



JANAÍNA MIRANDA BARBOSA

**CAPACIDADE EMULSIFICANTE DE CONJUGADOS DE
CASEINATO DE SÓDIO – GOMA JATAÍ PRODUZIDOS
PELA REAÇÃO DE MAILLARD**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JANAÍNA MIRANDA BARBOSA

**CAPACIDADE EMULSIFICANTE DE CONJUGADOS DE
CASEINATO DE SÓDIO – GOMA JATAÍ PRODUZIDOS PELA
REAÇÃO DE MAILLARD**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha
Co-orientadora: Dra. Fernanda Yumi Ushikubo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA JANAÍNA
MIRANDA BARBOSA E ORIENTADA PELA
PROFA. ROSIANE LOPES DA CUNHA.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2013

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

B234c Barbosa, Janaína Miranda, 1987-
Capacidade emulsificante de conjugados de caseinato de sódio-goma jataí produzidos pela reação de Maillard / Janaína Miranda Barbosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha.
Coorientador: Fernanda Yumi Ushikubo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Emulsões. 2. Caseinato de sódio. 3. Goma jataí. 4. Reação de Maillard. I. Cunha, Rosiane Lopes da. II. Ushikubo, Fernanda Yumi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Emulsifying capability of sodium caseinate-locust bean gum conjugates produced by Maillard reaction

Palavras-chave em inglês:

Emulsions

Sodium caseinate

Locust bean gum

Maillard reaction

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Rosiane Lopes da Cunha [Orientador]

Renata Valeriano Tonon

Paulo José do Amaral Sobral

Data de defesa: 10-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Rosiane Lopes da Cunha - Orientadora

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

Dra. Renata Valeriano Tonon - Membro Titular

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/RJ

Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral – Membro Titular

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP/SP

Profa. Dra. Míriam Dupas Hubinger – Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana – Membro Suplente

Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP/SP

*"Para realizar grandes conquistas,
devemos não apenas agir,
mas também sonhar;
não apenas planejar,
mas também acreditar."*

Anatole France

Este trabalho é dedicado:

A Meus pais e minhas irmãs, que sempre me apoiaram e estiveram presentes nesta caminhada, vocês são a razão da minha vida;

Ao Gabriel, que sempre me deu muita força e mesmo longe me faz senti-lo tão perto.

AGRADECIMENTOS

À Deus – pelo dom da vida que tenho hoje cercada de pessoas que amo muito, obrigada pelo privilégio de poder estudar e desenvolver meu trabalho;

Meu pai, minha mãe, Jaqueline, Carol e Karine – minha família que está por trás de tudo que sou hoje, obrigada pela paciência, carinho e incentivo. Especialmente ao meu pai, a quem eu me espelhei como exemplo de dedicação e honestidade.

Gabriel - pelo amor, companheirismo, cumplicidade nos sonhos, e pelo sorriso que me faz tão feliz;

Minhas grandes amigas - do coluni, e UFV que sempre estiveram presentes;

Amigas da república e de Viçosa – Aline, Bruna, Marcela, Bárbara, Luana, Mari Diane, Tina pelo convívio, amizade; e por terem sido minha família em Campinas;

Colegas de pós-graduação – em especial Moyses, Giovani, Mariano e Renata, pela ajuda, pelo conhecimento compartilhado e por tornarem toda a caminhada mais alegre;

Aos colegas do LEP – Aninha, Fezinha, Carol, Fabi, Luiz, Aline, Rejane, Kátia, Marisa, Joicinha, Rafa, Davi, Guilherme, Kali, Zil e Pati por terem me ajudado no meu trabalho, obrigada pelas ideias e ensinamentos;

À profa. Dra. Rosiane – pela confiança em mim e no meu trabalho, por me mostrar o caminho da ciência através do seu exemplo de profissionalismo, obrigada pelas reuniões e atenção dedicada;

À Dra. Fernanda – por todas as sugestões e correções como co-orientadora, pela disponibilidade de tempo e dedicação ao meu trabalho, principalmente nesta etapa final;

Ao Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral (FZEA/USP) e ao técnico Rodrigo Lourenço pelas análises de FTIR;

Aos membros da banca, pelas correções que aprimoraram este trabalho;

Ao CNPq – pelo apoio financeiro deste trabalho;

A todos da FEA/ UNICAMP – por me acolherem, obrigada pelo convívio e suporte fornecido diariamente.

RESUMO GERAL

As emulsões estão presentes naturalmente em alguns alimentos ou são aplicadas devido a suas propriedades tecnológicas. Porém, as emulsões são termodinamicamente instáveis e tendem a separar de fases com o tempo. A estabilidade das emulsões pode ser melhorada utilizando agentes emulsificantes e estabilizantes. Neste trabalho foi estudada a ação simultânea de dois biopolímeros naturais para melhorar a estabilidade cinética de emulsões óleo - em - água (O/A). Conjugados formados por caseinato de sódio e goma jataí foram produzidos através da reação de Maillard em diferentes razões de proteína/polissacarídeo e tempos de reação, a fim de se obter melhor ação estabilizante que os biopolímeros individuais em emulsões preparadas em duas condições de pH. A formação dos conjugados foi confirmada pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida que evidenciou a presença de compostos de alta massa molecular. De modo geral, em pH 7 as emulsões foram mais estáveis que em pH 3,5, pois em pH neutro a proteína estava mais distante do seu ponto isoelétrico, sendo assim mais solúvel e carregada negativamente, resultando na repulsão eletrostática entre as gotas. As análises de microscopia confocal feitas para emulsões em pH 7 mostraram que com os conjugados formados após 24 h de reação, a distribuição da proteína na interface foi mais homogênea. No pH 3,5, não houve efeito de carga e a estabilidade das emulsões foi atribuída à presença dos polissacarídeos que promoveram maior viscosidade da fase contínua e maior espessura da camada interfacial, provocando repulsão estérica entre as gotas. Neste pH, os conjugados formados após 24 h de reação melhoraram a estabilidade das emulsões. Nas análises reológicas observaram-se maiores valores de viscosidade aparente nas emulsões com o maior conteúdo de polissacarídeo (razão 0,3), e este valor foi ainda maior em pH 7. Dessa forma, os módulos

complexos (G^*) das emulsões também atingiram valores mais altos em pH neutro, confirmando a melhor estruturação das emulsões. Quanto à reologia interfacial, o módulo complexo de viscoelasticidade (E^*) da interface óleo – solução de biopolímero na razão 0,3 apresentou valor elevado e pouca variação ao longo do tempo, caracterizando uma interface mais elástica e estável, com estrutura mais rígida devido ao polissacarídeo. Com estes resultados, pode-se afirmar que os conjugados formados em tempo iniciais de reação e compostos por maior quantidade de goma jataí melhoraram a estabilidade das emulsões devido ao efeito estérico do polissacarídeo que foi ainda mais pronunciado em pH ácido.

Palavras-chave: emulsão, caseinato de sódio, goma jataí, conjugados, reação de Maillard.

ABSTRACT

The emulsions are naturally present in some foods or they are applied in food products due to their technological properties. However, emulsions are thermodynamically unstable and their phases tend to separate with time. The stability of emulsions can be improved by using emulsifiers and stabilizers. In this work it was studied the combined action of two natural biopolymers to improve the kinetic stability of oil-in-water emulsions (O/W). Conjugates composed by sodium caseinate and locust bean gum were produced by Maillard reaction at different protein/polysaccharide ratio and reaction time to obtain a conjugate with better stabilizing action than individual biopolymers in emulsions prepared at two pH conditions. The conjugates formation was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis analysis that revealed the presence of compounds with high molecular weight after the reaction. In general, the emulsions at pH 7 were more stable than at pH 3.5. At neutral pH, as the protein was further from its isoelectric point, it was more soluble and negatively charged, resulting in the electrostatic repulsion between the droplets. The confocal microscopy analysis showed that emulsions at pH 7 composed by conjugates formed after 24 h of reaction, presented more homogeneous protein distribution at the interface. At pH 3.5, there was no electrical charge effect on the emulsion and the stability was attributed to the presence of polysaccharides, which promoted higher viscosity of the continuous phase and increased the interfacial layer thickness, resulting in steric repulsion between the droplets. Regarding the rheological behavior, it was observed higher values of apparent viscosity in emulsions with highest polysaccharide content (ratio 0.3), and these values were higher at pH 7 than at pH 3.5. Moreover, the complex moduli (G^*) values of the emulsions were also higher at neutral pH, confirming better structured emulsions. In

relation to the interfacial rheology, the viscoelastic complex moduli (E^*) on the oil – biopolymer solution interface at 0.3 ratio presented higher value with low variation with time, characterizing more elastic and stable interface composed by rigid structure due to the polysaccharide. Based on these results, it was observed that the conjugates formed at early reaction time and composed by large amount of locust bean gum improved the emulsions stability due to the steric effect of the polysaccharide which was more pronounced at acid pH.

Keywords: emulsion, sodium caseinate, locust bean gum, conjugates, Maillard reaction.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
SUMÁRIO.....	xvii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxi
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 Introdução.....	3
1.2 Objetivo geral.....	5
1.2.1 Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Emulsões.....	9
2.2 Reação de Maillard e formação dos conjugados.....	12
2.3 Caseínas e caseinato de sódio.....	15
2.4 Galactomananas.....	17
2.5 Reologia e tensiometria.....	19
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material.....	25
3.2 Preparo das soluções.....	25
3.2.1 Preparo da solução de caseinato de sódio.....	25
3.2.2 Preparo das soluções de gomas jataí.....	25
3.2.3 Preparo das misturas de biopolímeros.....	26
3.3 Preparo dos conjugados.....	26
3.3.1 Preparo dos conjugados e misturas controle.....	27
3.4 Preparo das emulsões O/A.....	28
3.4.1 Preparo das emulsões compostas por conjugados ou misturas controle.....	29
3.5 Análises.....	30
3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	30
3.5.2 Determinação da cor.....	30
3.5.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	31
3.5.4 Estabilidade das emulsões à cremeação.....	31
3.5.5 Distribuição de tamanho das gotas.....	31
3.5.6 Microscopia Óptica.....	32
3.5.7 Microscopia Confocal.....	32

3.5.8	Potencial Zeta.....	33
3.5.9	Medidas reológicas.....	33
3.5.10	Tensiometria e Reologia Interfacial	34
3.5.11	Análises Estatísticas	34
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....		35
4.1	Caracterização dos conjugados	37
4.1.1	Determinação da cor.....	37
4.1.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	39
4.1.3	Potencial zeta	40
4.1.4	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	43
4.2	Emulsões	49
4.2.1	Estabilidade à cremeação	49
4.2.2	Distribuição do tamanho de gotas e microscopia.....	56
4.2.3	Microscopia Confocal	68
4.2.4	Potencial zeta das emulsões	70
4.2.5	Reologia	72
4.2.6	Tensiometria e Reologia interfacial	83
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES GERAIS		89
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		93
APÊNDICE		103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1: Valores de pH onde ocorre a transição de valores positivos para negativos do potencial zeta para as misturas de biopolímeros.	42
Tabela 4.2: Índices de separação de fase (% ISF) para emulsões em pH 3,5 e 7 nas razões 0,3; 0,6 e 1,2 nos tempos de reação 0, 24, 48, 72 e 96 horas após 7 dias.....	50
Tabela 4.3: Diâmetro médio de gota (D_{43}) das emulsões estudadas.	58
Tabela 4.4: Efeito da razão proteína/polissacarídeo e pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas com as misturas controle ou os conjugados obtidos após 24 e 48 horas de reação de Maillard.	76
Tabela 4.5: Efeito da razão proteína/polissacarídeo e pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas pelos conjugados obtidos após 72 e 96 horas de reação de Maillard.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema dos mecanismos de instabilidade em emulsões O/A. Fonte: (MCCLEMENTS, 2005).	11
Figura 2.2: Estágio inicial da reação de Maillard usando glicose como fonte de carbonila. Adaptado de Dills (1993).	13
Figura 2.3: Fórmula estrutural das galactomananas. Fonte: (SEMENOVA <i>et al.</i> , 2010)...	18
Figura 3.1: Diagrama de fluxo para obtenção de misturas ou conjugados de caseinato de sódio – goma jataí.	27
Figura 3.2: Diagrama de fluxo para obtenção das emulsões compostas por misturas ou conjugados de caseinato de sódio – goma jataí.	29
Figura 4.1: Valores de b^* para os conjugados ao longo dos tempos de reação de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, com as diferentes razões entre proteína e polissacarídeo.	37
Figura 4.2: Valores de L^* (A) e de ΔE^*_{ab} (B) nas diferentes razões de proteína/polissacarídeo: 0,3; 0,6 e 1,2 para os conjugados formados nos tempos de reação de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h.	38
Figura 4.3: Géis de eletroforese não redutor: caseinato de sódio, controle (0h), conjugados nos tempos de reação de 24, 48, 72 e 96 horas nas razões proteína/polissacarídeo (A) 0,3; (B) 0,6; (C) 1,2. MM: marcador comercial de massa molecular.	40
Figura 4.4: Potencial zeta em diferentes valores de pH. A) Caseinato de sódio puro liofilizado (■) e Goma jataí (+), e misturas de biopolímeros nas razões de proteína/polissacarídeo B) 0,3; C) 0,6; D) 1,2; nos tempos de reação: (*) 0 h; (○) 24 h; (▲) 48 h; (□) 72 h e (◆) 96 h.	41
Figura 6.1: Análise de FTIR para caseína em pó pura (—); caseinato de sódio puro liofilizado (—); e goma Jataí (—).	45
Figura 6.2: Análise de FTIR para os conjugados nas razões de proteína/polissacarídeo: A) 0,3; B) 0,6 e C) 1,2. Tempos de reação de (—) 0 h; (—) 24 h; (—) 48 h; (—) 72 h e (—) 96 h.	47
Figura 6.3: Análise de FTIR para os biopolímeros: (—) 24 h – 0,3; (—) 24 h – 0,6; (—) 24 h – 1,2; (—) caseinato de sódio liofilizado e (—) goma jataí.	48
Figura 4.8: Emulsões produzidas em pH 7 e 3,5 razão de proteína/polissacarídeo = 0,3. Tempos de reação de Maillard: 0h (misturas controle), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (conjugados) após 7 dias de estocagem.	53
Figura 4.9: Emulsões produzidas em pH 7 e 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,6. Tempos de reação de Maillard: 0h (misturas controle), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (conjugados) após 7 dias de estocagem.	54
Figura 4.10: Emulsões produzidas em pH 7 e 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 1,2. Tempos de reação de Maillard: 0h (misturas controle), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (conjugados) após 7 dias de estocagem.	55

