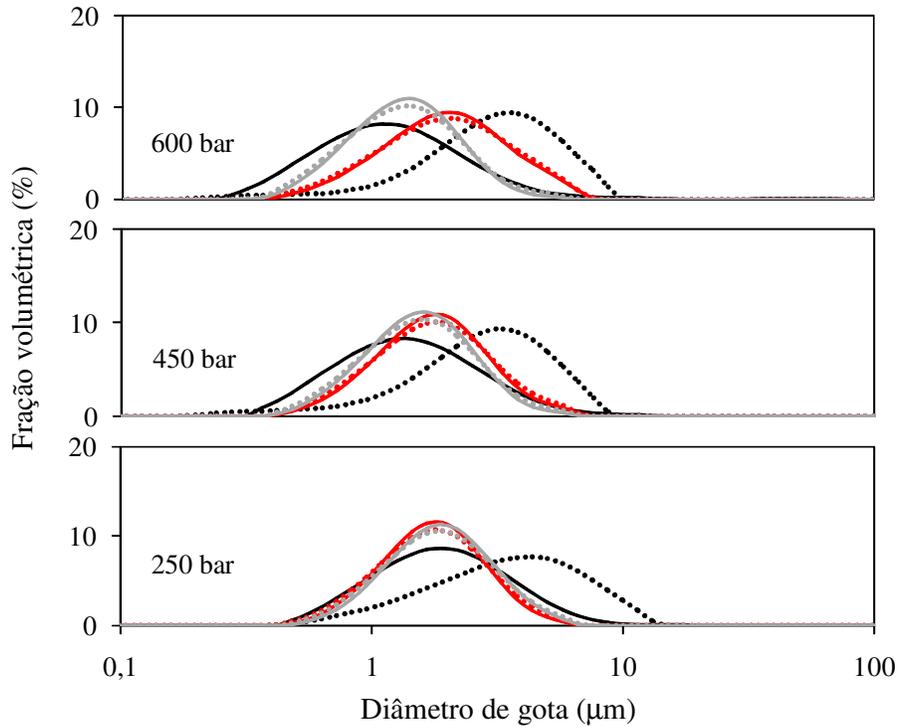


Figura 4.16. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões em pH 5,5 estabilizadas por lecitina e WPI em diferentes razões. t0: (—) 0:1, (—) 1:1 e (—) 1:0. t7: (.....) 0:1, (.....) 1:1 e (.....) 1:0.

4.5.3. Carga superficial

Os valores de potencial ζ para os sistemas avaliados em pH 5,5 encontram-se descritos na Tabela 4.2. As emulsões estabilizadas somente por WPI apresentaram gotas pouco carregadas e com carga superficial negativa (em torno de -12 mV), resultante da desprotonação dos grupos amino já que o pH do meio encontra-se levemente acima do pI da proteína. Assim, a proximidade do pH ao pI da proteína leva ao aumento das forças atrativas entre as moléculas de proteína, resultando em auto-associação dos componentes protéicos adsorvidos e não-adsorvidos à interface, resultando na desestabilização da emulsão (Allen et al., 2006). Já as emulsões estabilizadas por lecitina apresentaram gotas negativamente carregadas, sendo que os valores absolutos de potencial ζ foram relativamente altos (próximo

de -40 mV), o que provavelmente promoveu maior estabilidade eletrostática pela força de repulsão entre as gotas, evitando a separação de fases. Os sistemas contendo a mistura de emulsificantes na razão 1:1 apresentaram partículas negativamente carregadas. Os valores observados para estes sistemas foram intermediários entre as cargas superficiais das emulsões contendo somente WPI ou lecitina e um pouco abaixo de -20 mV. Apesar de não apresentarem um valor absoluto muito elevado (Chuah et al., 2009), os sistemas foram estáveis durante o período de 7 dias de estocagem, o que não ocorreu nas emulsões estabilizadas somente por WPI, sugerindo que a lecitina foi fundamental na estabilidade das emulsões. Comas et al. (2006) não atribuíram esta estabilidade a um aumento na atividade superficial e sim à contribuição de carga da lecitina na interface.

Tabela 4.5. Potencial ζ (mV) de emulsões em pH 5,5 com 30% (m/m) de óleo de soja contendo lecitina e proteína do soro em diferentes razões.

Pressão (bar)	0 Lec : 1 WPI	1 Lec : 1 WPI	1 Lec : 0 WPI
250	-12,73 ^a ($\pm 0,71$)	-23,62 ^a ($\pm 0,93$)	-39,68 ^a ($\pm 1,41$)
450	-12,20 ^{ab} ($\pm 1,19$)	-18,00 ^b ($\pm 1,02$)	-39,35 ^a ($\pm 0,95$)
600	-11,22 ^b ($\pm 0,44$)	-22,52 ^a ($\pm 1,66$)	-37,78 ^b ($\pm 0,44$)

As letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma coluna.

4.5.4. Reologia

As curvas de escoamento em estado estacionário estão ilustradas na Figura 4.17. Todos os sistemas apresentaram um comportamento de fluido Newtoniano ($n = 1$), exceto aqueles contendo somente WPI (razão 0:1), que mostraram um comportamento de fluido pseudoplástico ($n < 1$). Os dados das curvas de escoamento que apresentaram comportamento Newtoniano permitiram a determinação de sua viscosidade newtoniana, enquanto os demais foram ajustados ao modelo lei de potência, apresentando coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,999 em todos os sistemas estudados. Os dados referentes ao ajuste do modelo,

bem como os valores de viscosidade aparente a uma taxa de deformação de 100 s^{-1} encontram-se apresentados na Tabela 4.6.

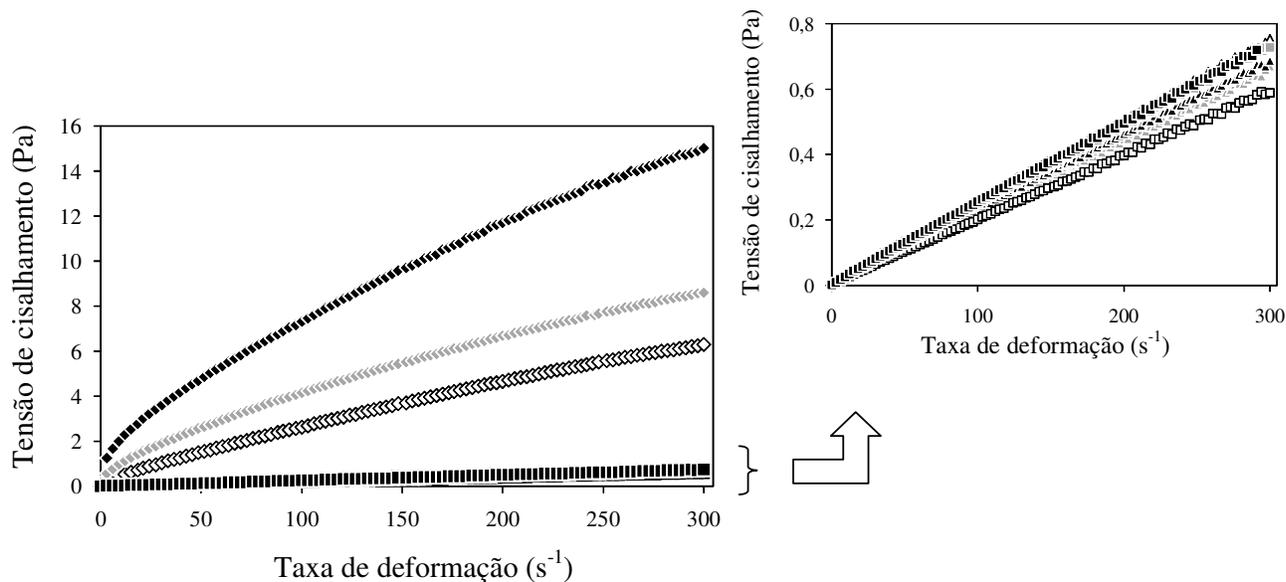


Figura 4.17. Curvas de escoamento de emulsões em pH 5,5 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square) 1:1 e (\triangle) 1:0. Símbolo vazio: 250bar, hachurado: 450 bar e cheio: 600 bar.

Tabela 4.6. Viscosidade Newtoniana (η), viscosidade aparente na taxa de deformação de 100 s^{-1} ($\eta_{100\text{s}^{-1}}$) e índices de consistência (k) e comportamento (n) de emulsões em pH 5,5 contendo lecitina e proteína do soro

Razão (Lec : WPI)	Pressão (bar)	k (Pa.s ⁿ)	n	$\eta_{100\text{s}^{-1}}$ (mPa.s)	η (mPa.s)
0 : 1	250	0,096 ^a	0,80 ^c	25,45 ^a	-
	450	0,204 ^b	0,66 ^b	42,00 ^b	-
	600	0,408 ^c	0,64 ^a	74,50 ^c	-
1 : 1	250	-	1	-	1,98 ^a
	450	-	1	-	2,46 ^b
	600	-	1	-	2,48 ^b
1 : 0	250	-	1	-	2,47 ^b
	450	-	1	-	2,21 ^b
	600	-	1	-	2,31 ^b

As letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma coluna.

Para as emulsões estabilizadas somente com WPI foi possível observar que o aumento da pressão de homogeneização levou a um aumento da viscosidade aparente a 100 s^{-1} , sendo

que este efeito também foi observado para o índice de comportamento (k). Além disso, houve redução do índice de comportamento (n), o que indica intensificação do comportamento pseudoplástico com o aumento da pressão. Assim, a estabilidade frente à cremeação das emulsões contendo somente WPI e homogeneizadas a 600 bar pode ser atribuída à alta viscosidade que promoveu uma menor mobilidade das gotas, evitando a separação de fases.