Figura 4.11: Distribuição do tamanho de gota para emulsões com 2% de mistura/conjugado em pH 7 nos tempos: (—) 0 h; (····) 24 h; (---) 48 h; (- - -) 72 h e (— · —) 96 h.	59
Figura 4.12: Distribuição do tamanho de gota para emulsões com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 nos tempos: (—) 0 h; (····) 24 h; (---) 48 h; (- - -) 72 h e (— · —) 96 h.	60
Figura 4.13: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 7 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,3 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h e (E) 96 h.	62
Figura 4.14: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 7 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,6 nos tempos de reação de (A) 0 h (com escala diferente); (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h e (E) 96 h.	63
Figura 4.15: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 7 e razão de proteína/polissacarídeo = 1,2 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h e (E) 96 h.	64
Figura 4.16: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,3 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h e (E) 96 h.	65
Figura 4.17: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,6 nos tempos de reação de (A) 24 h; (B) 48 h; (C) 72 h e (D) 96 h.	66
Figura 4.18: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 1,2 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h e (E) 96 h.	67
Figura 4.19: Microscopia confocal das emulsões compostas por (A) Caseinato de sódio puro; (B) misturas de caseinato de sódio e goma jataí em pH 7 e razão 0,3 e (C) misturas de caseinato de sódio e goma jataí em pH 7 e razão 1,2; (D) conjugados formados após 24 horas de reação em pH 7 e razão 0,3 e (E) conjugados formados após 24 horas de reação em pH 7 e razão 1,2.	69
Figura 4.20: Potencial zeta das emulsões nos diferentes tempos de reação de Maillard em (♦) pH 3,5 e (■) pH 7, (A) Razão proteína/polissacarídeo = 0,3; (B) 0,6 e (C) 1,2.	71
Figura 4.21: Curvas de escoamento das emulsões compostas por misturas controle (0h) em pH 3,5 para avaliação da dependência com o tempo de cisalhamento. Razões de proteína/polissacarídeo: (A) 0,3 e (B) 1,2.	73
Figura 4.22: Curvas de escoamento das emulsões compostas por conjugados formados após 24 horas de reação em pH 3,5 para avaliação da dependência com o tempo de cisalhamento. Razões de proteína/polissacarídeo: (A) 0,3 e (B) 1,2.	74
Figura 4.23: Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsões estabilizadas em pH 3,5 e razão 0,3. Módulo elástico G' (■) e módulo viscoso G'' (♦). Tempos de reação (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h e (E) 96h.	79

Figura 4.24: Módulo complexo (G^*) das emulsões estabilizadas por misturas controle (●) e conjugados formados após reação de 24 h (□), 48 (Δ), 72h (◇) e 96 h (—). Nas condições de (A) pH 3,5 e razão 0,3; (B) pH 7 e razão 0,3; (C) pH 3,5 e razão 0,6; (D) pH 7 e razão 0,6; (E) pH 3,5 e razão 1,2 e (F) pH 7 e razão 1,2..... 82

Figura 4.25: Tensão interfacial com o tempo, (A) Razão 0,3; (B) 0,6 e (C) 1,2, (○) Caseinato de sódio; (◇) mistura controle e (◆) conjugados formados após 24 horas de reação..... 85

Figura 4.26: Módulo complexo dilatacional em função do tempo. (A) Razão 0,3; (B) razão 0,6 e (C) razão 1,2, (○) Caseinato de sódio; (◇) mistura controle e (◆) conjugados formados após 24 horas de reação..... 88

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

As emulsões são de grande aplicação para a indústria de alimentos, pois vários produtos são constituídos inteiramente ou parcialmente por emulsões, como molhos, sopas, maionese, margarina, entre muitos outros. A qualidade de uma emulsão depende de uma série de fatores como concentração de água e óleo, dos emulsificantes, das condições de processo e estocagem. O contato entre as moléculas de óleo e água é termodinamicamente desfavorável, contudo é possível obter emulsões cineticamente estáveis durante certo período com o uso de emulsificantes (MCCLEMENTS, 2005).

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas capazes de se adsorverem na interface óleo/água e impedir a agregação das gotas de óleo. A capacidade emulsificante depende das características moleculares e físico-químicas desses agentes (MCCLEMENTS, 2005). Um emulsificante eficiente atua facilitando a formação de uma nova interface pela diminuição da energia interfacial entre óleo e água, conferindo estabilidade às gotas pela formação de uma camada protetora adsorvida na sua superfície (DICKINSON, 1992). O caseinato de sódio é um sal formado a partir da solubilização da caseína com hidróxido de sódio, muito utilizado para melhorar a estabilidade de emulsões. Em pH afastado do ponto isoelétrico, sua atuação se dá principalmente por interações eletrostáticas na interface mas também exerce estabilidade estérica na fase contínua (CHU *et al.*, 1995). Apesar das proteínas serem menos efetivas na diminuição da tensão interfacial que os surfactantes sintéticos, estas podem produzir emulsões cineticamente estáveis e atender à crescente demanda de produtos naturais e biocompatíveis (BOUYER *et al.*, 2011).

É importante entender as interações entre as principais moléculas que agem na interface, uma vez que é comum o uso de mais de um biopolímero, como proteínas e polissacarídeos, na estabilização de emulsões (SEMENOVA *et al.*, 2010). Os polissacarídeos de alta massa molecular podem ajudar na estabilidade de emulsões, pela modificação da viscosidade ou gelificação do meio aquoso (DICKINSON, 1992). A goma jataí é uma galactomanana neutra encontrada naturalmente nas sementes de leguminosas, cuja razão manose-galactose depende da fonte vegetal. Esses polissacarídeos apresentam atividade de superfície, facilidade em formar ligações com as moléculas de água (alta solubilidade) e originam soluções com viscosidade intrínseca elevada (CUI *et al.*, 2009).

As interações entre proteínas e polissacarídeos podem ocorrer devido a ligações eletrostáticas ou a ligações covalentes fortes e estáveis, como aquelas formadas através da reação de Maillard. Estudos utilizando como polissacarídeo a goma guar mostraram que esta reagiu com proteínas por meio da reação de Maillard e formaram glicoconjugados que aumentaram as capacidades emulsificante, antimicrobiana e antioxidante das emulsões (NAKAMURA e JING, 2005).

Alguns aspectos importantes para a eficiência do complexo formado são a distribuição dos grupos ionizáveis na superfície da proteína, sua estabilidade estrutural, flexibilidade, distribuição de cargas e densidade dos polissacarídeos (BOUYER *et al.*, 2011). Na formulação de emulsões óleo/água, basicamente são distinguidos dois tipos de ingredientes: o agente emulsificante e o estabilizante. Para que os biopolímeros sejam bem-sucedidos nas suas respectivas funções, algumas características são extremamente importantes; como a forte adsorção do biopolímero na interface devido ao seu caráter anfifílico e a sua quantidade para que possa recobrir e saturar toda a camada interfacial.

Complementarmente a essa organização, é muito importante a formação de uma camada espessa que forneça repulsão estérica às gotas de óleo, sendo esta formada por um biopolímero altamente hidrofílico pois irá atuar no meio aquoso. Além disso, a presença de grupos carregados, encontrados em proteínas, podem também atuar provocando repulsão eletrostática devido à presença de cargas semelhantes (DICKINSON, 2003). Todavia, em pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína ou em alta concentração de sais, a camada proteica pode entrar em colapso e causar agregação das gotas devido à condição das cargas superficiais. Uma alternativa para melhorar a capacidade emulsificante das proteínas nesses ambientes adversos é utilizar complexos de proteína-polissacarídeo, uma vez que podem apresentar efeitos benéficos para as emulsões como citado anteriormente (WONG *et al.*, 2011).

1.2 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a estabilidade e comportamento de emulsões óleo – em - água estabilizadas por conjugados formados por caseinato de sódio e galactomanana, produzidos pela reação de Maillard.

1.2.1 Objetivos específicos

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

- Estudar as interações proteína-polissacarídeo e as condições de formação do conjugado caseinato de sódio-goma jataí a partir da reação de Maillard;
- Verificar a influência da concentração do caseinato de sódio e goma jataí nas misturas e conjugados, bem como das diferentes razões proteína/polissacarídeo na estabilidade e propriedades reológicas das emulsões O/A;

- Compreender o efeito do pH e dos diferentes tempos de formação dos conjugados pela reação de Maillard em emulsões O/A;
- Estudar as propriedades interfaciais das emulsões estabilizadas pelas misturas e conjugados.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Emulsões

Na indústria de alimentos, a maior parte dos produtos é constituída integralmente ou parcialmente por emulsões, como maionese, margarina, sopas, leite, sorvete, entre outros. Alguns tipos de emulsões também funcionam como veículos, tendo a função de proteger ingredientes polares ou apolares como vitaminas, drogas e compostos nutracêuticos. Estes veículos podem ser utilizados para controlar a biodisponibilidade lipídica, liberar compostos bioativos no trato gastrointestinal (GIT), proporcionar atraso na digestão lipídica, induzir a saciedade, entre outros (MCCLEMENTS e LI, 2010).

Uma emulsão consiste em dois líquidos imiscíveis, frequentemente óleo e água, onde pequenas gotas de um líquido estão dispersas na fase contínua do outro. Os sistemas que apresentam gotículas de óleo dispersas em água são classificados como emulsões óleo em água (O/A), tendo como exemplos maionese, leite e sopas; já os que possuem gotas de água dispersas em óleo como margarina e manteiga, são classificados como emulsões água em óleo (A/O). Estas emulsões são produzidas de diferentes formas e possuem diferentes características físico-químicas e sensoriais, devido aos ingredientes envolvidos e tipo de processamento. A qualidade dessas emulsões se deve à seleção das concentrações de água, óleo, emulsificantes e outros ingredientes presentes como ácidos, bases, vitaminas, corantes e conservantes (MCCLEMENTS, 2005).

A estabilidade de uma emulsão está relacionada ao tempo em que esta permanece sem mostrar mudanças significativas na distribuição e tamanho das gotas, bem como no estado de agregação e arranjo espacial. Tais fenômenos podem ocorrer devido aos seguintes processos: cremeação, sedimentação, floculação e coalescência de gotas (Figura 2.1). O

tempo que conseguem se manter estáveis pode variar de horas até anos, e é determinante para a vida útil destas emulsões (DICKINSON, 1992). A cremeação ocorre nas gotas dispersas que possuem densidade menor que a fase contínua, e por isso tendem a ficar na parte superior da emulsão. Quando a densidade das gotas é maior que a do líquido no qual elas estão dispersas elas tendem a ir para o fundo, e acontece a sedimentação. A floculação ocorre quando duas ou mais gotas se agregam e mantêm sua integridade, formando flocos cuja estrutura e tamanho podem influenciar na fase creme. Já a coalescência é um processo no qual duas ou mais gotas se fundem formando uma gota maior (MCCLEMENTS, 2005).

As emulsões são termodinamicamente instáveis, porém é possível controlar a desestabilização cinética pelo uso de emulsificantes e assim produzir emulsões com maior vida de prateleira. Os emulsificantes são moléculas anfifílicas que possuem um domínio hidrofóbico e outro hidrofílico cuja função é reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a água, adsorvendo-se rapidamente na interface óleo-água durante a homogeneização e prevenindo a agregação das gotas (coalescência e/ou floculação) (MCCLEMENTS, 2005). Como consequência, ocorre a formação de gotas de tamanhos menores e a área total de contato entre as fases é aumentada (FRIBERG *et al.*, 2003). Os emulsificantes podem ser divididos em duas grandes classes: surfactantes, que constituem as moléculas de baixa massa molecular (lecitina, monoglicérides, polissorbatos); e os emulsificantes macromoleculares, como as proteínas, que possuem alta tendência à adsorção na camada óleo-água (DICKINSON, 2003).

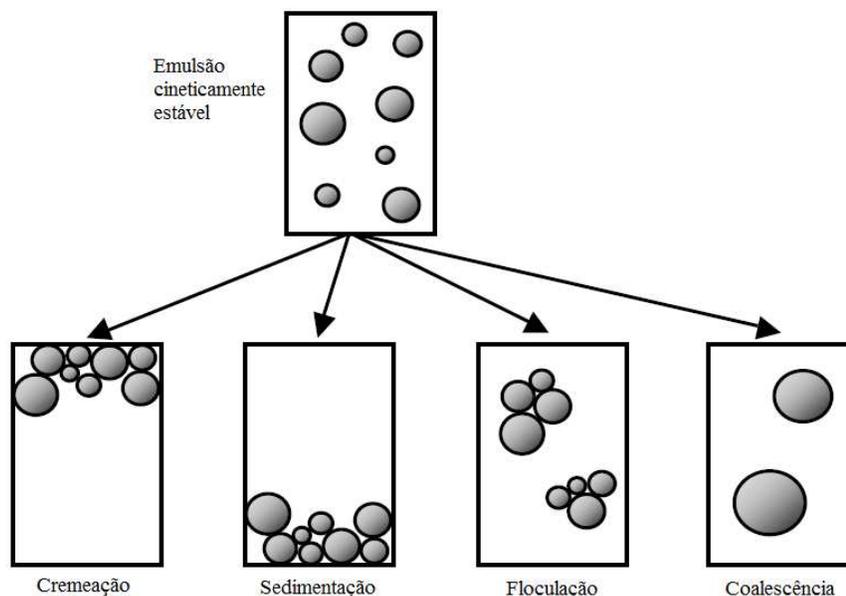


Figura 2.1: Esquema dos mecanismos de instabilidade em emulsões O/A. Fonte: (MCCLEMENTS, 2005).

As proteínas proporcionam boa estabilidade às emulsões, pois ao se adsorverem na interface provocam repulsão eletrostática e estérica entre as gotas de óleo (DICKINSON, 1999). Todavia, as emulsões estabilizadas por proteínas tendem a se agregar quando estão em pH próximo ao seu ponto isoelétrico, devido à neutralização da carga superficial que leva ao colapso da camada protéica (DALGLEISH, 1997; DICKINSON, 2008).

Por outro lado, os polissacarídeos podem aumentar a estabilidade das emulsões promovendo o aumento da viscosidade ou a formação de rede elástica na fase contínua, reduzindo a separação de fases e a cremação por gravidade. Além disso, os diferentes biopolímeros (proteínas e polissacarídeos) podem interagir entre si por ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ou por ligações covalentes como na reação de Maillard. Esta reação é capaz de formar conjugados proteína-polissacarídeo e é fortemente influenciada pelo pH, força iônica e temperatura

(SEMENOVA *et al.*, 2010). Como a ligação covalente entre uma proteína e um polissacarídeo representa uma interação específica forte e essencialmente permanente, estes conjugados possuem ótima atividade emulsificante e estabilizante (DICKINSON, 2003).

2.2 Reação de Maillard e formação dos conjugados

A reação de Maillard compreende uma série de reações complexas que ocorrem no processamento de alimentos, principalmente durante o tratamento térmico e estocagem (AMES, 1992). É uma reação de escurecimento não-enzimático que envolve os grupos carbonila, principalmente dos açúcares redutores, com compostos que possuem grupos amino livres como os aminoácidos, as aminas e proteínas. Os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina das proteínas são as maiores fontes de grupos amino livres em alimentos (HURRELL, 1984; AMES, 1992).

A reação de Maillard pode ser dividida em três estágios:

a) Estágio inicial: consiste na condensação do grupo carbonila do açúcar redutor com um grupo amino não protonado disponível, formando a base de Schiff com liberação de água. A base de Schiff cicliza-se na N-glicosamina correspondente que se rearranja irreversivelmente para formar o produto de Amadori (Figura 2.2) (AMES, 1992);

b) Estágio intermediário: este é iniciado com a degradação do produto de Amadori que passa por várias transformações envolvendo vias diferentes, incluindo oxidação, fragmentação, desidratação, hidrólise ácida, entre outras;

c) Estágio avançado: é caracterizado pela formação de compostos escuros de alta massa molecular insolúveis em água chamados de melanoidinas (FRIEDMAN, 1996).

Esta reação não-enzimática pode ocorrer em soluções aquosas ou a seco. Esta última é a mais desejável da perspectiva industrial uma vez que alcança o produto de interesse em menor tempo e necessita de menos espaço para o processo. Além disso, os compostos produzidos a seco possuem maior estabilidade térmica, e são manipulados e estocados mais facilmente. As reações a seco podem ser realizadas a partir da liofilização da mistura de proteína com o açúcar redutor seguida de aquecimento a determinadas temperaturas. As condições de reação precisam ser estritamente controladas para produzir o conjugado proteína-polissacarídeo desejável, evitando a formação das melanoidinas que ocorre no estágio mais avançado da reação (OLIVER *et al.*, 2006).

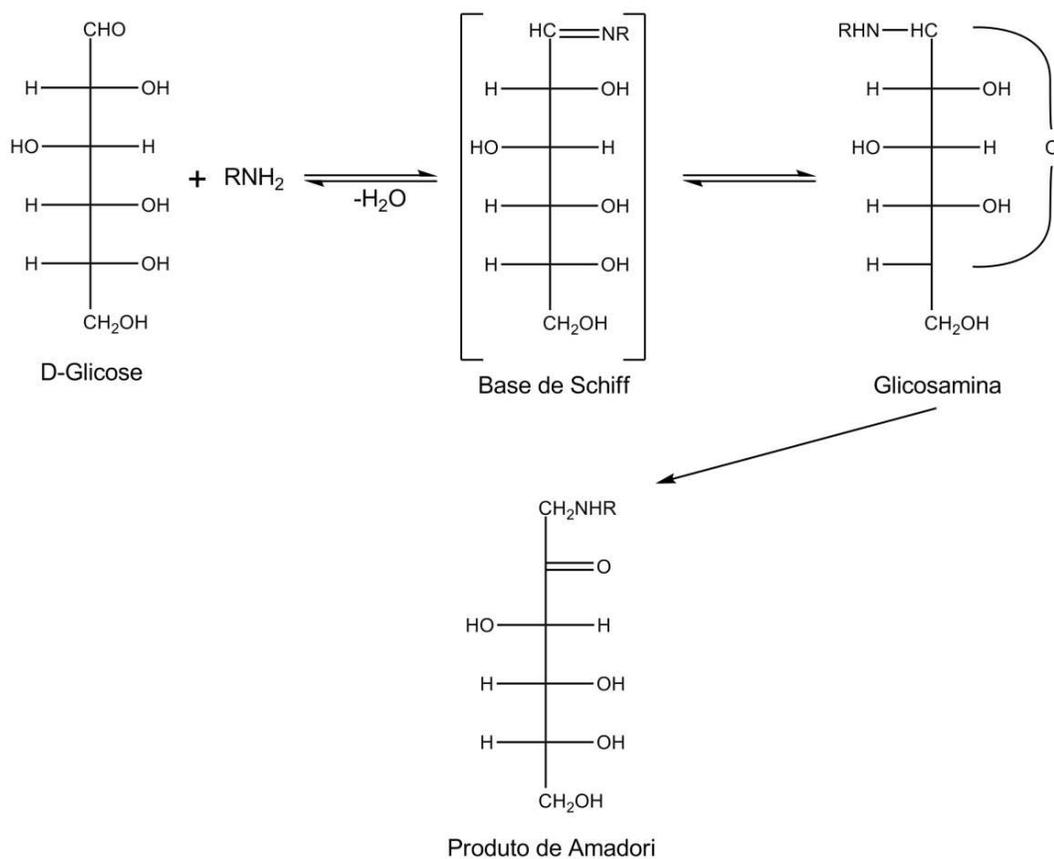


Figura 2.2: Estágio inicial da reação de Maillard usando glicose como fonte de carbonila. Adaptado de Dills (1993).

O conjugado glicoprotéico de alta massa molecular formado no estágio inicial da reação é capaz de aumentar a estabilidade das emulsões. Isso se deve à combinação das propriedades hidrofóbicas das proteínas, com as propriedades hidrofílicas dos polissacarídeos que interagem com o meio aquoso e contínuo (DICKINSON e GALAZKA, 1991).

Yadav *et al.* (2010) produziram conjugados a partir de fibra de milho, isolado protéico do soro de leite ou β - lactoglobulina, cuja reação durou 7 dias a 75°C e 79% de umidade relativa. Após a reação, a solubilidade da proteína aumentou e a capacidade de estabilização da emulsão foi melhorada devido à presença do polissacarídeo. Os resultados foram explicados pela adsorção hidrofóbica das proteínas na camada interfacial, que funcionaram como uma âncora na interface; e à extensão das moléculas hidrofílicas que proporcionaram repulsão estérica. A formação do conjugado foi alcançada no prazo de um a dois dias, e a continuação da reação ao longo dos dias produziu percentuais maiores de conjugados, que, no entanto se mostraram menos solúveis e com menor capacidade emulsificante.

Conjugados de maltodextrina e caseinato de sódio foram produzidos por Morris *et al.* (2004), através da reação de Maillard durante 4 dias, na temperatura de 60°C e 70 % de umidade. Como resultado houve aumento da razão massa/carga superficial, devido à diminuição da carga da proteína, e/ou devido ao aumento da massa molecular confirmada por espectrometria de ionização mássica. O aumento dessa relação é coerente com a reação que ocorre entre a lisina e o carboidrato, pois gera aumento da massa molecular. Além disso, após 2 dias de reação não foi mais observada a redução do grupo amino, pois depois deste período os resíduos de lisina estariam indisponíveis para reagir. A maior estabilidade

dessas emulsões foi então associada ao aumento da massa molecular através da reação da lisina presente no caseinato com a carbonila presente na maltodextrina.

Ovoalbumina-goma guar também foram utilizados para produzir conjugados que mostraram capacidade emulsificante, atividade antimicrobiana e antioxidante. A formação da ligação covalente entre a proteína e o polissacarídeo foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida. A atividade antioxidante foi monitorada pela medida de quantidade de peróxidos e ácido tiobarbitúrico por absorvância a 532 nm. As menores porcentagens de peróxido foram alcançadas em maiores concentrações de glicoconjugados. Estes biopolímeros foram considerados ingredientes efetivos e seguros, por serem naturais e de alto potencial para uso em alimentos (NAKAMURA e JING, 2005).

2.3 Caseínas e caseinato de sódio

As proteínas do leite são bastante estudadas, pois além de seu valor nutricional estas são usadas como agentes emulsificantes e estabilizantes (MODLER, 1985). As caseínas constituem 80% das proteínas do leite e são compostas pelas unidades α_{s1} , α_{s2} , β e κ . Do total das proteínas do leite, as α_{s1} - correspondem a 38%, as α_{s2} - a 10%, as β - a 36% e as κ - caseínas a 13 %. Elas diferem entre si em vários aspectos como carga superficial, composição dos aminoácidos, sensibilidade aos íons cálcio e distribuição de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (SEMENOVA *et al.*, 2010).

As caseínas são compostas estruturalmente por resíduos de fosfoserina (composta por grupos carboxila), a qual corresponde à extremidade carregada e de caráter hidrofílico. Já as regiões compostas por grupos N-terminais e C-terminais são caracterizadas por acumularem resíduos hidrofóbicos. A hidrofobicidade média da caseína é

consideravelmente superior a de outras proteínas, o que lhe confere forte tendência à associação. No entanto, esta associação é limitada pela repulsão eletrostática causada pela presença de grupos fosfato (MÖBIUS e MILLER, 1998).

Em soluções aquosas, as caseínas formam sistemas coloidais devido à sua estrutura desordenada e bastante flexível. Isto contribui para a forte tendência à adsorção nas superfícies hidrofóbicas, e por isso é utilizada na estabilização de emulsões O/A (MODLER, 1985). A estabilidade das caseínas está ligada a sua baixa massa molecular, além de que estudos experimentais indicam que estas proteínas possuem pequenos níveis de estruturas secundárias e terciárias. Tal característica contribui para tornar a caseína estável aos agentes desnaturantes, como calor e uréia, e contribui para sua alta atividade de superfície (FOX e KELLY, 2004).

Apesar de sua elevada estabilidade térmica, as caseínas são sensíveis a mudanças de pH e condições iônicas (MODLER, 1985). Em pH 4,6 as caseínas precipitam pois estão próximas ao seu ponto isoelétrico, diferentemente das proteínas do soro que permanecem solúveis neste pH (FOX e KELLY, 2004). Assim como a acidificação do meio, o aumento da concentração de íons cálcio, juntamente com a temperatura, pode acarretar mudanças na estrutura da proteína (SEMENOVA *et al.*, 2010).

O caseinato de sódio é um sal derivado da caseína constituído por uma mistura dos monômeros α_{s1} , β , α_{s2} , e κ . A adição do hidróxido de sódio à caseína leva à formação de uma estrutura protéica mais aberta e flexível para interagir com a água. No caseinato de sódio as frações de caseína encontram-se na forma de submicelas, sendo este amplamente

utilizado como emulsificante em produtos alimentícios, pois atua combinando interações eletrostáticas e estabilidade estérica (CHU *et al.*, 1995).

Devido ao seu caráter anfifílico, as partículas de caseinato estão disponíveis para interagir com moléculas anfifílicas e lipofílicas como surfactantes, lipídeos e vitaminas (SEMENOVA *et al.*, 2010). A reologia e estabilidade das emulsões que utilizam o caseinato são dependentes principalmente da estrutura e composição da camada de proteína adsorvida na interface O/A, bem como do estado de agregação e desdobramento das proteínas na fase aquosa (DICKINSON, 1999).

2.4 Galactomananas

As galactomananas são polissacarídeos não iônicos de massa molecular na ordem de 10^3 kDa, extraídos de plantas, árvores e arbustos. Exemplo desta classe de polissacarídeos são as gomas jataí (“locust bean gum”- LBG), guar, tara e fenugreek. As galactomananas são formadas por resíduos de D-manose unidos por ligações β (1-4) e que possuem resíduos de α -D galactose ligados à cadeia principal (Figura 2.3). As gomas provenientes de fontes diversas diferenciam-se entre si pelo grau de substituição da galactose, sendo as razões de galactose/manose: 1:4,5 para a jataí, 1:2 para a guar e 1:3 para a tara (MCCLEMENTS, 2005).

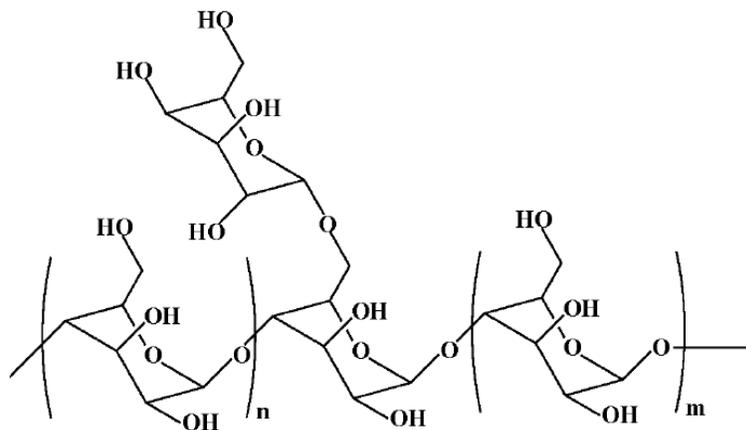


Figura 2.3: Fórmula estrutural das galactomananas. Fonte: (SEMENOVA *et al.*, 2010).

As cadeias de galactose tendem a inibir a associação intra-molecular das galactomananas. Desse modo, a quantidade de galactose influencia nas diferentes propriedades funcionais das gomas como solubilidade, capacidade espessante e de gelificação. Por exemplo, a goma guar é capaz de se solubilizar em água fria, porém a jataí e a tara necessitam de aquecimento para se solubilizar. As galactomananas tendem a formar soluções viscosas e tixotrópicas, cujo comportamento reológico não é muito influenciado pela força iônica e pH, por se tratar de uma molécula neutra. Por estas razões, as gomas jataí e guar são bastante utilizadas como agentes espessantes em emulsões na indústria de alimentos (MCCLEMENTS, 2005).

A goma jataí (LBG) é largamente usada em produtos lácteos, pois mesmo em baixas concentrações é capaz de formar soluções viscosas, porém, não forma gel (DICKINSON, 2003; PERRECHIL *et al.*, 2009). Cui *et al.* (2009) realizaram experimentos com as gomas jataí, guar, tara e fenugreek para investigar suas propriedades reológicas em emulsões. Foi confirmada a influência da massa molecular e da razão manose/galactose (M/G) na

atividade de superfície, tixotropia, capacidade emulsificante e viscosidade. No entanto não foi possível distinguir qual dos dois fatores teve maior influência. A goma jataí, que possui maior razão M/G apresentou comportamento tixotrópico, enquanto a goma guar que possui menor razão M/G não mostrou dependência do tempo de cisalhamento. Todavia, a goma guar apresentou melhor ação estabilizante e maior viscosidade intrínseca devido a sua maior atividade de superfície e à formação de uma camada estérica em volta da gota de óleo.

Como as galactomananas podem ser obtidas comercialmente sem dificuldades, e são de baixo custo, tornam-se uma fonte interessante para a produção de conjugados proteína-polissacarídeo. Conjugados de galactomananas (goma guar) com albumina de soro bovino (BSA) foram produzidos pela reação de Maillard e avaliados em emulsões do tipo óleo em água. A atividade emulsificante dos conjugados foi significativamente maior do que da proteína individual. Também apresentaram melhor estabilidade, provavelmente devido à proteção física proporcionada pela viscoelasticidade da camada de goma guar. Além disso, as propriedades interfaciais dos conjugados de BSA-galactomananas foram melhores devido à redução da interação hidrofóbica das gotas associada à repulsão estérica provocada pela goma guar (KIM *et al.*, 2003).