As emulsões contendo somente lecitina como agente emulsificante não apresentaram diferença significativa entre os valores de viscosidade newtoniana com o aumento da pressão de homogeneização. Já os sistemas contendo ambos os emulsificantes apresentaram um aumento da viscosidade aumentando a pressão de 250 para 450 bar, sendo que este valor se manteve com o posterior aumento da pressão para 600 bar. Em geral, os valores de viscosidade obtidos para os sistemas contendo lecitina e WPI nas razões 1:1 e 1:0 não foram estatisticamente diferentes, enquanto as viscosidades observadas nos sistemas de razão 0:1 foram muito mais elevadas, o que sugere uma modificação das propriedades emulsificantes da proteína na presença de lecitina.

4.5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida das emulsões contendo WPI encontram-se apresentados na Figura 4.18. As emulsões contendo somente WPI apresentaram, nas condições não redutoras e redutoras, bandas bem marcadas no gel de correspondentes às frações de β -Lg e α -La, para todas as condições de homogeneização. Nos mesmos géis de poliacrilamida, pode-se observar bandas referentes à fração BSA e dímeros de β -Lg, respectivamente. Ainda para as emulsões contendo somente WPI (razão 0 L : 1W), foi visualizada nos géis de poliacrilamida não redutor, a formação de agregados protéicos de alta massa molecular (massa molecular maior que 200 kDa de acordo com Copeland, 1990). Estas bandas foram mais marcantes com o aumento da pressão de homogeneização. Quando

estas emulsões foram dissolvidas em tampão redutor, as bandas correspondentes aos agregados de alta massa molecular desapareceram, sugerindo que os agregados estavam ligados por pontes dissulfídicas, resultantes da exposição de grupos hidrofóbicos da proteína devido aos efeitos do pH e da pressão. Tal conclusão é possível pois no tampão redutor, além da presença do agente SDS, encontra-se presente o agente β -mercaptoetanol, que apresenta ação redutora sobre as interações dissulfídicas formadas entre os grupos tiol (SH) livres das proteínas do soro (Cavallieri et al., 2007, Vardhanabhuti & Foegeding, 1999). É provável que a formação de agregados de alta massa molecular esteja diretamente relacionada à presença de óleo e às interações da proteína na interface, uma vez que para as soluções de WPI de mesma concentração protéica, pH e homogeneizadas nas mesmas pressões tal formação não foi observada (Figura 4.6).

As emulsões contendo lecitina e WPI na razão 1:1 não apresentaram a formação de agregados de alta massa molecular, provavelmente por possuírem menor concentração de WPI (1% m/m). Outra possibilidade seria que os sítios que anteriormente encontravam-se expostos para a ocorrência de interações entre moléculas de proteína tenham se ligado com a lecitina, impedindo a formação de agregados protéicos. Porém, no gel de poliacrilamida não redutor, nas regiões de massa molecular entre 180 e 64 kDa foram observadas bandas que se tornaram suavemente mais intensas com o aumento da pressão de homogeneização. Quando estas emulsões foram dissolvidas em tampão redutor, estas bandas desapareceram e as de α -la se tornaram mais marcadas, sendo mais intensas quanto maior a pressão de homogeneização. Este fato pode estar relacionado à presença de lecitina, visto que o mesmo não ocorreu para as emulsões contendo somente WPI como agente emulsificante.

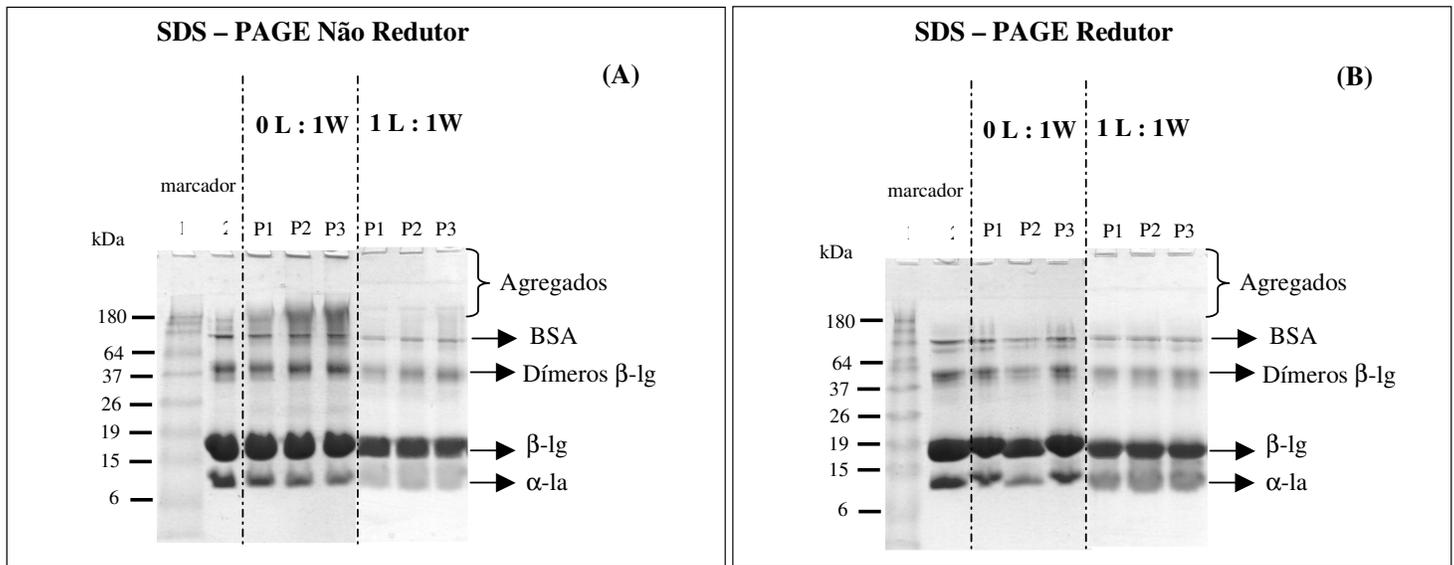


Figura 4.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das emulsões em pH 5,5 contendo lecitina (L) e WPI (W) nas razões 0:1 e 1:1. (A) SDS PAGE - não redutor, (B) SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, Coluna 2: solução de WPI em pH 3. P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente.

4.6. Emulsões estabilizadas em pH acima do pI das proteínas do soro

4.6.1. Estabilidade à cremação

O teste de estabilidade (Figura 4.19) mostrou que nenhuma das razões de lecitina e WPI avaliadas apresentou separação de fases após 7 dias de estocagem para as pressões de homogeneização estudadas, quando preparadas em pH 7. Todas as emulsões foram líquidas, com aspecto semelhante ao leite após o processo de homogeneização, sendo que houve uma variação de coloração de branco para amarelo com o aumento da concentração de lecitina. Além disso, nas emulsões contendo somente lecitina como agente emulsificante foi observado um aumento gradativo da intensidade de cor amarela ao longo da proveta, sendo que no topo esta coloração apresentou-se suavemente mais intensa, porém não foi detectada a separação em duas fases distintas e bem definidas.

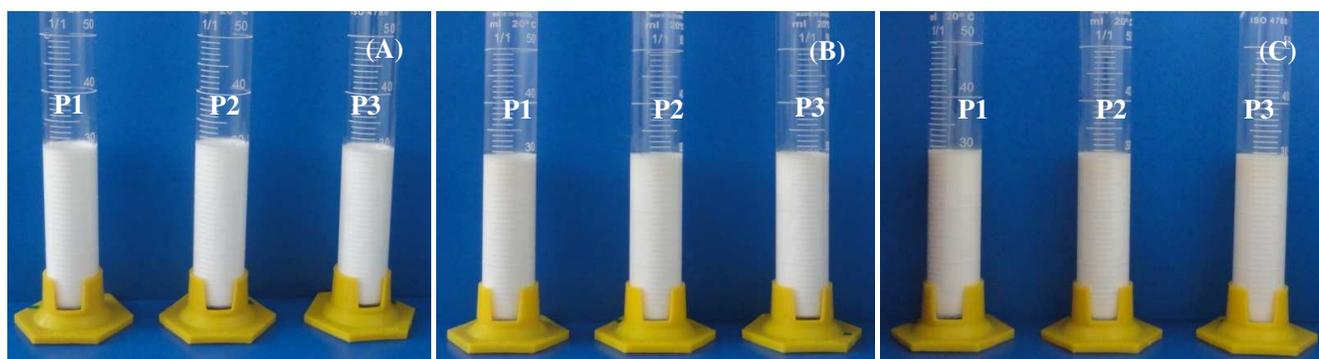


Figura 4.19. Estabilidade à cremação após 7 dias de estocagem. Emulsões em pH 7 estabilizadas por lecitina e WPI nas razões de (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 e homogeneizadas a (P1) 250 bar, (P2) 450 bar e (P3) 600 bar.

4.6.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gotas

A partir das micrografias apresentadas na Figura 4.20, foi possível visualizar em todos os sistemas uma elevada polidispersão e presença de gotas muito grandes que poderiam ser um indício de coalescência. Porém, os valores de diâmetro médio (d_{32}) (Tabela 4.7)

mostraram que as emulsões contendo lecitina e/ou WPI em pH 7 de modo geral não pareceram aumentar de tamanho de gota durante o período de estocagem, apesar de terem apresentado diferença significativa em alguns casos. Os sistemas contendo lecitina e WPI nas razões de 0:1 e 1:1 apresentaram uma redução estatisticamente significativa com o aumento da pressão de homogeneização, sendo que o uso da mistura de emulsificantes levou ao menor tamanho médio de gota para todas as condições de pressão. No entanto, as emulsões contendo somente lecitina apresentaram uma redução do d_{32} com o aumento da pressão de 250 para 450 bar, seguida de um aumento estatisticamente significativo com o posterior aumento da pressão para 600 bar.