2.5 Reologia e tensiometria

Os biopolímeros são os melhores candidatos para agirem como agentes emulsificantes. Devido ao caráter anfifílico, pode oferecer forte adsorção na interface óleo – água e também interagir com meio aquoso, com parte da estrutura imersa na fase contínua solúvel, sendo, portanto, adicionados como modificadores reológicos. A vida de prateleira

de produtos alimentícios é altamente dependente de suas propriedades reológicas, e na engenharia estas propriedades ajudam a compreender como os fluidos se comportam quando estão passando por uma tubulação ou sendo agitados em um misturador (MCCLEMENTS, 2005).

A reologia é a ciência que estuda a deformação e fluxo da matéria, através de medidas que envolvem aplicação de uma força específica tendo como resultado o fluxo ou a deformação do material. As propriedades reológicas das emulsões dependem de alguns fatores como composição volumétrica da fase dispersa, tamanho de gota e sua carga, comportamento reológico das fases, e as interações entre as gotas. Em alta fração volumétrica da fase dispersa, as gotas não conseguem se movimentar muito e escoar. Acima de uma determinada concentração, as emulsões ganham propriedades de gel como elasticidade e viscoelasticidade. Por outro lado, a viscosidade de uma emulsão pode ser diretamente proporcional à viscosidade da fase contínua, e este é um dos motivos que levam à adição de proteínas e polissacarídeos, para agirem como agentes espessantes e gelificantes. Já o tamanho e distribuição das gotas dependem das suas interações repulsivas e atrativas, e acabam por influenciar as propriedades reológicas das emulsões por estarem ligados diretamente a movimento browniano e à resposta dos fluidos quando submetidos a tensões (MCCLEMENTS, 2005).

Perrechil e Cunha (2013) estudaram emulsões O/A multicamadas formadas pela interação eletrostática de caseinato de sódio e K-carragena estudados em diferentes concentrações. Em pH 3,5, quando os biopolímeros apresentaram cargas opostas, houve um aumento na viscosidade aparente a uma taxa de deformação de 100 s^{-1} , explicada pela saturação do polissacarídeo ao redor das gotas e seu excesso presente na fase contínua.

Além disso, com o aumento da concentração do polissacarídeo o comportamento da emulsão tornou-se cada vez mais pseudoplástico.

Complementarmente à reologia, o estudo das propriedades mecânicas na interface tem importante relevância para muitos processos naturais e tecnológicos que envolvem sistemas como filmes líquidos, emulsões e espumas. A reologia interfacial estuda as respostas da interface a forças mecânicas cisalhantes ou de compressão e expansão. A resposta dinâmica dos sistemas a essas perturbações é dada, por exemplo, através do módulo complexo viscoelástico e de mudanças na tensão interfacial, ambos devido ao processo de difusão ou de relaxamento da interface. Para atingir o mecanismo de equilíbrio da interface é necessária a lenta variação da área superficial para que se possam obter medidas mais precisas (RAVERA *et al.*, 2010).

A tensiometria do perfil da gota ou bolha é uma técnica bastante conhecida e reconhecida que determina as propriedades mecânicas de interfaces líquido – gás e líquido – líquido. A gota de um líquido é inserida em outro fluido e assume uma forma que visa minimizar a energia total do sistema. Sob periódicas perturbações na área interfacial, a técnica permite obtenção da resposta da tensão interfacial para baixos intervalos de frequência (RAVERA *et al.*, 2010).

Bouyer *et al.*, (2011), estudaram o comportamento da tensão interfacial dos biopolímeros β – lactoglobulina e goma arábica individualmente e suas misturas em emulsões O/A. A mistura de biopolímeros apresentou um decréscimo um pouco maior da tensão interfacial quando comparada aos biopolímeros individuais, que foi explicada pelo efeito sinérgico ocorrido entre a β – lactoglobulina e goma arábica.

CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os materiais utilizados para o preparo dos sistemas foram caseína e goma jataí adquiridas da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). Óleo de soja (Soya, Bunge Alimentos S.A., Brasil) foi adquirido em comércio local. Azida sódica da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA) foi adicionada às soluções para evitar crescimento microbiano. Os demais ingredientes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Preparo das soluções

3.2.1 Preparo da solução de caseinato de sódio

A solução estoque de caseinato (10% m/v) de sódio foi preparada pela dispersão da caseína em água deionizada sob agitação mecânica por 3 h a temperatura ambiente. O pH foi então ajustado para 7 com o uso de NaOH 10 M para a formação do caseinato de sódio. Azida sódica (0,05%, m/v) foi adicionada à água deionizada como agente antimicrobiano. As soluções foram armazenadas por 24 horas a 7°C antes de serem utilizadas.

3.2.2 Preparo das soluções de gomas jataí

A solução estoque da goma jataí (2 % m/v) foi preparada pela dispersão do pó em água deionizada à temperatura ambiente sob agitação, seguida por tratamento térmico a 80°C por 30 minutos para completa hidratação. Após o tratamento térmico esta solução foi resfriada imediatamente em banho de gelo. A solução foi também armazenada a 7°C por 24 horas antes de ser usada no preparo das misturas.

3.2.3 Preparo das misturas de biopolímeros

As soluções de proteína (10% m/v) e polissacarídeo (2% m/v) resfriadas foram misturadas de modo a obter as razões de 0,3; 0,6 e 1,2 (m/m) de proteína/polissacarídeo. Para completa mistura foi utilizado o homogeneizador Ultra Turrax modelo T18 (IKA, St Augustin, Germany) a 14000 rpm por 1 minuto. O pH das misturas foi ajustado para 7,0 através de acidificação direta com o uso de HCl 1M. As misturas foram acondicionadas em recipientes metálicos e congeladas em seguida.

3.3 Preparo dos conjugados

Após o congelamento, as misturas dos biopolímeros foram liofilizadas e o produto obtido foi moído em moedor de facas para se transformar em pó. Este pó foi acondicionado em congelador até ser submetido à reação de Maillard.

Alíquotas de 5g foram acondicionadas em placas de Petri e colocadas em dessecadores com solução supersaturada de KBr (UR = 79%). Os dessecadores foram acondicionados em estufa e a temperatura foi controlada a 80°C. A reação foi conduzida por 24, 48, 72 e 96 horas e as alíquotas retiradas em cada tempo foram imediatamente congeladas em freezer. Posteriormente as amostras foram submetidas a análises de eletroforese em gel de poliacrilamida, determinação da cor, FTIR e potencial zeta. Na sequência, os conjugados preparados nas diferentes razões e em diferentes tempos de reação foram usados no preparo das emulsões.

Na Figura 3.1 está representado o diagrama de fluxo desta etapa.

3.3.1 Preparo dos conjugados e misturas controle

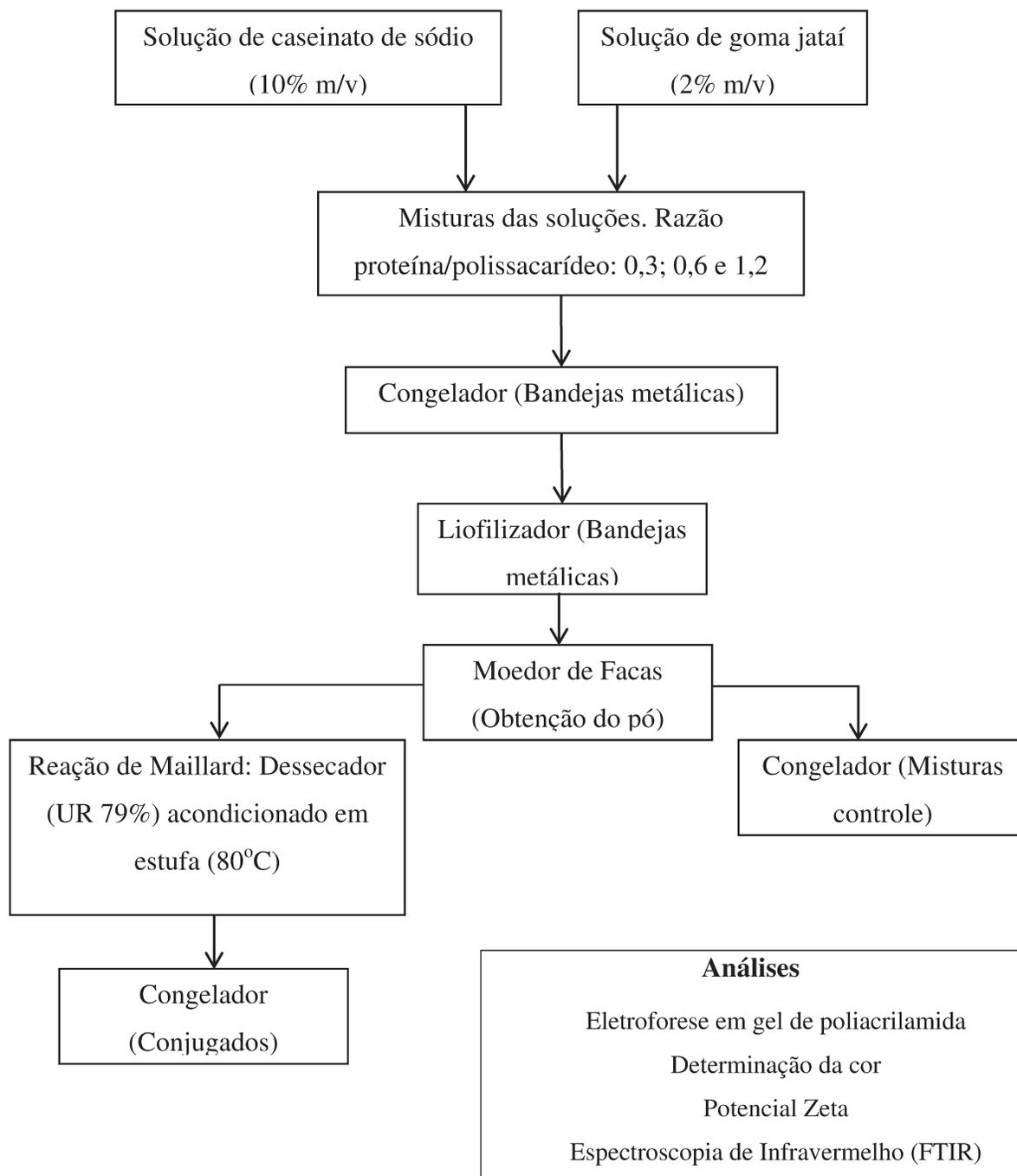


Figura 3.1: Diagrama de fluxo para obtenção de misturas ou conjugados de caseinato de sódio – goma jataí.

3.4 Preparo das emulsões O/A

As soluções de conjugados ou misturas controle de caseinato de sódio - goma jataí 2% m/v foram preparadas e ajustadas para pH 3,5 e 7,0 com soluções de HCl 0,2 N e NaOH 0,2 N respectivamente. As emulsões O/A foram preparadas pela mistura de 30 % (v/v) de óleo de soja com soluções de conjugados e de misturas controle (não submetidas à reação) utilizando-se um homogeneizador Ultra Turrax modelo T18 (IKA, St Augustin, Germany) a 14000 rpm por 4 minutos. O óleo foi adicionado aos poucos para melhor homogeneização das emulsões. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em um homogeneizador a alta pressão NS1001L2K-PANDA2K, Niro Soave (Parma, Itália), em dois estágios sequenciais a pressões de 300/50 bar. Após 7 dias, as emulsões foram submetidas às análises de estabilidade à cremeação, distribuição do tamanho das gotas, microscopia óptica, microscopia confocal, potencial zeta, medidas reológicas e tensiometria.

Na Figura 3.2 está representado o diagrama de fluxo da etapa de preparo das emulsões e suas respectivas análises.

3.4.1 Preparo das emulsões compostas por conjugados ou misturas controle

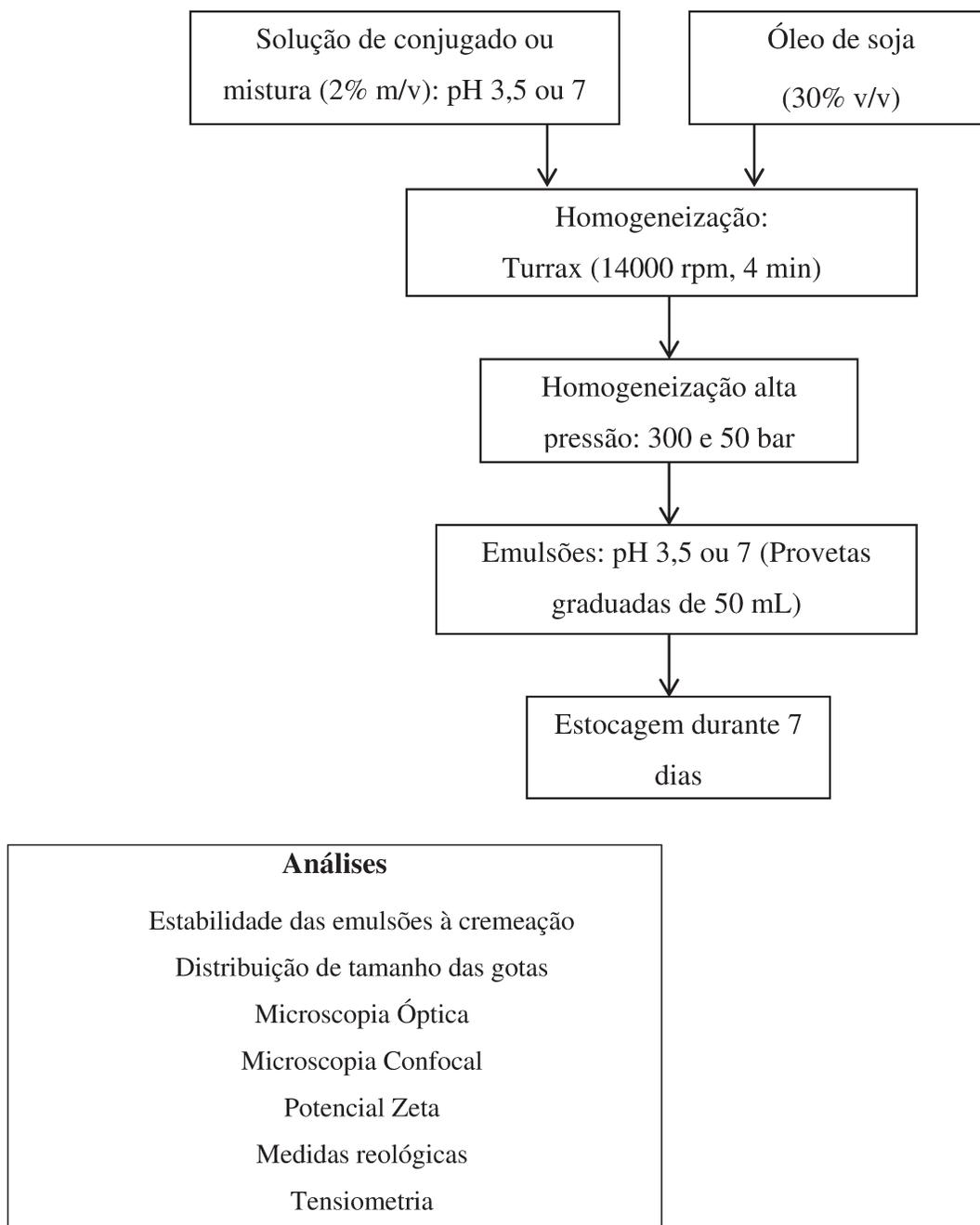


Figura 3.2: Diagrama de fluxo para obtenção das emulsões compostas por misturas ou conjugados de caseinato de sódio – goma jataí.