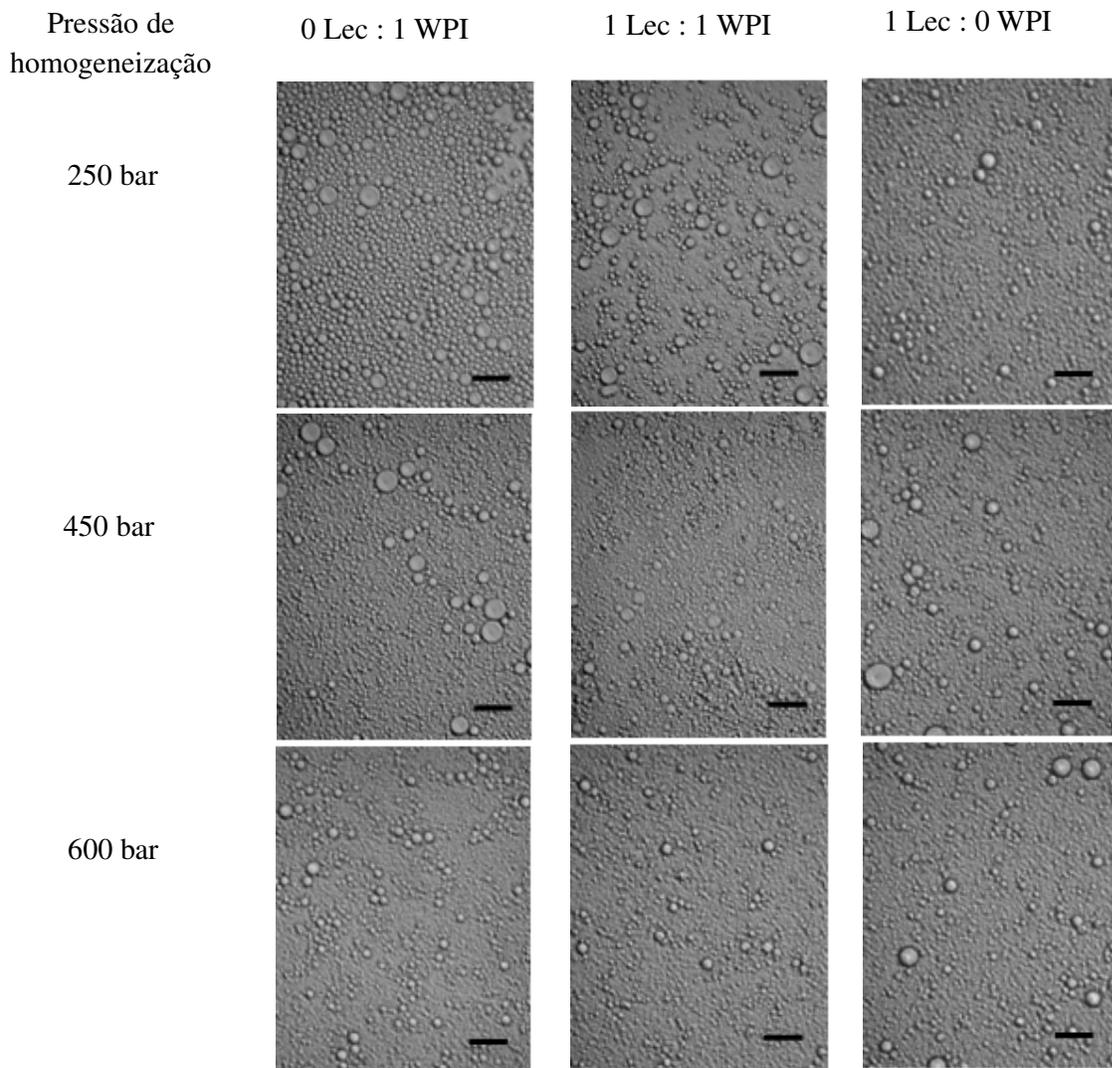


Figura 4.20. Micrografia das emulsões em pH 7 contendo lecitina (Lec) e/ou WPI após 7 dias de estocagem. Barra da escala = 10 μm .

Tabela 4.7. Diâmetro médio de gota (d_{32}) em μm de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro.

Pressão (bar)	0 Lec : 1 WPI		1 Lec : 1 WPI		1 Lec : 0 WPI	
	t0	t7	t0	t7	t0	t7
250	1,71 ^{Ac}	1,75 ^{Bc}	1,55 ^{Ac}	1,54 ^{Ac}	1,53 ^{Ac}	1,58 ^{Ab}
450	1,48 ^{Ab}	1,47 ^{Ab}	1,35 ^{Bb}	1,31 ^{Ab}	1,41 ^{Aa}	1,39 ^{Aa}
600	1,29 ^{Ba}	1,23 ^{Aa}	1,19 ^{Aa}	1,20 ^{Ba}	1,51 ^{Ab}	1,52 ^{Ab}

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre os tempos de estocagem para um mesmo sistema. Letras minúsculas: diferenças dentro da mesma coluna.

Em geral, não foi possível visualizar nas curvas de distribuição (Figura 4.21) grandes diferenças quanto à dispersão dos tamanhos de gota para os diferentes sistemas, exceto para as emulsões contendo somente lecitina, nas quais foi observado um aumento gradativo do volume de gotas com maior d_{32} com o aumento da pressão, sendo este bem mais acentuado na pressão de 600 bar. Os sistemas contendo lecitina e WPI nas razões 0:1 e 1:1 apresentaram um leve deslocamento da curva de distribuição para a esquerda (menores tamanhos de gota) com o aumento da pressão de homogeneização, o que acabou refletindo na diminuição dos valores de d_{32} (Tabela 4.7).

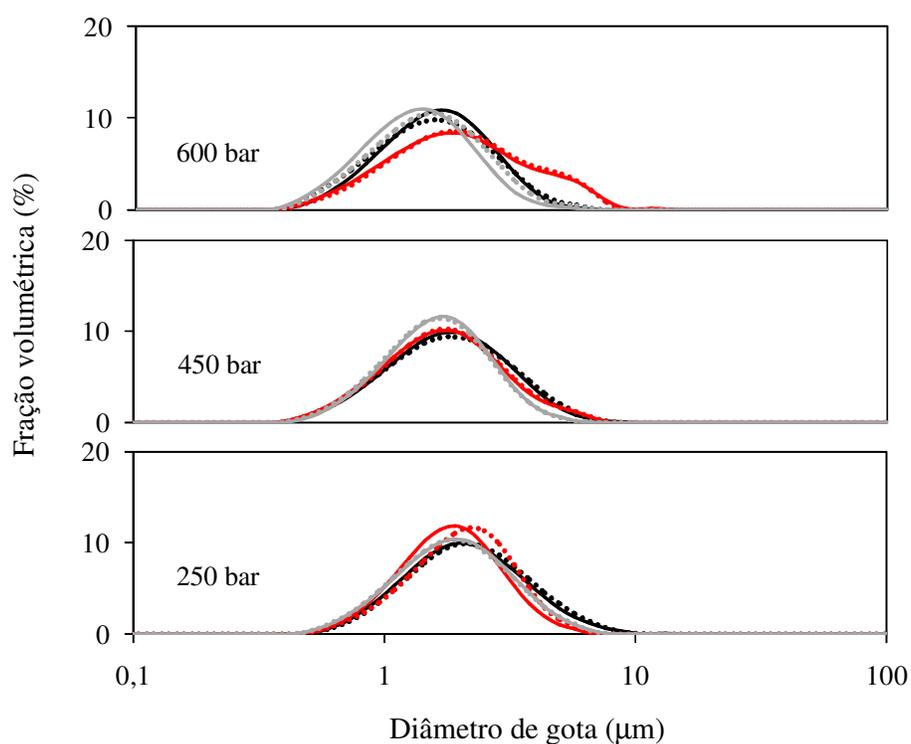


Figura 4.21. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões em pH 7 estabilizadas por lecitina e WPI em diferentes razões. No dia do preparo (0 dias): (—) 0:1, (—) 1:1 e (—) 1:0. Após 7 dias de estocagem: (.....) 0:1, (.....) 1:1 e (.....) 1:0.

4.6.3. Carga superficial

Os valores de potencial ζ para os sistemas avaliados em pH 7 encontram-se descritos na Tabela 4.8. Para todas as razões de lecitina e WPI, as gotas formadas apresentaram cargas superficiais muito próximas, que variaram de -26 até -37 mV, e valores absolutos relativamente altos, o que pode ter contribuído na estabilização dos sistemas por intensificar a repulsão eletrostática (Chuah et al., 2009), evitando processos de coalescência ou floculação das gotas.

Tabela 4.8. Potencial ζ (mV) de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro em diferentes razões.

Pressão (bar)	0 Lec : 1 WPI	1 Lec : 1 WPI	1 Lec : 0 WPI
250	$-29,62^a (\pm 0,43)$	$-33,13^b (\pm 1,90)$	$-26,43^a (\pm 1,54)$
450	$-33,08^b (\pm 1,21)$	$-28,33^a (\pm 0,48)$	$-37,15^b (\pm 1,50)$
600	$-30,05^a (\pm 1,32)$	$-27,37^a (\pm 0,55)$	$-35,70^b (\pm 1,93)$

As letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma coluna.