3.5 Análises

3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo o método de Laemmli (1970). As amostras foram diluídas em tampão pH 6,8 (62,5 mM Tris-HCl, 20% m/m glicerol, 2% m/v SDS, 0,05% m/v azul de bromofenol), as quais foram aplicadas aos géis de poliacrilamida. Além deste gel não redutor, foi utilizado também gel redutor com adição de β -mercaptoetanol 5% v/v. Os géis foram submetidos a uma diferença de potencial de 110 V em uma unidade Mini Cell Protean (Biorad Laboratories, USA).

Após a separação, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue (0,25% v/v) em etanol:ácido acético:água (45:10:45% v/v) por pelo menos 2h, seguido de uma descoloração com ácido acético:etanol:água (5:10:85% v/v).

3.5.2 Determinação da cor

A cor das misturas dos conjugados formados foi analisada por reflectância, através de colorímetro Ultra Scan Vis 1043 (Hunter Lab, Reston, EUA), em escala CIELab (L^* , a^* , b^*), na temperatura de 25 °C, utilizando o iluminante D-65 e um ângulo de observação de 10° (modo RESEX). As medidas foram expressas em termos dos parâmetros: luminosidade L^* ($L^* = 0$ preto e $L^* = 100$ branco), e a cromaticidade definida por a^* ($+a^* =$ vermelho e $-a^* =$ verde) e b^* ($+b^* =$ amarelo e $-b^* =$ azul). A partir desses parâmetros, foi calculada a diferença da cor (ΔE^*_{ab}) entre a mistura de caseinato de sódio e goma jataí antes e após a reação de conjugação, utilizando a Equação 1.

$$\Delta E^*_{ab} = \left[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right]^{1/2} \quad \text{Eq. 1}$$

3.5.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em combinação com atenuador de reflectância foi aplicada para o estudo da estrutura e dos grupos funcionais dos conjugados. Estes foram submetidos à análise de FTIR em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Spectrum One (Waltham, Estados Unidos) com transformada de Fourier, provido com o acessório UATR (atenuador de reflectância total universal).

As amostras foram analisadas nas seguintes condições: região de 4000 a 500 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , com 16 varreduras (VICENTINI *et al.*, 2005). O software Spectrum One B (versão 5.31) foi utilizado para o tratamento dos resultados.

3.5.4 Estabilidade das emulsões à cremeação

Alíquotas de 50 mL de emulsão foram transferidas para provetas graduadas e armazenadas por 7 dias a temperatura ambiente, sendo o volume da fase aquosa quantificado diariamente. Os resultados de estabilidade foram reportados como índice de separação de fases, onde $\text{ISF}\% = H/H_0 \times 100$, com H representando a altura da fase inferior com o tempo de estocagem e H_0 a altura inicial da emulsão.

3.5.5 Distribuição de tamanho das gotas

A distribuição do tamanho das gotas foi analisada através da técnica de espalhamento de luz, utilizando-se o equipamento Multi-Angle Static Light-Scattering Mastersizer (Malvern Instruments, Inglaterra). Esta análise foi realizada após 7 dias de

estocagem das emulsões, permitindo a obtenção da curva de distribuição do tamanho de partículas, sendo que o tamanho médio das gotas foi caracterizado em termos do diâmetro médio volumétrico, d_{43} , obtido pela Equação 2. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde n_i é o número de partículas com diâmetro d_i .

3.5.6 Microscopia Óptica

A microestrutura das emulsões foi avaliada após 7 dias de estocagem em microscópio óptico modelo Axio Scope.A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha) para avaliação qualitativa. As amostras foram colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e visualizadas com aumento de 40 e 100x, sendo obtidas aproximadamente 5 imagens de cada lâmina. As imagens obtidas foram avaliadas no software Axion Vision Rel. 4.8.

3.5.7 Microscopia Confocal

As soluções de biopolímeros foram coradas com rodamina B (solução 0,2%) para a visualização da distribuição das proteínas das emulsões. As imagens foram obtidas utilizando o Zeiss LSM 780-NLO confocal em um microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha). A microscopia confocal foi realizada para algumas emulsões que foram estáveis após 7 dias de estocagem.

3.5.8 Potencial Zeta

Para determinar a carga elétrica dos conjugados formados, foram preparadas as soluções de conjugados e misturas de modo a se obter uma dispersão 0,04% v/v. Analogamente, a carga superficial das gotas das emulsões foi medida a uma concentração de gotas de aproximadamente 0,005% m/m em solução tampão, 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). Para as soluções de conjugados foi realizada uma varredura de pH entre 2 e 8. Já as emulsões foram analisadas nos valores de pH estudados (pH 3,5 ou 7).

3.5.9 Medidas reológicas

Para a determinação das propriedades reológicas das emulsões foi utilizado um reômetro de tensão controlada Physica MCR 301 (Anton Paar, Graz, Austria). As medidas foram feitas em triplicata em uma temperatura de 25°C e a geometria utilizada foi placa rugosa, de modo a evitar o escorregamento entre o material analisado e a placa.

Curvas de escoamento foram obtidas através de um programa de passos múltiplos de subida – descida - subida usando um intervalo de taxa de deformação entre 0 - 300 s⁻¹. Para os ensaios oscilatórios, uma varredura de tensão foi realizada a fim de se determinar a região de viscoelasticidade linear. Posteriormente, varreduras de frequência (0,01 – 10 Hz) foram realizadas a 25°C utilizando uma tensão fixa dentro do intervalo de viscoelasticidade linear. Os módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') foram avaliados em função da frequência.

3.5.10 Tensiometria e Reologia Interfacial

A tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, nas mesmas composições das emulsões estudadas, foi medida usando o método da gota pendente no tensiômetro Tracker-S (Teclis, França). Os ensaios foram realizados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com a formação de uma gota da fase aquosa na fase oleosa. O volume da gota foi de $10 \mu\text{l}$, e para a determinação do módulo complexo de elasticidade, uma deformação volumétrica de 5% a uma frequência de 0,1 Hz foi utilizada.

3.5.11 Análises Estatísticas

Para análise estatística foi utilizado o teste de Tukey e as diferenças entre as médias foram consideradas significativas para $p < 0,05$. As análises foram feitas em triplicatas e software utilizado para avaliação dos resultados foi Statistica 7 (Statsoft Inc., EUA).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização dos conjugados

4.1.1 Determinação da cor

Os parâmetros que melhor representaram a alteração de cor devido à reação de Maillard foram L^* (luminosidade), b^* (variação do azul ao amarelo), e ΔE^*_{ab} (variação total da cor). Foi observado para todos os conjugados formados que o valor de b^* aumentou ao longo das horas de tratamento independentemente da razão proteína/polissacarídeo (Figura 4.1). Os maiores valores de b^* representam coloração mais amarelada, que é decorrente da formação de compostos intermediários da reação de Maillard (O'REGAN e MULVIHILL, 2009).

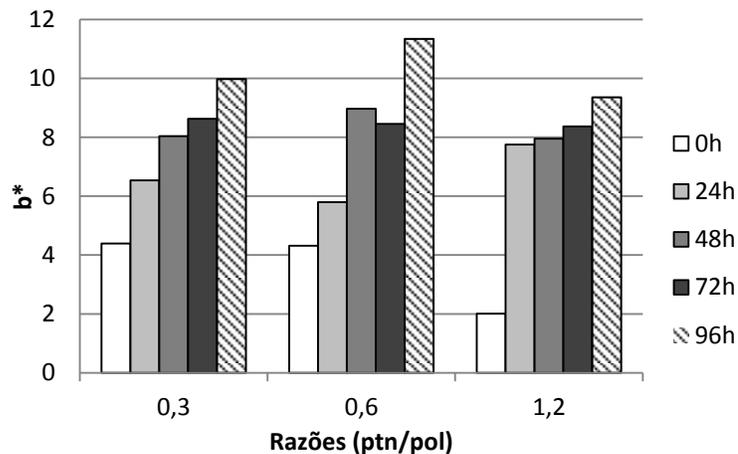


Figura 4.1: Valores de b^* para os conjugados ao longo dos tempos de reação de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, com as diferentes razões entre proteína e polissacarídeo.

A luminosidade das amostras está representada pelos valores de L^* , sendo que $L^* = 0$ (preto) e $L^* = 100$ (branco). As amostras que não sofreram reação de Maillard (0 h de reação) mostraram maiores valores de L^* como era esperado, todavia este valor não

manteve uma tendência ao longo dos tempos de reação, principalmente para razão 1,2 (Figura 4.2.A). No entanto, de forma geral, ao contrário do que ocorreu com os valores de b^* , os valores de L^* foram mais altos para o controle (0 h), e diminuíram nas horas iniciais confirmando o escurecimento das amostras com o tempo.

Os valores de ΔE^*_{ab} foram calculados utilizando a Equação 1 e representam a diferença de cor entre as misturas controle (0h) e os diferentes tempos de reação de Maillard (Figura 4.2.B). Foi possível observar que para quase todos conjugados formados, a variação total da cor foi maior para os maiores tempos de reação de Maillard. Na razão 1,2 em 96 horas, como o valor de L^* não foi muito menor que o controle, acabou por não causar grande diferença de cor, apresentando um valor de ΔE^*_{ab} abaixo do esperado.

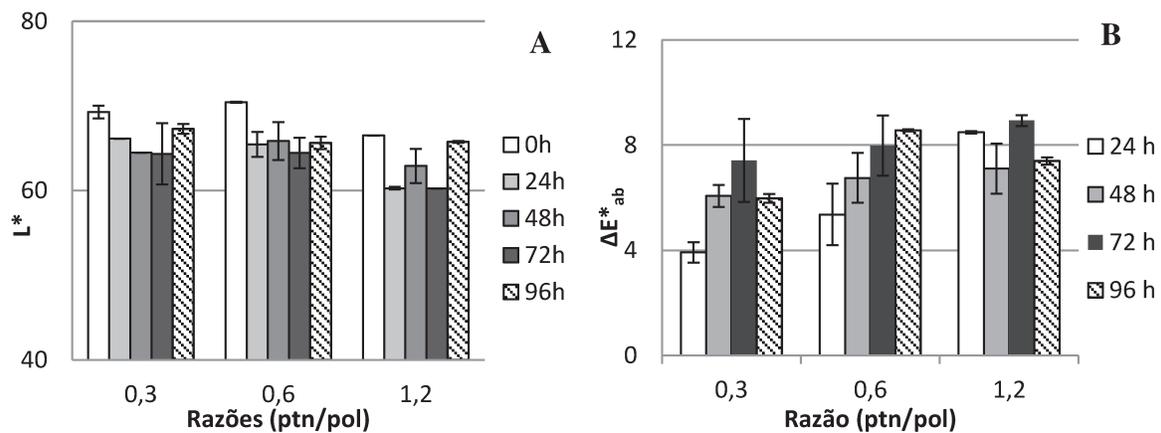


Figura 4.2: Valores de L^* (A) e de ΔE^*_{ab} (B) nas diferentes razões de proteína/polissacarídeo: 0,3; 0,6 e 1,2 para os conjugados formados nos tempos de reação de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h.

A mudança na cor de conjugados devido à reação de Maillard foi observada também em misturas de caseinato de sódio e maltodextrina produzidos a 60°C e 79% de umidade relativa por 4 dias. Houve alteração na cor dos glicoconjugados quando comparados ao

caseinato de sódio sem tratamento térmico. Os valores de b^* aumentaram consideravelmente com a conjugação dos biopolímeros confirmando o aparecimento da cor amarela após a reação de Maillard e os valores de L^* foram maiores quando não houve tratamento térmico (O'REGAN e MULVIHILL, 2009).

4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise de SDS – PAGE tem sido muito utilizada para identificar e confirmar a formação de ligações covalentes entre proteína e polissacarídeo submetidos à reação de Maillard (AKHTAR e DICKINSON, 2007). Foram analisados os conjugados formados através da reação de Maillard realizada em condições controladas a 80°C, 76% de umidade relativa, em diferentes tempos de reação e três razões de caseinato de sódio/goma jataí: 0,3; 0,6 e 1,2.

Os géis redutores e não redutores não apresentaram diferenças, mostrando que não houve formação de pontes dissulfeto.

A Figura 4.3 representa os géis não redutores das amostras de biopolímeros. Para todas as razões houve aparecimento de bandas bem intensas de α - e β -caseína (entre 25,9 kDa e 37,1 kDa) nas amostras controle (0h), confirmando que as misturas de proteína e polissacarídeo que não foram submetidas à reação não estão ligadas covalentemente e conseqüentemente não há presença de conjugado.

Por outro lado, pode-se observar diminuição da intensidade dessas bandas com o aumento do tempo de reação de Maillard. O desaparecimento gradativo das bandas correspondentes à α - e β - caseína está relacionado à ligação covalente que ocorre entre o caseinato de sódio e as extremidades redutoras da goma jataí. O glicoconjugado formado

por esta ligação possui alta massa molecular proveniente da longa cadeia do polissacarídeo e desta forma não penetra na malha do gel. Pela referência das massas moleculares do marcador pode-se certificar que os conjugados possuem massa molecular acima de 181,8 kDa, e ficaram retidos no topo do gel.