4.6.4. Reologia

As curvas de escoamento em estado estacionário encontram-se na Figura 4.22. Todos os sistemas apresentaram um comportamento de fluido Newtoniano ($n = 1$). Os dados das curvas de escoamento permitiram a determinação de sua viscosidade (Tabela 4.9), apresentando coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,999 em todos os sistemas estudados.

As emulsões contendo WPI, seja como único agente emulsificante ou na presença de lecitina, apresentaram um aumento da viscosidade estatisticamente significativa com o aumento da pressão de homogeneização. Outros trabalhos também reportaram o aumento da viscosidade com a pressão em emulsões estabilizadas por proteínas (Cortés-Muñoz et al., 2009; Santana, 2009). Isto pode ser atribuído à diminuição do diâmetro de gotas consequente

do aumento da pressão que resulta em maior interação entre elas, levando à elevação da viscosidade do sistema. Nas emulsões estabilizadas somente por lecitina não foi observada variação da viscosidade. Isto sugere que as proteínas são mais susceptíveis a alterações consequentes do efeito da pressão, provavelmente devido ao seu tipo de estrutura.

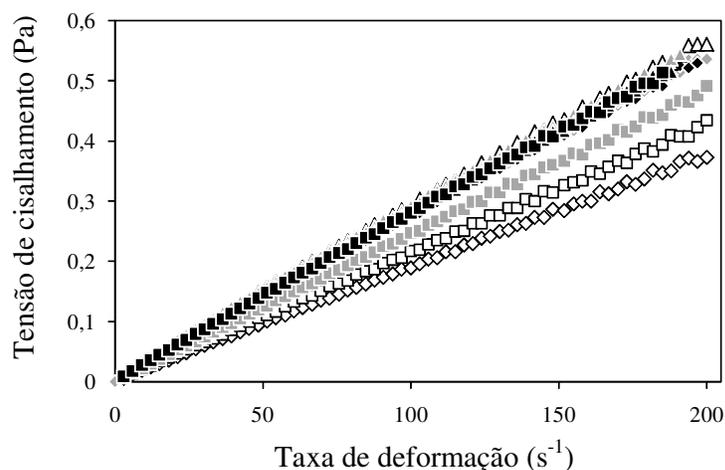


Figura 4.22. Curvas de escoamento de emulsões em pH 7 em diferentes condições. Razões lecitina : WPI (\diamond) 0:1, (\square) 1:1 e (\triangle) 1:0. Símbolo vazio: 250 bar, hachurado: 450 bar e cheio: 600 bar.

Tabela 4.9. Viscosidade Newtoniana (η) de emulsões em pH 7 com 30% (m/m) de óleo de soja contendo lecitina e proteína do soro

Razão (Lec : WPI)	Pressão (bar)	η (mPa.s)
0 : 1	250	1,92 ^a (\pm 0,04)
	450	2,67 ^{bc} (\pm 0,07)
	600	2,70 ^{bc} (\pm 0,03)
1 : 1	250	2,15 ^a (\pm 0,03)
	450	2,46 ^b (\pm 0,06)
	600	2,72 ^c (\pm 0,02)
1 : 0	250	2,79 ^c (\pm 0,06)
	450	2,82 ^c (\pm 0,11)
	600	2,79 ^c (\pm 0,02)

As letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma coluna.

4.6.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida das emulsões contendo WPI, na presença ou não de lecitina, encontram-se apresentados na Figura 4.23. Para os sistemas contendo somente WPI, nas condições não redutoras e redutoras, foram observadas, para todas as condições de homogeneização, bandas bem marcadas de β -Lg. Foram observadas pequenas bandas referentes à fração BSA e dímeros de β -Lg, respectivamente. Além disso, foi visualizada nos géis de poliacrilamida não redutor, na região do sobregel (região superior do gel de poliacrilamida), a formação de agregados protéicos de alta massa molecular, sendo mais fortemente marcados com o aumento da pressão. Quando estas emulsões foram dissolvidas em tampão redutor, as bandas correspondentes aos agregados de elevada massa molecular desapareceram, sugerindo que os agregados estavam ligados por pontes dissulfídicas, e as bandas correspondentes às frações de α -la tornaram-se mais intensas. É interessante lembrar que, para a solução de WPI nas mesmas condições (Figura 4.6), assim como em pH 5,5, a formação de agregados de alta massa molecular não foi observada.

As emulsões contendo lecitina e WPI na razão 1:1 apresentaram resultados muito semelhantes àqueles apresentados para as emulsões de mesma composição e condições de pressão em pH 5,5 (Figura 4.18). Não houve a formação de agregados de alta massa molecular. Porém, no gel de poliacrilamida não redutor, nas regiões de massa molecular entre 180 e 64 kDa foram observadas bandas que se tornaram suavemente mais intensas com o aumento da pressão de homogeneização. Quando estas emulsões foram dissolvidas em tampão redutor estas bandas diminuíram de intensidade e aquelas referentes à α -la tornaram-se mais marcadas, além do aparecimento de uma banda correspondente a frações menores que a α -la. Este fato pode estar associado à presença de lecitina no sistema, uma vez que o mesmo não ocorreu para as emulsões contendo somente WPI como agente emulsificante.

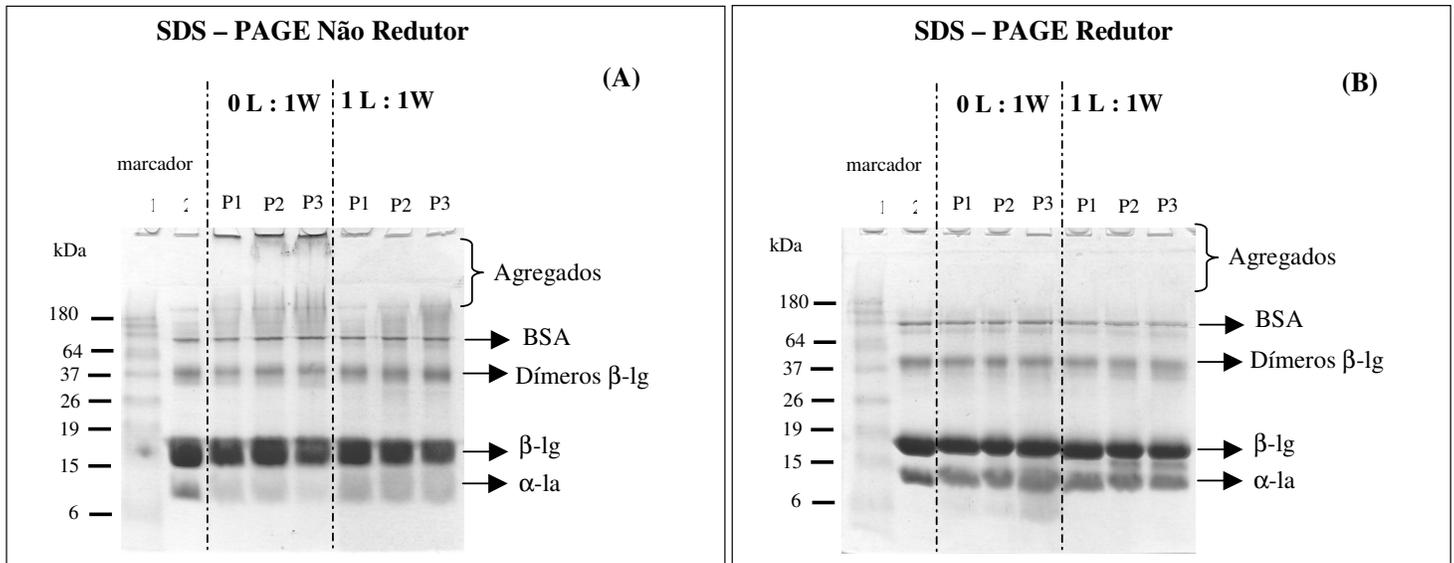


Figura 4.23. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das emulsões e m pH 7 contendo lecitina (L) e WPI (W) nas razões 0:1 e 1:1. (A) SDS PAGE - não redutor, (B) SDS PAGE - redutor. Coluna 1: marcador de massa molecular comercial, Coluna 2: solução de WPI em pH 7. P1, P2 e P3: correspondem às pressões de homogeneização de 250, 450 e 600 bar, respectivamente.

4.7. Efeito do pH na estabilidade das emulsões estabilizadas por lecitina e/ou WPI

As emulsões estabilizadas somente por WPI nos pHs 3 e 7 apresentaram propriedades semelhantes, sendo que em ambos os casos os sistemas foram estáveis e apresentaram baixa viscosidade (comportamento newtoniano). Além disso, foram observou-se redução gradativa do tamanho de gota com o aumento da pressão de homogeneização. Tais similaridades podem ser atribuídas às elevadas densidades de carga superficial das gotas uma vez que tratam-se de valores de pH distantes do pI da proteína. Já as emulsões contendo somente WPI em pH 5,5 foram cineticamente instáveis, apresentando grande aumento do tamanho de gota ao longo do período de estocagem e até mesmo separação de fases nas pressões mais baixa, além de elevada viscosidade. Os ensaios de eletroforese das emulsões contendo somente WPI mostraram que a mudança de pH resultou em uma diferença de comportamento estrutural da proteína frente aos efeitos da pressão. Isto porque a formação de agregados de alta massa molecular não foi visualizada somente em pH 3, sugerindo que a interação por pontes dissulfeto tornou-se inviável neste caso. Em pH 5,5, a baixa densidade de carga superficial pode ter levado à formação de agregados ainda maiores devido à fraca repulsão entre as gotas, comprometendo a estabilidade das emulsões. Já em pH 7, as emulsões permaneceram estáveis pois apresentaram maior magnitude de potencial ζ do que aqueles encontrados em pH 5,5 (Figura 4.5) devido a maior desprotonação dos grupos carboxílicos da proteína neste pH, tornando-a mais negativamente carregada (Hong e McClements, 2007).

Por outro lado, as propriedades das emulsões estabilizadas somente por lecitina não se mostraram dependentes do pH, sendo todas estáveis ao longo do período de estocagem estudado o que pode ser atribuído à elevada densidade de carga superficial das gotas quando recobertas por este emulsificante. Estes sistemas apresentaram baixa viscosidade e pequena variação do tamanho de gota com o aumento da pressão de homogeneização com uma

tendência à recoalescência, caracterizada pela redução inicial seguida de aumento do tamanho das gotas devido ao aumento da pressão.

Já os sistemas contendo a mistura de WPI e lecitina foram instáveis somente em pH 3, condição na qual os emulsificantes encontram-se opostamente carregados levando à formação de complexos moleculares e elevada instabilidade cinética. Nos demais valores de pH, as emulsões estabilizadas pela mistura de WPI e lecitina foram estáveis, apresentaram baixa viscosidade e redução do tamanho de gota com o aumento da pressão. Além disso, o uso da mistura de emulsificantes levou a menores tamanhos de gota nas maiores pressões em comparação ao uso das proteínas ou da lecitina, isoladamente, podendo promover o aumento da estabilidade das emulsões. Os ensaios de eletroforese das emulsões contendo a mistura de WPI e lecitina deram indícios de que as interações das proteínas com a lecitina levaram a modificações estruturais na proteína que impediram a formação de agregados de alta massa molecular e promoveu o aparecimento de bandas entre as frações de β -lg e α -la nos pHs 5,5 e 7. Além disso, em pH 3 foi observado o espalhamento das bandas correspondentes às frações de α -la e o surgimento de bandas correspondentes a frações de baixa massa molecular (menores que a α -la), que não foram visualizadas nos sistemas contendo somente WPI.

4.8. Simulação de digestão *in vitro* em emulsões contendo lecitina e/ou WPI

Ensaio de digestão *in vitro* foram realizados nas emulsões, mesmo nas quais tinha ocorrido algum dos mecanismos físicos de desestabilização (coalescência ou floculação) durante o período de estocagem, desde que não tenham apresentado separação de fases.

4.8.1. Digestão gástrica

Na etapa de digestão gástrica, utilizou-se uma pressão de homogeneização fixa uma vez que os resultados de estabilidade das emulsões não apresentaram grandes alterações nas diferentes pressões estudadas. Assim, os sistemas foram preparados em um valor de pressão intermediário de 450 bar e os efeitos da composição e do pH foram avaliados.

4.8.1.2. Estabilidade

O aspecto visual (Figura 4.24) após a simulação da digestão gástrica variou com a composição de emulsificantes porém não foi afetado pelo pH de preparo das emulsões. Dentre os sistemas estudados, todos contendo lecitina apresentaram uma fase de óleo livre superior, o que indica diminuição da atividade de superfície do emulsificante, e uma fase inferior, sendo esta mais límpida para as emulsões estabilizadas pela mistura de emulsificantes e mais esbranquiçada para aquelas contendo somente lecitina. Ambos os sistemas apresentaram partículas em suspensão semelhantes àquelas visualizadas na dispersão do fosfolípido em água (Seção 4.1). Os sistemas estabilizados somente por lecitina, aparentemente, apresentaram um volume maior de óleo liberado quando comparados àqueles estabilizados pela mistura de lecitina e WPI. Como as emulsões estabilizadas somente por WPI não apresentaram uma camada visível de óleo, pode-se concluir que o óleo liberado provavelmente estava ligado à lecitina, sendo que o volume foi menor para emulsões

estabilizadas pela mistura de lecitina e WPI pois uma parcela do óleo do sistema permaneceu adsorvido na proteína.

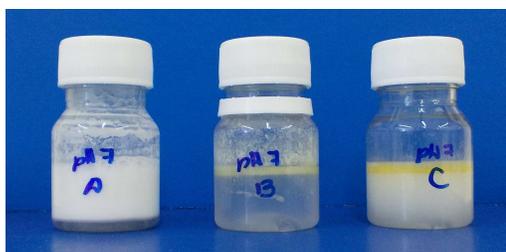


Figura 4.24. Aspecto visual típico para emulsões contendo lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 após simulação de digestão gástrica

4.8.1.3. Diâmetro e distribuição do tamanho de gota

A Tabela 4.10 apresenta o diâmetro médio de gota (d_{32}) das emulsões antes e depois da simulação da etapa gástrica de digestão. Foi possível observar que a incubação em fluido semelhante ao gástrico levou a uma mudança significativa no tamanho de partícula das gotas de óleo, principalmente daquelas contendo WPI, indicando que a proteólise levou à coalescência ou floculação das gotas, causando aumento do diâmetro médio. Malaki Nik et al. (2010) também observaram um aumento do diâmetro médio consequente da simulação da digestão gástrica em emulsões contendo 10% (m/m) de óleo de soja, estabilizadas por 0,5 ou 1,5% (m/m) de WPI e homogeneizadas por microfluidização a 3,5 bar.

Tabela 4.10. Diâmetros médios de gota (μm) de emulsões contendo lecitina e proteína do soro e homogeneizadas a 450 bar antes e após a incubação em condições gástricas.

pH	0 Lec : 1 WPI		1 Lec : 1 WPI		1 Lec : 0 WPI	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
3	1,56 ^{Ab}	7,70 ^{Ba}	-	-	1,53 ^{Ab}	2,95 ^{Bc}
5,5	1,85 ^{Ac}	12,12 ^{Bb}	1,24 ^{Aa}	6,24 ^{Ba}	1,39 ^{Aa}	2,41 ^{Bb}
7	1,47 ^{Aa}	8,67 ^{Ba}	1,31 ^{Aa}	5,95 ^{Ba}	1,39 ^{Aa}	1,81 ^{Ba}

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre os tempos de estocagem para um mesmo sistema. Letras minúsculas: diferenças dentro da mesma coluna.

As curvas de distribuição de tamanho de partícula por fração volumétrica das emulsões após a etapa de digestão gástrica encontram-se na Figura 4.25. As curvas, que anteriormente à simulação da digestão gástrica eram monomodais, tornaram-se bimodais independente da composição e pH do sistema. Além disso, todos os sistemas apresentaram um aumento da população de gotas de tamanhos maiores, independente do pH inicial das emulsões, o que acabou refletindo no aumento dos valores de d_{32} (Tabela 4.10). Emulsões contendo somente WPI apresentaram um pico referente às gotas de menor tamanho muito menor que o segundo pico, sugerindo elevada susceptibilidade do emulsificante à ação da pepsina. Neste caso, tamanhos de gota maiores foram observados em emulsões produzidas em pH próximo ao pI da proteína. Já os sistemas estabilizados somente por lecitina apresentaram menor fração volumétrica de gotas maiores que os demais sistemas, sendo esta menor quanto maior o pH, o que resultou em menor diâmetro médio das gotas. As emulsões estabilizadas pela mistura de emulsificantes não apresentaram grandes variações nas curvas para os diferentes valores de pH.