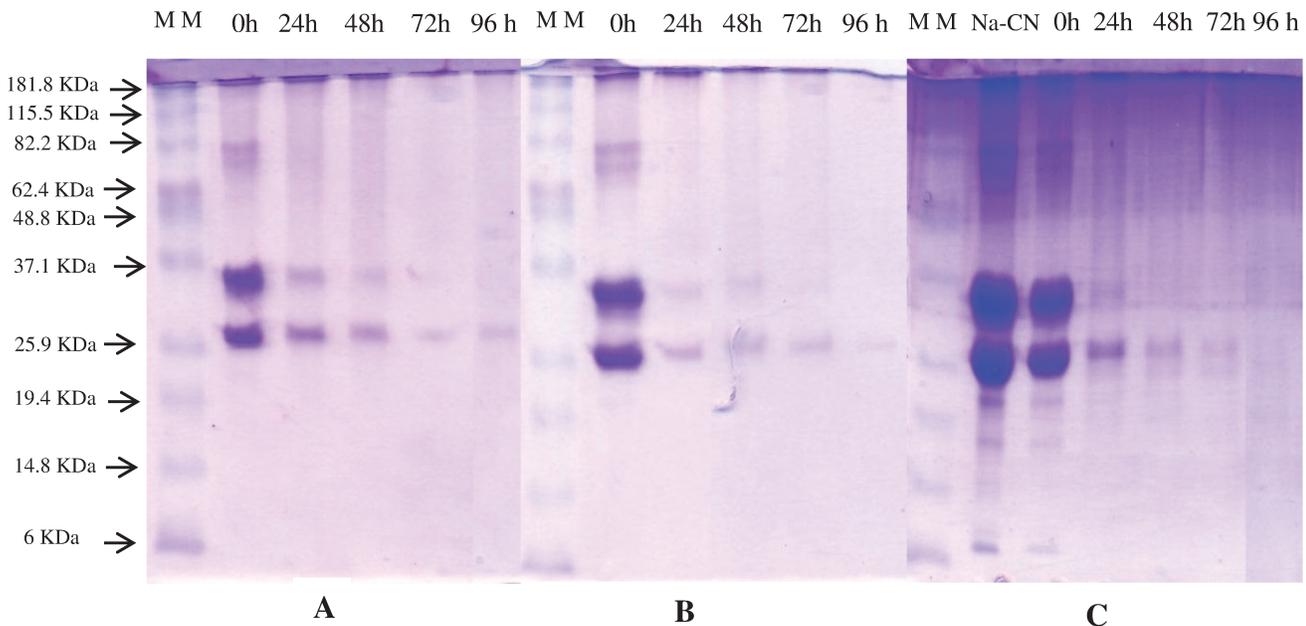


Figura 4.3: Géis de eletroforese não redutor: caseinato de sódio, controle (0h), conjugados nos tempos de reação de 24, 48, 72 e 96 horas nas razões proteína/polissacarídeo (A) 0,3; (B) 0,6; (C) 1,2. MM: marcador comercial de massa molecular.

Da mesma forma, LIU *et al.*, (2012) confirmaram também a formação de ligações covalentes durante a reação de Maillard entre isolado proteico de amendoim e dextrana. No gel de eletroforese as bandas de proteínas desapareceram com o aumento do tempo de incubação e indicaram a formação de um novo composto de alta massa molecular.

4.1.3 Potencial zeta

Os valores do potencial zeta foram obtidos para soluções de conjugados nas razões de proteína/polissacarídeo de 0,3; 0,6 e 1,2, seus respectivos controles (0h), caseinato de

sódio puro e goma jataí. Houve grande diferença do potencial zeta para caseinato de sódio puro em relação aos conjugados e às misturas em todas as razões de proteína/polissacarídeo. Na Figura 4.4 é possível observar a diferença no comportamento dos biopolímeros ao longo da titulação.

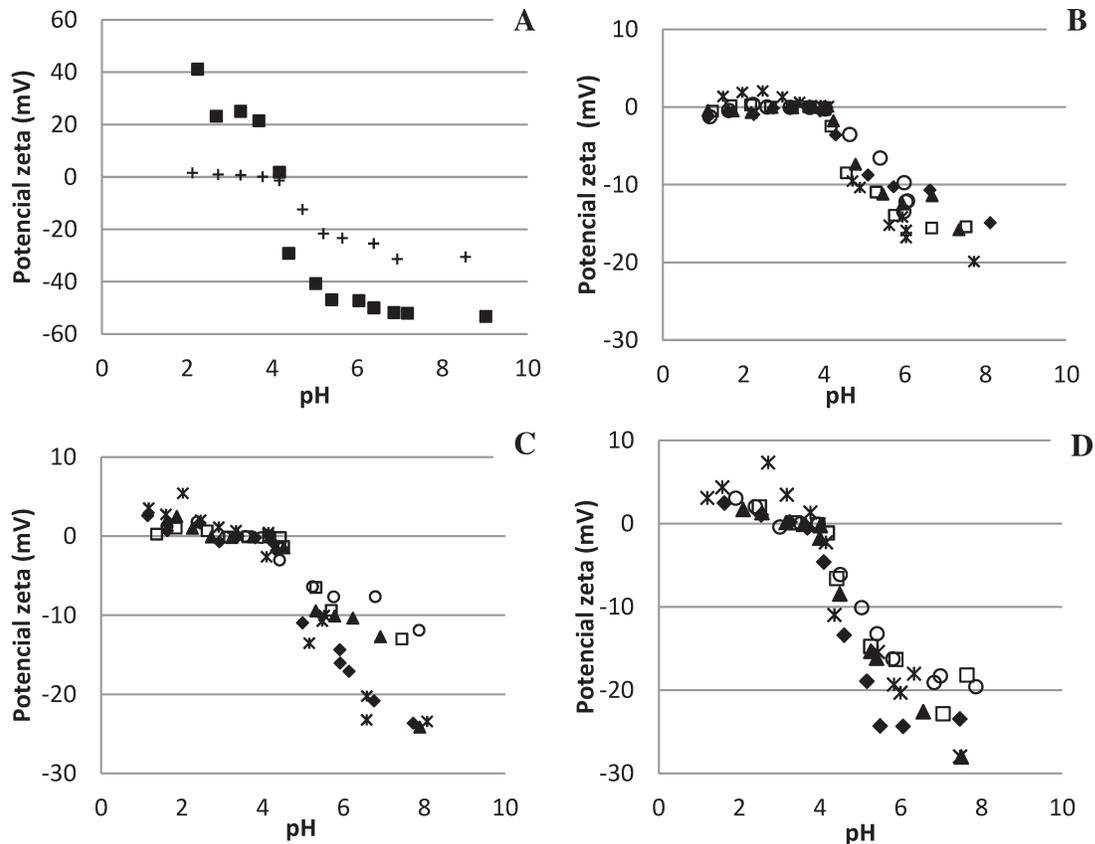


Figura 4.4: Potencial zeta em diferentes valores de pH. A) Caseinato de sódio puro liofilizado (■) e Goma jataí (+), e misturas de biopolímeros nas razões de proteína/polissacarídeo B) 0,3; C) 0,6; D) 1,2; nos tempos de reação: (*) 0 h; (○) 24 h; (▲) 48 h; (□) 72 h e (◆) 96 h.

A goma jataí apresentou carga próxima a zero nos intervalos de pH de 2 a 4,5. Em valores maiores de pH apresentou carga negativa possivelmente devido à ionização de grupos funcionais. Para as misturas de biopolímeros, em todas as razões de

proteína/polissacarídeo observa-se que o pH de transição, em que o valor do potencial zeta foi zero, mostrou deslocamento a menor valor. É possível observar tal comportamento comparando-se o pH de transição das misturas controle (pH > 4), em que a proteína estava livre, com os conjugados (pH < 4) quando a proteína estava ligada ao polissacarídeo (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Valores de pH onde ocorre a transição de valores positivos para negativos do potencial zeta para as misturas de biopolímeros.

Horas	pH de transição		
	Razão 0,3	Razão 0,6	Razão 1,2
0 h	4,10 ^a	4,13 ^a	4,15 ^a
24 h	3,65 ^b	3,14 ^b	3,70 ^b
48 h	3,69 ^c	3,76 ^a	3,59 ^c
72 h	3,62 ^d	3,63 ^{ab}	3,73 ^b
96 h	3,58 ^e	3,39 ^b	3,69 ^b

Em pH \approx 8, a carga negativa total dos conjugados preparados com maior concentração de polissacarídeo (0,3) foi menor em módulo, com valores próximos a -15,8 mV enquanto que nas razões 0,6 e 1,2 foram por volta de -23,6 mV e -28 mV, respectivamente. O menor conteúdo de proteína na razão 0,3 acabou por reduzir a carga total da solução, que ficou menos negativa comparada às razões 0,6 e 1,2. A predominância da goma jataí e sua estrutura com longas cadeias pode ter envolvido o caseinato de sódio, que é uma molécula bem menor, e assim impediu o maior efeito do caseinato de sódio na carga total da solução.

Esta hipótese pode ser confirmada ao observar um intervalo maior entre os valores positivos e negativos da razão 1,2 com a variação do pH. Para 48 horas de reação, esta

razão apresentou maior intervalo entre as cargas positivas e negativas, variando de +1,9 mV até -28 mV. Para o mesmo tempo de reação, a razão 0,3 limitou-se entre - 0,45 mV e -15,8 mV, evidenciando menor influência da variação do pH na razão que possui maior conteúdo de polissacarídeo neutro. Para o caseinato de sódio puro liofilizado esta diferença foi bem mais pronunciada tendo em vista que atingiu valores de +40 mV (pH \ll pI) e -50 mV (pH \gg pI). Logo, sem a presença do polissacarídeo, a proteína apresentou elevada carga positiva abaixo do pI e carga altamente negativa acima do mesmo.

4.1.4 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica importante no estudo de estruturas moleculares e muito aplicada por se tratar de uma análise rápida e não destrutiva. É utilizada para determinar os grupos funcionais das substâncias uma vez que suas ligações químicas possuem frequências de vibração específicas na região do infravermelho. De acordo com as larguras e intensidade das bandas nos diferentes comprimentos de onda é possível detectar alterações conformacionais em nível molecular. Sendo assim, as interações moleculares que ocorrem entre os biopolímeros podem ser representadas por diferentes picos no espectro do biopolímero puro e deste com mais de um componente (XU *et al.*, 2007). Logo, esta análise foi utilizada para verificar as interações formadas entre o caseinato de sódio e a goma jataí.

Os espectros dos biopolímeros individuais, das suas misturas controle e dos conjugados foram obtidos e qualitativamente analisados. Na Figura 4.5 estão representados os espectros da caseína em pó pura, caseinato de sódio puro liofilizado e da goma jataí, onde é possível notar claramente as diferenças e semelhanças entre as bandas características das proteínas e dos polissacarídeos. Os picos dos intervalos entre 3500 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} , e

entre 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} representam grupos O-H e C-H respectivamente, que estão presentes tanto no caseinato de sódio quanto na goma jataí (CERQUEIRA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2012).

Os picos característicos da caseína e caseinato de sódio encontram-se principalmente nos comprimentos de onda de 1650 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , onde estão bem mais intensos. O pico de 1540 cm^{-1} está relacionado às ligações C-N e N-H correspondentes aos grupos amina primários e secundários presentes nas proteínas, que podem também ser representados nas vibrações de comprimento de onda de 1380 cm^{-1} (GU *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2012). O pico de 1650 cm^{-1} corresponde às ligações C=O e C=N que também estão presentes nos aminoácidos das proteínas, que por sua vez possuem grupo carboxila e amino (GU *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2012).

Após a liofilização e moagem, o caseinato de sódio se torna um pó muito menos denso que resulta em sinais bem menos intensos que a caseína em pó comercial (Figura 4.5). Embora exista essa diferença de intensidade pode-se observar que os picos característicos são os mesmos, ou seja, manifestam-se nos mesmos comprimentos de onda.

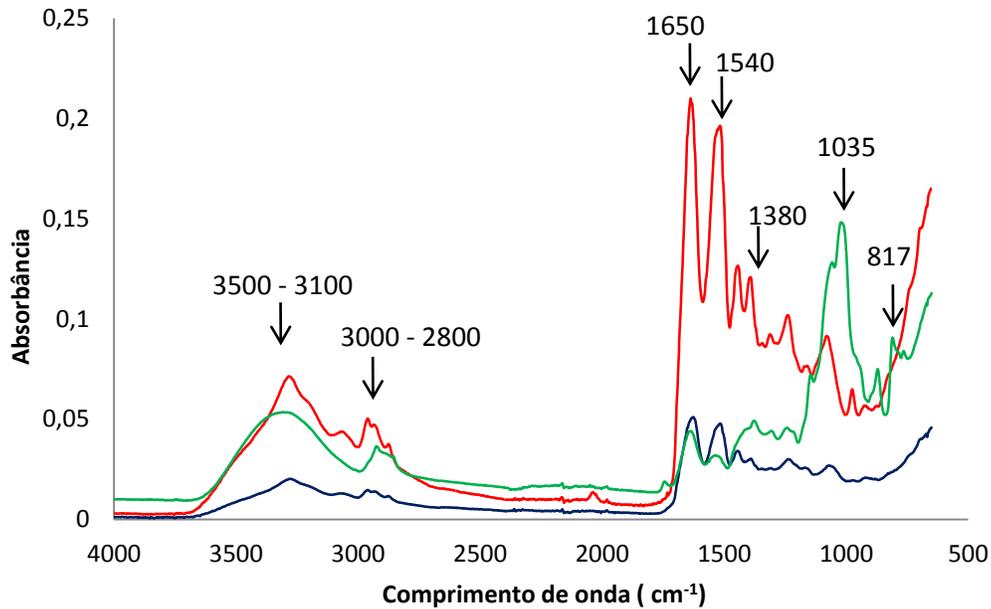


Figura 4.5: Análise de FTIR para caseína em pó pura (—); caseinato de sódio puro liofilizado (—); e goma Jataí (—).

O polissacarídeo se diferenciou da proteína basicamente na banda correspondente ao intervalo de 1150 cm^{-1} e 950 cm^{-1} onde está localizado o pico 1035 cm^{-1} que remete à região de carboidratos. Estes comprimentos de onda são caracterizados pelas ligações C-O e estiramentos de C-O-C presentes nas ligações glicosídicas dos polissacarídeos. Além disso, posteriormente elas podem também representar as ligações formadas pela reação de Maillard (MARTINS *et al.*, 2012).

Outros sinais foram encontrados no espectro do polissacarídeo, como as pequenas bandas em 817 cm^{-1} e 873 cm^{-1} que são características da goma jataí e representam a presença de ligações α - da D-galactopirranose, e ligações β - da D-manopirranose, respectivamente (MARTINS *et al.*, 2012).

Na Figura 4.6 estão representados os picos dos biopolímeros misturados e observa-se que para a mesma razão de proteína/polissacarídeo houve pouca ou nenhuma diferença entre as horas de reação. Apenas na razão = 1,2 foram observados picos mais intensos para o controle (0 h) nas regiões de 1650 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} que correspondem respectivamente às ligações C=O de grupos carboxila livres, grupos $-\text{COONH}_2$ (1635 cm^{-1}), e N-H proveniente das amidas secundárias (HUANG *et al.*, 2012). Este resultado permite observar a maior disponibilidade de tais grupos nas amostras controle, confirmando a ocorrência da reação e interação dos biopolímeros pela diminuição de grupos carboxila e amina livres.

Nas três razões houve a ocorrência dos mesmos picos que estão relacionados aos diferentes tipos de ligações presentes. Além dos picos já mencionados observam-se bandas amplas entre 3500 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} , o que pode ser atribuído a alongamentos de vibrações dos grupos O-H proveniente das hidroxilas que seriam tanto dos polissacarídeos como também das proteínas. As bandas entre os comprimentos de onda de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} representam as ligações C-H presentes também em ambos biopolímeros (CERQUEIRA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2012).