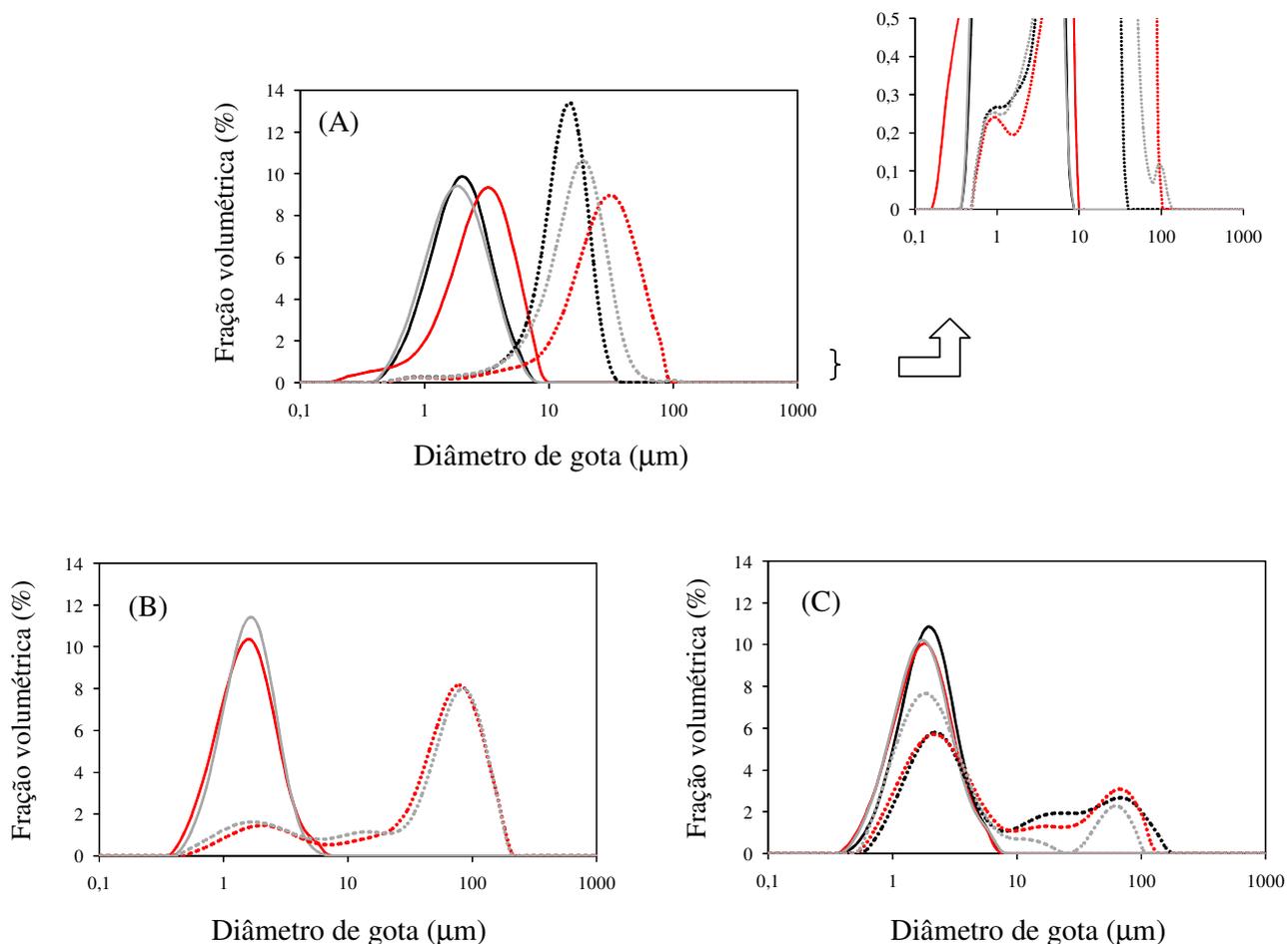


Figura 4.25. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões estabilizadas por lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0. Antes da digestão: (—) pH 3, (—) pH 5,5 e (—) pH 7. Após digestão gástrica: (-----) pH 3, (-----) pH 5,5 e (-----) pH 7.

4.8.2. Digestão entérica

A etapa de digestão entérica foi realizada apenas para emulsões em pH 7 e homogeneizadas a 450 bar, já que os resultados obtidos após a simulação de digestão gástrica para determinada composição apresentaram a mesma tendência para os diferentes valores de pH utilizado no preparo das emulsões.

4.8.2.1. Estabilidade

O aspecto visual (Figura 4.26) foi similar ao obtido para a digestão gástrica, sendo que somente na emulsão estabilizada por lecitina e WPI na razão 0:1 não houve o aparecimento de

uma fase de óleo livre. Os sistemas apresentaram coloração característica do extrato de bile porcina utilizado na simulação desta etapa de digestão.



Figura 4.26. Aspecto visual típico para emulsões contendo lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0 após simulação de digestão entérica

4.8.2.2. Diâmetro e distribuição do tamanho de gota

As microscopias das emulsões antes da simulação da digestão *in vitro* e após as etapas de digestão gástrica e entérica estão apresentadas na Figura 4.27. Nos sistemas contendo WPI, após a digestão gástrica, na presença ou não de lecitina, foi observada formação de grandes aglomerados consequentes de processos de coalescência ou floculação, devido à hidrólise da camada interfacial por pepsina (Malaki Nik et al., 2010). Em emulsões estabilizadas somente por lecitina, gotas de emulsão não foram visualizadas após a etapa de digestão gástrica. Comas et al. (2006) observaram efeito negativo na distribuição do tamanho de gota e estabilidade da emulsão contendo lecitina e preparadas em pH 2 que resultou em intensa taxa de cremação. Assim, a desestabilização dos sistemas contendo lecitina com liberação de óleo das emulsões pode ter ocorrido devido ao pH ácido das condições gástricas que é muito próximo ao pKa (próximo de 1,5) deste fosfolípídeo.

Após a etapa de digestão entérica, as emulsões contendo somente WPI não apresentaram indícios de floculação (Figura 4.28), sendo que o sistema apresentou-se muito semelhante ao inicial (anterior à simulação de digestão), porém com menos gotas. Isto pode ser atribuído à maior diluição das gotas lipídicas já que um pequeno volume de emulsão

encontra-se disperso no fluido que simula o trato gastrointestinal. Já os sistemas contendo lecitina apresentaram menos gotas na maior concentração de lecitina, sendo estas de difícil visualização.

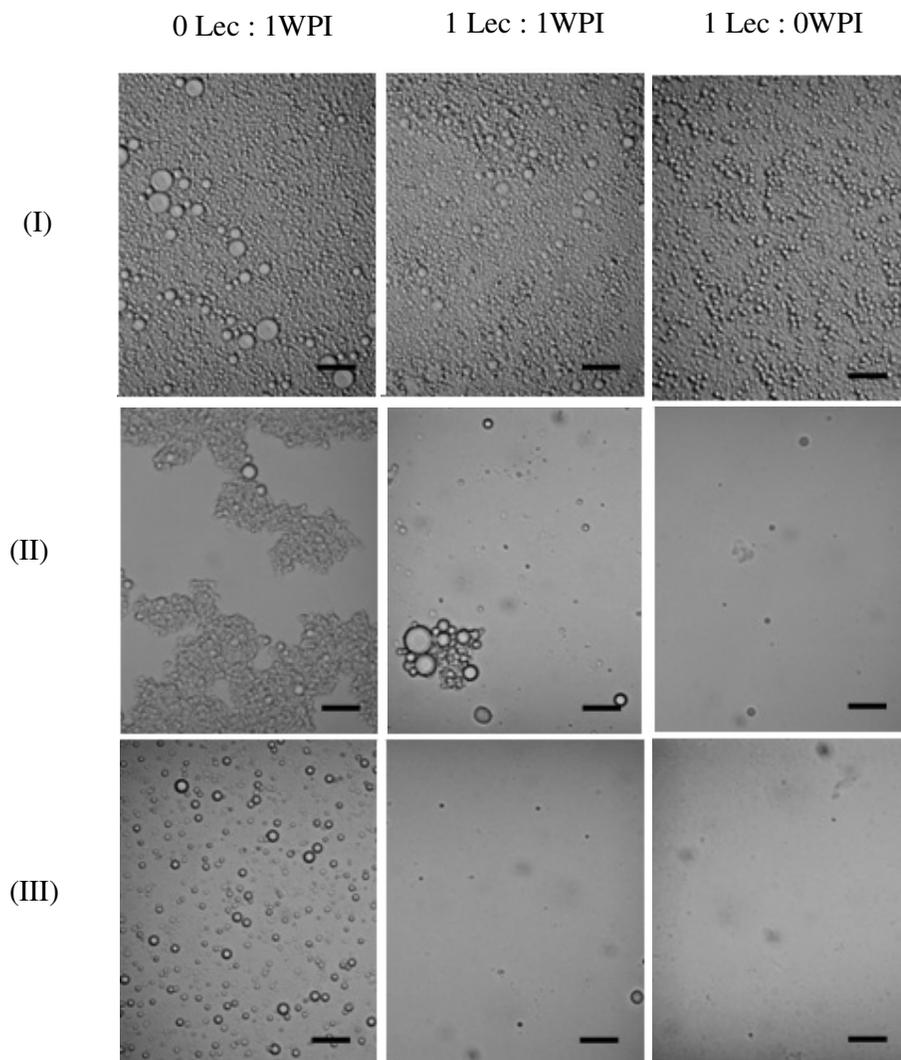


Figura 4.27. Micrografias de emulsões contendo lecitina e WPI em diferentes razões (I) anteriormente e após etapas de digestão (II) gástrica e (III) entérica. Barra da escala = 10 μm .

Os valores de diâmetro médio de gota (d_{32}) das emulsões após as etapas de digestão gástrica e entérica encontram-se na Figura 4.28. Observou-se um comportamento diferente para as diferentes razões de lecitina e WPI avaliadas. Para emulsões contendo somente WPI, foi observado um aumento do d_{32} ao fim da etapa gástrica, seguido de uma redução

significativa ao fim da etapa de digestão entérica (de 12,67 para 1,77 μm), sendo o valor final obtido muito próximo do diâmetro de gota na emulsão antes do início da simulação de digestão. Já para emulsões contendo somente lecitina, o valor do d_{32} ao fim da etapa entérica (9,51 μm) foi muito maior que aquele obtido após a etapa gástrica (1,81 μm). Os sistemas contendo ambos os emulsificantes na razão 1:1 apresentaram valores de d_{32} após cada etapa relativamente próximos e intermediários aos diâmetros obtidos para as emulsões estabilizadas somente com lecitina ou WPI.

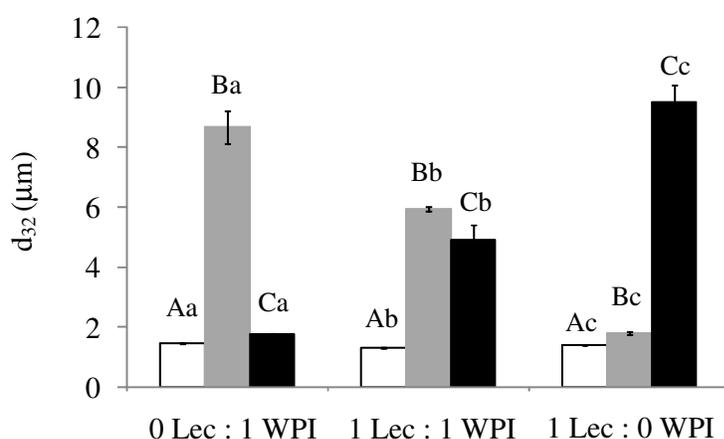


Figura 4.28. Diâmetro médio de gota (μm) de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro. (□) Emulsão, (■) digestão gástrica e (■) digestão entérica. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes composições e mesma etapa do processo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes etapas do processo e uma mesma composição.

As curvas de distribuição de tamanho de partícula por fração volumétrica das emulsões antes e após cada etapa de digestão encontram-se na Figura 4.29. As emulsões iniciais foram monomodais. As curvas das emulsões estabilizadas somente por WPI apresentaram um deslocamento para a direita (maiores diâmetros de gota) após a digestão gástrica, porém ao fim da digestão entérica a distribuição tornou-se monomodal e muito próxima da emulsão inicial (antes da simulação da digestão). Os sistemas estabilizados somente por lecitina apresentaram um aumento gradativo da fração de partículas com

tamanhos maiores ao longo de todas as etapas, apresentando curva multimodal ao fim do processo digestivo. Já as curvas das emulsões contendo lecitina e WPI na razão 1:1 foram bimodais com um aumento da população de partículas de maior tamanho e também das partículas de menor tamanho da etapa de digestão gástrica para a entérica. Os valores de d_{32} apresentados na Figura 4.28 refletem os resultados observados nas curvas de distribuição.

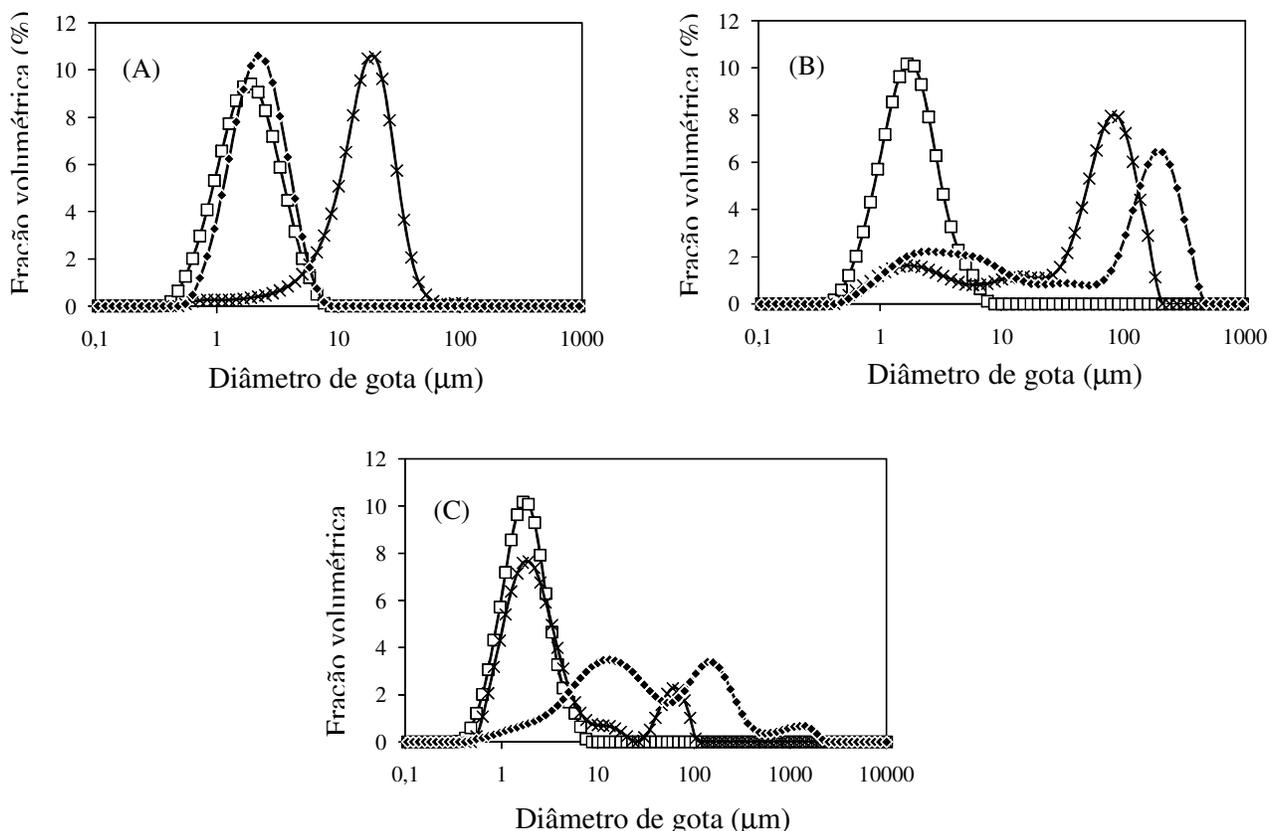


Figura 4.29. Distribuição em fração volumétrica do diâmetro de gota em emulsões em pH 7 estabilizadas por lecitina e WPI nas razões (A) 0:1, (B) 1:1 e (C) 1:0. (□) Emulsão, (×) após digestão gástrica e (◆) após digestão entérica.

4.8.2.3. Carga superficial

Os valores de potencial ζ para os sistemas antes do início da simulação e após a etapa de digestão entérica encontram-se na Figura 4.30. Todas as emulsões apresentaram-se negativamente carregadas após o preparo e assim permaneceram após a simulação da etapa de digestão entérica (pH 7), porém os valores absolutos foram estatisticamente diferentes. As

emulsões contendo lecitina e WPI na razão 0:1 tornaram-se mais negativamente carregadas, enquanto nas demais razões os valores de potencial ζ tornaram-se menos negativos.

Hur et al. (2009) avaliaram a influência do tipo de emulsificante inicial nas mudanças estruturais ocorridas após passagem da emulsão por um modelo de digestão *in vitro*. As emulsões contendo 3% (m/m) de óleo de soja e 1% (m/m) de *Tween 20*, lisolectina, caseinato ou WPI foram homogeneizadas através da passagem por membranas. Os resultados mostraram que a densidade de carga após a simulação da digestão em intestino delgado (pH 6,2) apresentou valores em torno de -20 mV e não variou de acordo com o tipo de emulsificante utilizado, exceto para emulsões estabilizadas com WPI. Os autores atribuíram os valores semelhantes à adsorção dos sais de bile, fosfolipídeos dos sucos pancreático e bile e da lipase na superfície das gotas em substituição ao emulsificante inicialmente utilizado. Ainda segundo Hur et al. (2009), uma hipótese para o fato de emulsões estabilizadas por WPI apresentarem carga superficial diferente seria maior dificuldade de remoção do recobrimento de gotas envoltas por esta proteína já que ela contém frações globulares (como β -lg) que podem formar uma camada interfacial fortemente ligada através de ligações covalentes. Dessa forma, o fato de que gotas recobertas por WPI foram negativamente carregadas sugere que parte das proteínas do soro permaneceram na superfície das gotas.

Mun et al. (2006) avaliou a interação de extrato de bile com gotas recobertas por lecitina e concluíram que ocorre a substituição da lecitina pela bile no recobrimento das gotas de óleo, uma vez que os valores de densidade de carga da emulsão com lecitina após a adição do extrato torna-se semelhante à densidade de uma emulsão controle contendo somente o extrato de bile (-54 mV). Porém, no trabalho citado, a etapa de digestão entérica não foi precedida pela simulação da etapa gástrica, o que pode ter resultado em valores de potencial diferentes daqueles apresentados na Figura 4.30, devido à possível desestabilização do

sistema consequente da incubação em pH extremamente ácido como mencionado anteriormente.

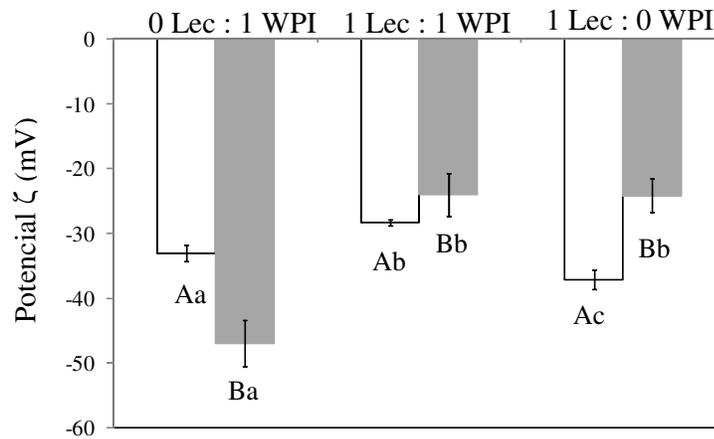


Figura 4.30. Potencial ζ de emulsões em pH 7 contendo lecitina e proteína do soro. (□) Emulsão e (■) após a digestão entérica. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre diferentes composições e mesma etapa do processo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) antes e após o processo digestivo para uma mesma composição.

Capítulo 5 . CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados avaliados para os sistemas aquosos contendo proteínas do soro e/ou lecitina, pode-se concluir que a formação de complexos eletrostáticos foi favorecida em pH 3 (abaixo do pI da proteína), pois nesta condição ambos os polieletrólitos encontram-se opostamente carregados. Além disso, a complexação mostrou-se dependente da razão de proteínas e lecitina presentes no sistema, sendo máxima na razão de 1:1.

O efeito da pressão levou à desnaturação parcial da proteína e, conseqüentemente, à formação de agregados protéicos de alta massa molecular apenas quando ligadas à interface, ou seja, na emulsão, uma vez que o mesmo não aconteceu quando o biopolímero estava em solução aquosa. Porém, este processo também foi dependente do pH e da composição do sistema, já que os agregados não foram observados em pH abaixo do pI e nem na presença de lecitina.