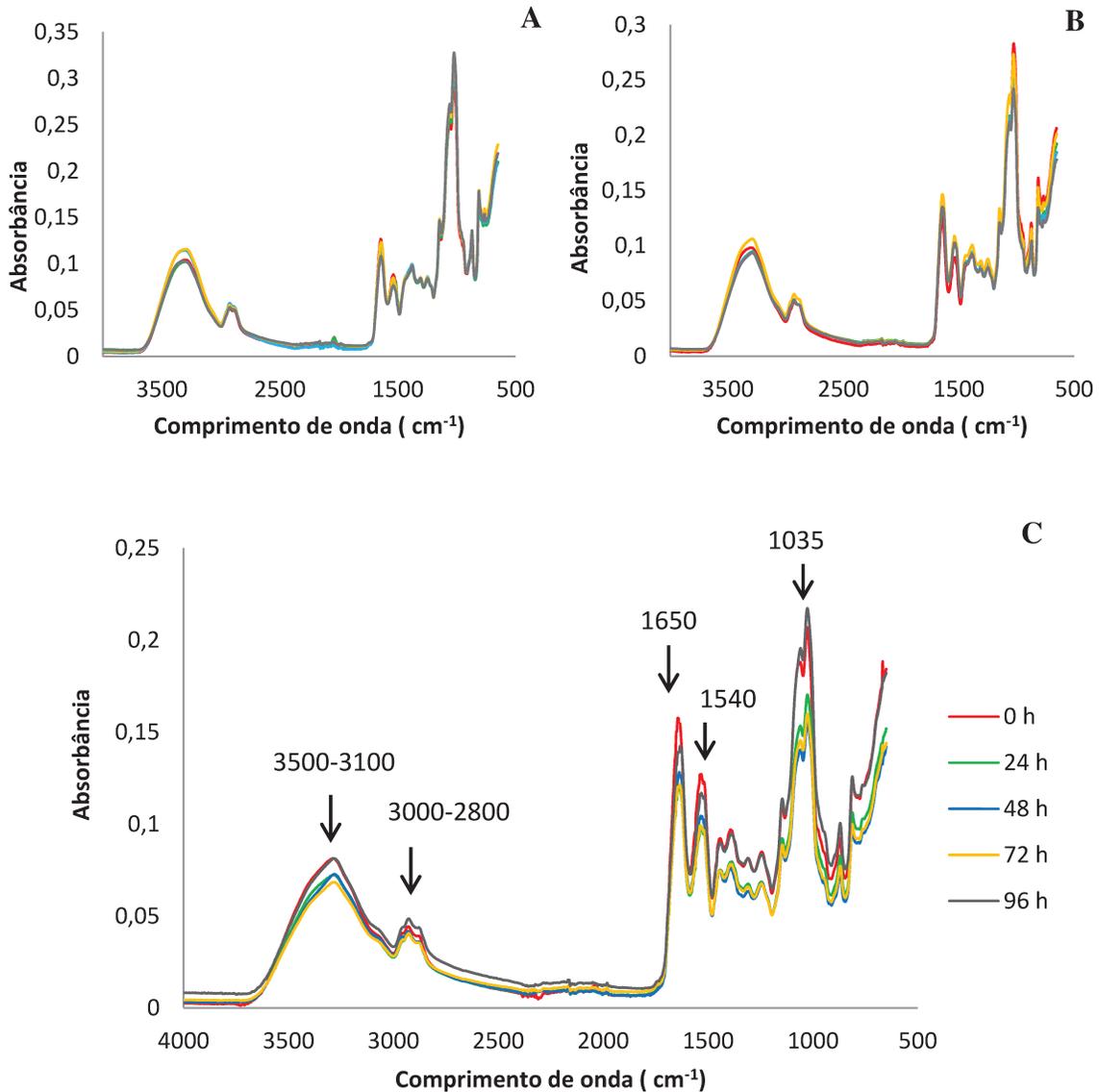


Figura 4.6: Análise de FTIR para os conjugados nas razões de proteína/polissacarídeo: A) 0,3; B) 0,6 e C) 1,2. Tempos de reação de (—) 0 h; (—) 24 h; (—) 48 h; (—) 72 h e (—) 96 h.

A confirmação de que o caseinato de sódio e a goma jataí interagiram pode ser observada na Figura 4.7 através das mudanças das intensidades dos picos característicos de cada biopolímero individualmente e da formação das bandas dos conjugados. Para os conjugados, em todas as três razões de proteína/polissacarídeo os picos em 1650 cm^{-1} das

ligações C=O foram bem menores quando comparados aos picos do caseinato de sódio puro no mesmo comprimento de onda. Esta banda corresponde a grupos carboxila livres e $-\text{COONH}_2$ presentes no caseinato de sódio, e sua diminuição na intensidade após a reação de Maillard indica que o grupo amino do caseinato de sódio reagiu com o grupo carbonila da goma jataí e formou um novo composto, o conjugado.

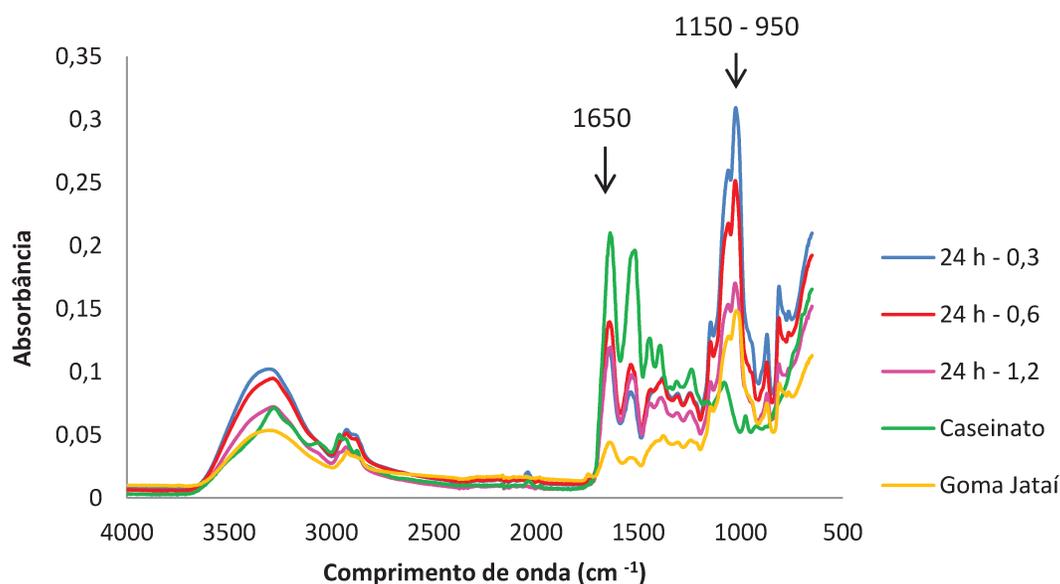


Figura 4.7: Análise de FTIR para os biopolímeros: (—) 24 h – 0,3; (—) 24 h – 0,6; (—) 24 h – 1,2; (—) caseinato de sódio liofilizado e (—) goma jataí.

Outro fato importante foi o aumento, em relação ao caseinato, das bandas entre 1150 cm^{-1} e 950 cm^{-1} nos conjugados após 24 horas de reação em todas as razões. Esta banda corresponde às ligações C-O e C-O-C, que estão presentes nos compostos intermediários da reação de Maillard. Após a condensação do grupo carbonila do polissacarídeo e grupo amino da proteína ocorre o rearranjo dos compostos formados, com posterior ligação entre carbonos e grupos hidroxila (MARTINS *et al.*, 2012).

4.2 Emulsões

4.2.1 Estabilidade à cremeação

As emulsões foram avaliadas diariamente quanto ao índice de separação de fases (%ISF) durante os 7 dias de estocagem. Foram observadas diferenças entre os valores de pH 3,5 e 7, bem como entre as razões de proteína/polissacarídeo de 0,3; 0,6 e 1,2. As Figuras 4.8 a 4.10 apresentam as fotos das emulsões registradas no sétimo dia. Nelas é possível observar a separação das fases aquosa e oleosa em alguns casos, sendo a interface indicada por uma seta.

A Tabela 4.2 mostra os valores do índice de separação de fases (%ISF) para as emulsões em pH 3,5 e 7 e nos tempos de reação de 0, 24, 48, 72 e 96 horas nas três diferentes razões de proteína/polissacarídeo.

Em pH 7, quase todas as emulsões foram estáveis independentemente dos tempos de reação de Maillard. Isso pode ser explicado pela conformação na qual a proteína se encontra em pH acima do pI. Nessa condição, a carga líquida da proteína presente na mistura ou conjugado é negativa e, portanto, promove repulsão eletrostática entre as gotas devido à presença de cargas semelhantes. Essa repulsão resulta em maior estabilidade cinética, evitando a agregação das gotas e conseqüentemente a separação de fases. Além disso, outro efeito responsável pela boa estabilidade é a presença do polissacarídeo, que aumenta viscosidade da fase contínua da emulsão. Em pH 7 houve separação de fases apenas para o controle (0h) na razão de 1,2, com índice de separação de fases de 2% após 7 dias. A separação pode ser justificada pela menor quantidade de polissacarídeo em relação às outras razões, pois com menor viscosidade, houve diminuição do efeito estérico. Após a

formação dos conjugados as emulsões ficaram estáveis independentemente do tempo de reação estudado.

Tabela 4.2: Índices de separação de fase (% ISF) para emulsões em pH 3,5 e 7 nas razões 0,3; 0,6 e 1,2 nos tempos de reação 0, 24, 48, 72 e 96 horas após 7 dias.

Tempo (h)	Razão (proteína/polissacarídeo)					
	0,3		0,6		1,2	
	pH 3,5	pH 7	pH 3,5	pH 7	pH 3,5	pH 7
0	0	0	4	0	2	2
24	0	0	0	0	0	0
48	0	0	3	0	0	0
72	0	0	0	0	46	0
96	0	0	22	0	40	0

A conformação dinâmica das proteínas na interface dos dois líquidos depende dentre outras coisas da sua solubilidade no meio aquoso que está relacionada com o pH do meio (MOBIUS, 1998). Em $\text{pH} < \text{pI}$ as proteínas ficam carregadas positivamente, porém neste caso (pH 3,5), por não estarem muito distante do seu $\text{pI} = 4,5$, as proteínas não se encontraram totalmente solúveis e não atingiram valor positivo suficiente para causar repulsão eletrostática. Logo, em pH 3,5 as emulsões foram menos estáveis e %ISF foi maior. Neste pH, as emulsões produzidas com as misturas controle nas razões de 0,6 e 1,2 apresentaram separação de fase. Com a produção dos conjugados em 24 h de reação, observou-se aumento da estabilidade, indicando melhora nas propriedades emulsificantes dos conjugados no estágio inicial da reação de Maillard.

No entanto, a estabilidade diminuiu em tempos de reação mais prolongados que caracterizam a formação de compostos com menor atividade emulsificante, provavelmente provenientes do estágio avançado da reação de Maillard (YADAV *et al.*, 2010). No pH de

3,5, para a razão de 0,6 o índice de separação de fases chegou a 22% após 96 horas de reação. Na razão 1,2 a separação de fase chegou ao índice de 46% para 72 horas no sétimo dia; e de 40% para 96 horas já no segundo dia, ficando assim até o sétimo dia (Figuras 4.8 - 4.10).

Além disso, pode-se inferir que em pH 3,5 ocorreu principalmente estabilidade estérica das emulsões devido à presença do polissacarídeo uma vez que neste pH a razão de 0,3 foi a única estável em todos os tempos. Correlacionando este resultado com os valores do potencial zeta na titulação dos biopolímeros em pH próximo a 3,5, observa-se que a carga dos controles e conjugados pouco se alterou, ficando estagnada próximo a zero até mesmo em valores de pH mais baixos. Dessa forma, confirma-se que a repulsão eletrostática não ocorreu e que as emulsões se estabilizaram pelo efeito estérico dos polissacarídeos ligados à proteína.

Em conjugados formados por ligações covalentes entre proteínas do leite e pectina, a concentração de polissacarídeo mostrou-se diretamente ligada à estabilidade das emulsões. As emulsões que possuíam maior quantidade de pectina foram mais estáveis e o menor índice de separação de fases foi justificado pelo aumento da viscosidade que evitou a movimentação e aglomeração das gotas (EINHORN-STOLL *et al.*, 2005).

A diferença da massa molecular também influencia diretamente a atividade dos polissacarídeos nas emulsões. Conjugados produzidos através da reação de Maillard com isolado proteico de trigo produziram efeitos diferentes quando se utilizou as dextranas D 65 (PM = 41000 Da) ou a D 10 (PM = 6400 Da). Houve aumento da estabilidade estérica em pH ácido (pH \approx 4) das emulsões com isolado proteico do trigo-dextrana 65, sendo esta mais

efetiva que isolado proteico do trigo-dextrana10, devido ao maior tamanho da molécula. Após a conjugação com a proteína, a camada estérica adicional formada pela D 65 possuía maior espessura, sendo suficiente para proporcionar repulsão estérica das gotas mesmo na ausência da repulsão eletrostática (WONG *et al.*, 2011).