Em relação às emulsões O/A, foi possível observar que as proteínas apresentaram maior variação do tamanho de gota com o aumento da pressão quando comparadas à lecitina, enquanto as emulsões estabilizadas por lecitina, independente do pH, apresentaram uma tendência ao processo de recoalescência pois o aumento da pressão promoveu, inicialmente, uma diminuição que foi seguida de um aumento do tamanho médio de gota.

De modo geral, a influência do pH na estabilidade foi diferente dependendo da composição do sistema. Independente do pH, as emulsões estabilizadas somente por lecitina apresentaram-se estáveis à separação de fases e com comportamento Newtoniano. Já as emulsões estabilizadas somente por proteínas do soro mostraram comportamento similar para os valores de pH distantes do pI (acima e abaixo), nos quais os sistemas foram estáveis e apresentaram baixa viscosidade, provavelmente devido à elevada densidade de carga superficial. No entanto, emulsões estabilizadas por proteínas do soro em pH próximo ao pI separaram de fases e coalesceram ao longo do período de estocagem, apresentando aumento do tamanho médio de gota e da viscosidade, o que levou ao comportamento de fluido

pseudoplástico. As emulsões estabilizadas pela mistura de proteínas e lecitina apresentaram estabilidade à cremeação, tamanhos de gota e viscosidade similares em valores de pH próximo e acima do pI. Em pH abaixo do pI, no qual ambos os emulsificantes encontram-se opostamente carregados, os sistemas foram altamente instáveis, não havendo formação de gotas de emulsão.

O comportamento das emulsões após a simulação da digestão *in vitro* mostrou-se fortemente dependente da composição do sistema. As emulsões estabilizadas por proteínas mostraram-se mais resistentes que a lecitina uma vez que não houve liberação de óleo da emulsão e as misturas apresentaram resultados intermediários aos obtidos para ambos os emulsificantes individualmente.

O uso de proteínas do soro como agente emulsificante conferiu estabilidade à emulsão em valores de pH distantes do pI até mesmo nas pressões mais baixas, sendo que em maiores pressões, as proteínas surgem como uma alternativa ao uso da lecitina, uma vez que se mostraram mais eficientes apresentando menores tamanhos de gota. Já o uso da mistura de WPI e lecitina permitiu aproveitar as características de boa digestibilidade das proteínas e de estabilidade da lecitina resultando em um sistema com boas características que poderia ser uma alternativa ao uso das proteínas, principalmente em pH muito próximo ao pI, condição na qual a emulsão encontra-se sujeita a processos de desestabilização. De maneira geral, este trabalho possibilitou um maior entendimento das interações entre as proteínas do soro e a lecitina e mostrou que a adição de um segundo emulsificante pode levar um sistema instável à estabilidade à cremeação por um determinado período de estocagem, mantendo ainda assim uma considerável resistência frente às condições do trato gastrointestinal.

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**, 39, 225-234.

ANAL, A. K.; TOBIASSEN, A.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. (2008). Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan–caseinate interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 64, 104–110.

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. (1996). Dairy Products. In: **Official Method of Analysis of AOAC International**, 16th edition, v.2.

BENGOECHEA, C.; JONES, O. G.; GUERRERO, A.; McCLEMENTS, D. J. (2011). Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, 25, 1227-1232.

CAVALLIERI, A. L. F.; COSTA-NETTO, A. P.; MENOSSI, M.; CUNHA, R. L. (2007). Whey protein interactions in acidic cold-set gels at different pH values. **Le Lait Dairy Science and Technology**, 87 (6), 535-554.

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.

CHUAH, A.M.; KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. (2009). Formation of biocompatible nanoparticles via the self-assembly of chitosan and modified lecithin. **Journal of Food Science**, 74 (1), n1-n8.

COMAS, D. I.; WAGNER, J. R.; TOMÁS, M. C. (2004). Influence of the chemical environment on soybean proteins–lecithin interaction and stability of oil in water (O/W) emulsions. In: **Proceedings of Food Colloids, Interactions, Microstructure and Processing**, B-14, Harrogate, UK.

COMAS, D. I.; WAGNER J. R.; TOMÁS, M. C. (2006). Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein–lecithin interaction. **Food Hydrocolloids**, 20, 990–996.

COPELAND R.A. (1990). Electrophoretic and chromatographic methods for assessing protein purity, in: Copeland R.A. (Ed.), **Methods for protein analysis: A practical guide to laboratory protocols**, Chapman & Hall, New York, USA, 59-98.

CORTÉS-MUÑOZ, M., CHEVALIER-LUCIA, D., DUMAY, E. (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage. **Food Hydrocolloids**, 23, 640–654.

DE WIT, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, 81, 597-608.

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

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

FLOURY, J., DESRUMAUX, A., LARDIÈRES, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 1, 127-134.

GARRET, D.A.; FAILLA, M.L.; SARAMA, R.J. (1999). Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 4301-4309.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D.J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in colloid and interface science**, 128, 227-248.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. (2001). Characterization of heat-induced aggregates of beta- lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. **Journal of Dairy Research**, 68 (3), 483-497.

HOEBLER, C.; LECANNU, G.; BELLEVILLE, C.; DEVAUX, M.F.; POPINEAU, Y.; BARRY, J.L. (2002). Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 53, 389-402.

HONG, Y. H.; CREAMER, L. K. (2002). Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. **International Dairy Journal**, 12 (4), 345-359.

HONG, Y. H.; McCLEMENTS, D. J. (2007). Formation of hydrogel particles by thermal treatment of β -lactoglobulin-chitosan complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 5653-5660.

HU, M.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilised by casein, whey protein isolate and soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1696-1700.

HUPPERTZ, T., FOX, P. F., KELLY, A. L. (2004). Properties of casein in high pressure treated bovine milk. **Food Chemistry**, 87, 103-110.

HUR, S. J.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, 114, 253-262.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR E.; HE, Y.; BHANDARI, B. (2008) Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification - A review. **Food Hydrocolloids**, 22, 1191-1202.

KELLEY, D.; McCLEMENTS, D.J. (2003). Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, 17, 73-85.

KIOKIAS, S.; BOT, A. (2005). Effect of denaturation on temperature cycling stability of heated acidified protein-stabilised O/W emulsion gels. **Food Hydrocolloids**, 19, 493-501.

KIOKIAS, S.; DIMAKOU, C.; OREOPOULOU, V. (2007). Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. **Food Chemistry**, 105, 94-100.

LEE, S. H.; LEFÈVRE, T.; SUBIRADE, M.; PAQUIN, P. (2008). Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. **Food chemistry**, 113, 191-195.

LESER, M.E.; SAGALOWICZ, L.; MICHEL, M.; WATZKE, H.J. (2006). Self-assembly of polar food lipids. **Advances in colloid and interface science**, 123, 125-136.

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.

LIVNEY, Y.D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 15, 73-83.

MALAKI NIK, A.; WRIGHT, A. J.; CORREDIG, M. (2010). Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. **Journal of Colloid and Interface Science**, 344, 372-381.

MASON, T.G., WILKING, J.N., MELESON, K., CHANG, C.B., GRAVES, S.M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, 18 (41), R635-R666.

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 nutraceutical and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 49, 577-606.

McCRAE, C. H. (1999). Heat stability of milk emulsions: phospholipid-protein interactions. **International Dairy Journal**, 9, 227-231.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical reviews in food science and nutritional**, 33(6), 431-476.

MOZHAEV, V. V., HEREMANS, L., FRANK, J., MASSON, P., BALNY, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 24, 81-91.

MUN, S.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. (2006). Influence of interfacial composition on *in vitro* digestibility of emulsified lipids: potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. **FOBI**, 1, 21–29.

OGAWA, S.; DECKE, E.A.; MCCLEMENTS, D.J. (2003). Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2806-2812.

OGAWA, S.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J. (2004). Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 3595-3600.

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.

PUGNALONI, L. A.; DICKINSON, E.; ETELAIE, R.; MACKIE, A. R.; WILDE, P. J. (2004). Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging. **Advances in Colloid and Interface Science**, 107, 27–49.

ROEFS, S. P. F. M.; DE KRUIF, C. G. (1994). A model for the denaturation and aggregation of bovine β -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, 226, 883-889.

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

SAWYER, L.; BARLOW, P. N.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; DENTON, H.; EDWARDS, P. J. B.; HOLT, C.; JAMESON, G. B.; KONTOPIDIS, G.; NORRIS, G. E.; UHRÍNOVÁ, S.; WU, S. (2002). Milk protein structure – what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, 12(4), 299-310.

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

SGARBIERI, V. C. (2005). Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Thechnology**, 8 (1), 43-56.

SHUKAT, R.; RELKIN, P. (2011). Lipid nanoparticles as vitamin matrix carriers in liquid food systems: On the role of high-pressure homogenisation, droplet size and adsorbed materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 86, 119–124.

SURN, J.; JEONG, Y.G.; VLADISAVLJEVIC, G.T. (2008). On the preparation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions by multi-stage premix membrane emulsification. **Journal of Food Engineering**, 89, 164-170.

TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; IVANOV, I. B.; CAMPBELL, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. **Advances in Colloid and Interface Science**, 123–126, 259–293.

VARDHANABHUTI, B.; FOEGEDING, E. A. (1999). Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 3649-3655.

WALSTRA, P. (2003). **Physical Chemistry of Foods**. New York, NY: Marcel Dekker.

WILDE, P.J.; CHU, B.S. (2011). Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. **Advances in Colloid and Interface Science**, 165, 14–22.