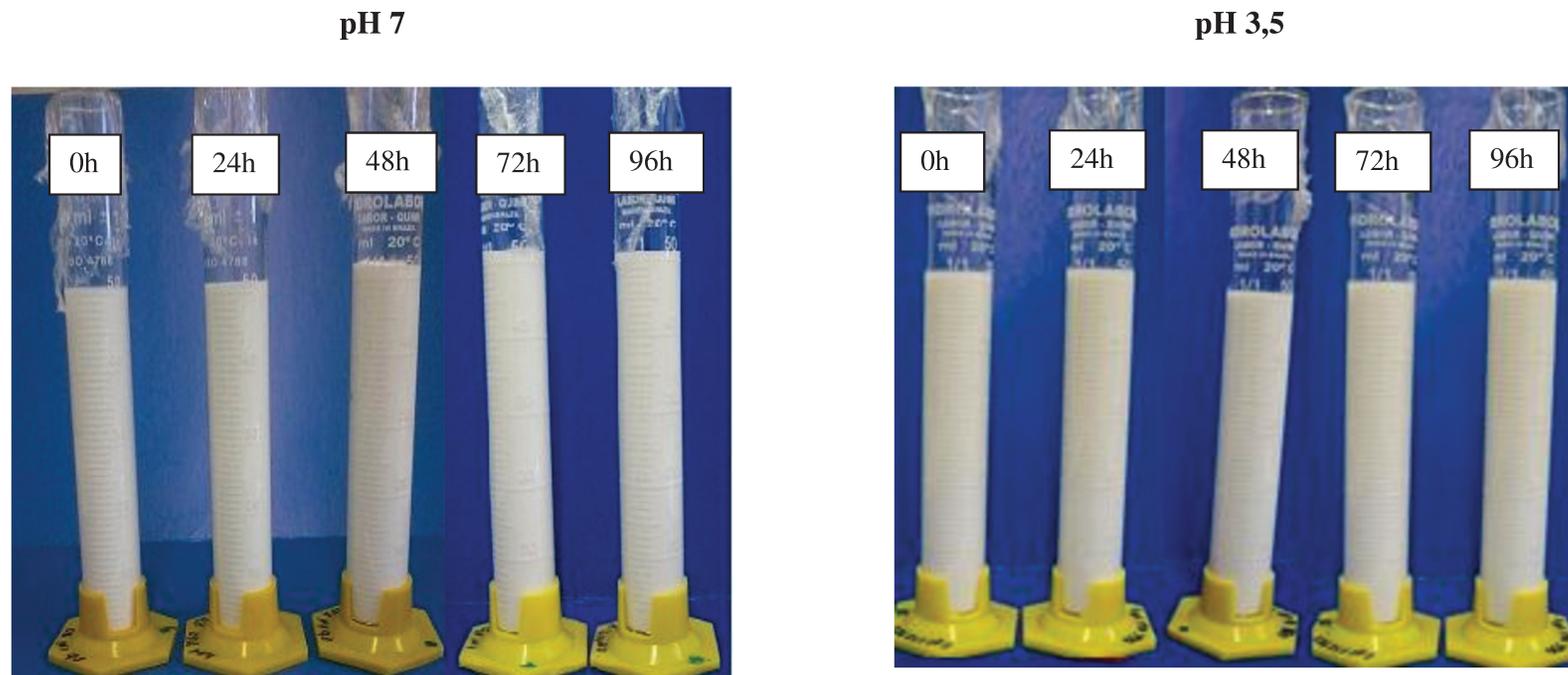


Figura 4.8: Emulsões produzidas em pH 7 e 3,5 razão de proteína/polissacarídeo = 0,3. Tempos de reação de Maillard: 0h (misturas controle), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (conjugados) após 7 dias de estocagem.



Figura 4.9: Emulsões produzidas em pH 7 e 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,6. Tempos de reação de Maillard: 0h (misturas controle), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (conjugados) após 7 dias de estocagem

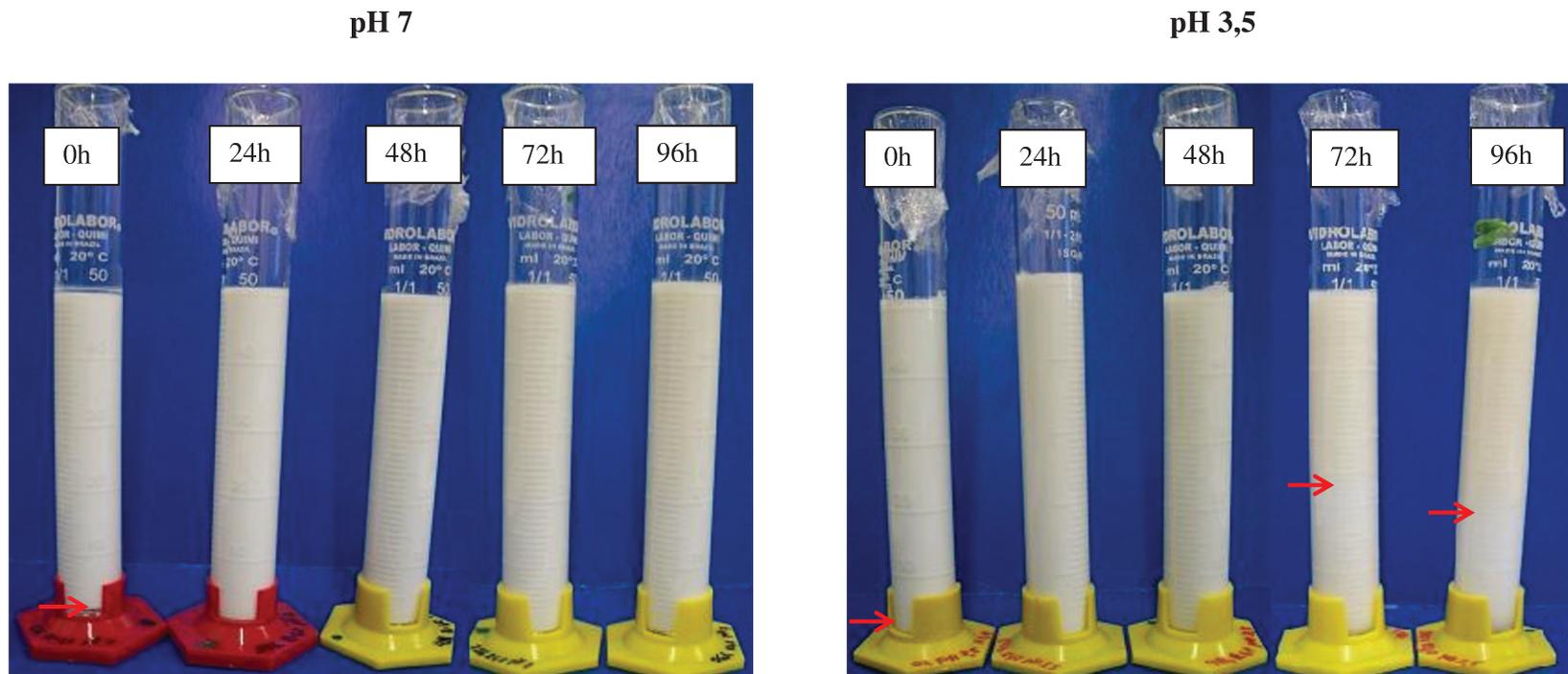


Figura 4.10: Emulsões produzidas em pH 7 e 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 1,2. Tempos de reação de Maillard: 0h (misturas controle), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (conjugados) após 7 dias de estocagem.

4.2.2 Distribuição do tamanho de gotas e microscopia

Em uma emulsão, as gotas estão em constante movimento devido aos efeitos da energia térmica, gravidade, e outras forças mecânicas. Conforme elas vão se movimentando, podem colidir frequentemente umas com as outras e se agregarem, dependendo das forças de repulsão e atração. Como resultado, são formadas gotas de variados tamanhos que influenciam diretamente no comportamento dessas emulsões. Dessa forma, o estudo da distribuição de tamanho de gotas se torna importante por determinar várias propriedades de emulsões presentes em alimentos como: aparência, textura e vida de prateleira (MCCLEMENTS, 2005).

As emulsões foram elaboradas com 2% de mistura controle ou conjugado, nos pHs 7 e 3,5 nas diferentes razões de 0,3; 0,6 e 1,2. As misturas controle (0 h) de biopolímeros apresentaram menor valor de diâmetro médio volumétrico (D_{43}) (Tabela 4.3). Para as emulsões em pH 7 houve aumento do tamanho médio das partículas com o aumento das horas de reação. Com esse resultado, é possível perceber o efeito da reação de Maillard na carga dos conjugados e conseqüentemente das emulsões neste pH. Após a ligação da proteína com o polissacarídeo, a interface provavelmente tornou-se mais espessa e assim pode ter influenciado no tamanho das partículas. No tempo zero, a proteína não se ligou ao polissacarídeo e, portanto permaneceu com carga negativa devido ao $\text{pH} > \text{pI}$, que causou efeito eletrostático nas emulsões. Este efeito foi menos pronunciado após a formação dos conjugados (24, 48, 72 e 96 horas), que formaram ligações covalentes entre o caseinato de sódio e goma jataí. Logo, após a reação as cargas não foram suficientes para causar repulsão eletrostática entre as gotas, que coalesceram e formaram gotas maiores e mais polidispersas (Figura 4.11). Ainda assim, as emulsões e pH 7 se mantiveram estáveis em

praticamente todas as condições, sugerindo que o aumento da espessura da interface garantiu estabilidade estérica das gotas.

Em pH 3,5 o efeito da reação de Maillard foi bem pronunciado para conjugados formados após 24 horas embora a carga superficial da proteína tenha se alterado pouco em relação ao controle. Neste pH, foi observada a diminuição do tamanho das gotas dos conjugados formados após 24 h de reação em relação às misturas controle nas razões 0,3 e 0,6, confirmando maior estabilidade das emulsões. A redução do tamanho das gotas é devida à capacidade emulsificante do conjugado formado, com uma porção hidrofóbica da proteína e a longa cadeia hidrofílica do polissacarídeo, que mantém a interface óleo-água mais estável. Para conjugados formados em tempos de reação mais avançados, o aumento no tamanho de partícula foi relacionado à perda da capacidade emulsificante.

Logo, a estabilidade observada em algumas emulsões deveu-se ao efeito estérico gerado pelas grandes cadeias da goma jataí que aumentaram a viscosidade das emulsões e, principalmente com o conjugado formado em 24 h de reação, promoveram maior espessura na camada externa da gota e uma interface mais estável. Assim ocorreu menos coalescência e houve diminuição no tamanho de gota para alguns conjugados após a reação de Maillard.

Tabela 4.3: Diâmetro médio de gota (D_{43}) das emulsões estudadas.

		D_{43} (μm)		
		Razão		
	Horas (h)	0,3	0,6	1,2
pH 7	0	4,99 \pm 0,20 ^{Aa}	2,92 \pm 0,92 ^{Ba}	3,13 \pm 0,36 ^{Ba}
	24	12,53 \pm 1,31 ^{Ab}	13,53 \pm 0,30 ^{Ab}	20,71 \pm 0,01 ^{Bb}
	48	35,02 \pm 1,60 ^{Ac}	69,96 \pm 4,82 ^{Bc}	77,10 \pm 4,36 ^{Bc}
	72	40,32 \pm 1,72 ^{Ad}	41,66 \pm 10,64 ^{Ad}	151,63 \pm 29,48 ^{Bd}
	96	40,76 \pm 0,57 ^{Ad}	121,06 \pm 21,5 ^{Be}	183,71 \pm 18,38 ^{Ce}
	pH 3,5	0	43,95 \pm 0,64 ^{Aa}	51,20 \pm 2,45 ^{Ba}
24		21,05 \pm 0,22 ^{Ab}	22,99 \pm 1,53 ^{Ab}	33,36 \pm 2,51 ^{Bb}
48		27,09 \pm 1,40 ^{Ac}	77,60 \pm 5,13 ^{Bc}	47,40 \pm 0,37 ^{Cc}
72		25,69 \pm 2,85 ^{Ac}	100,19 \pm 4,91 ^{Bd}	49,74 \pm 2,46 ^{Cc}
96		26,01 \pm 1,21 ^{Ac}	114,52 \pm 8,92 ^{Be}	36,34 \pm 1,62 ^{Ad}

Letras diferentes indicam diferenças significativas a $p < 0,05$. Letras maiúsculas: diferenças entre os valores das razões proteína - polissacarídeo para mesmo pH e tempo de reação. Letras minúsculas: diferenças entre os valores dos tempos de reação para mesmo pH e razão proteína – polissacarídeo.

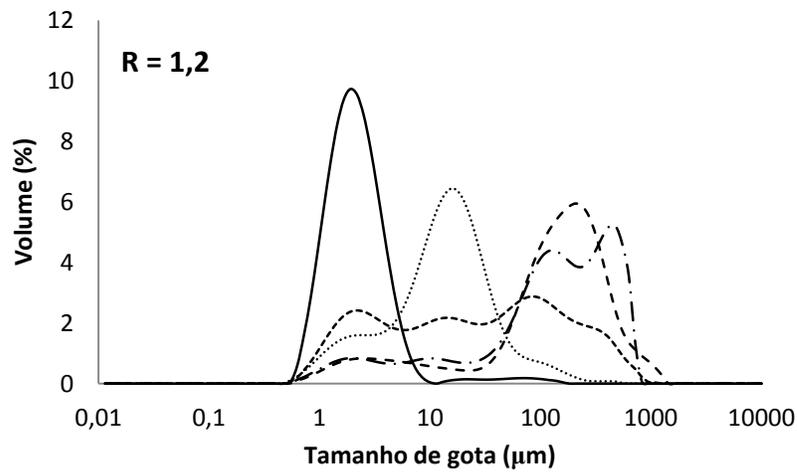
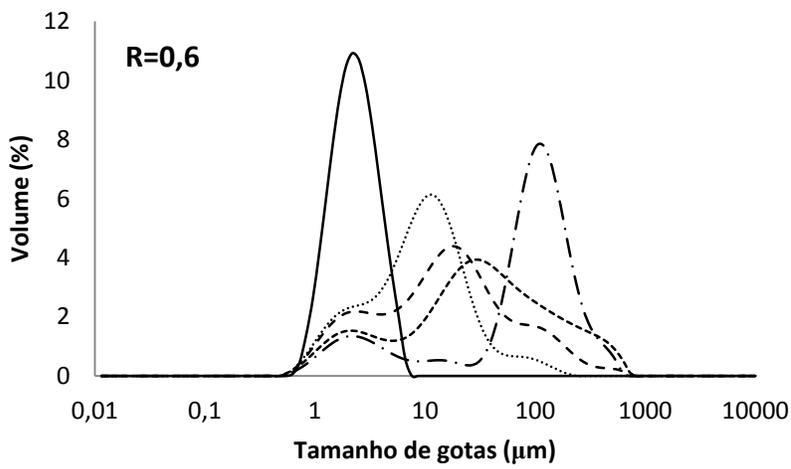
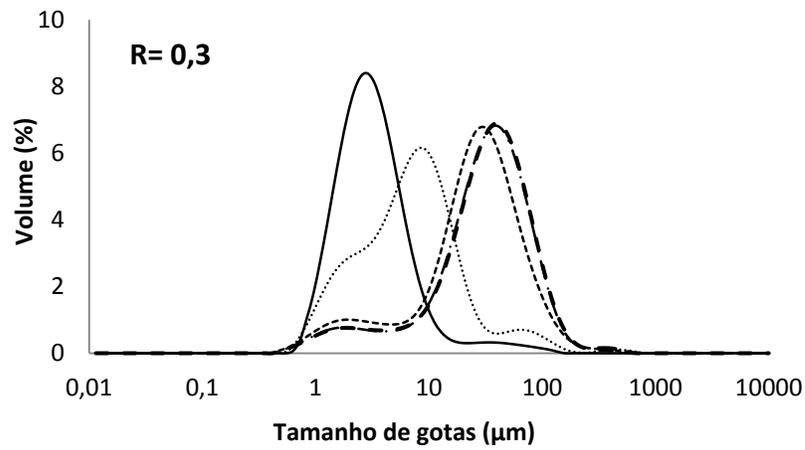


Figura 4.11: Distribuição do tamanho de gota para emulsões com 2% de mistura/conjugado em pH 7 nos tempos: (—) 0 h; (····) 24 h; (---) 48 h; (- - -) 72 h e (— · —) 96 h.

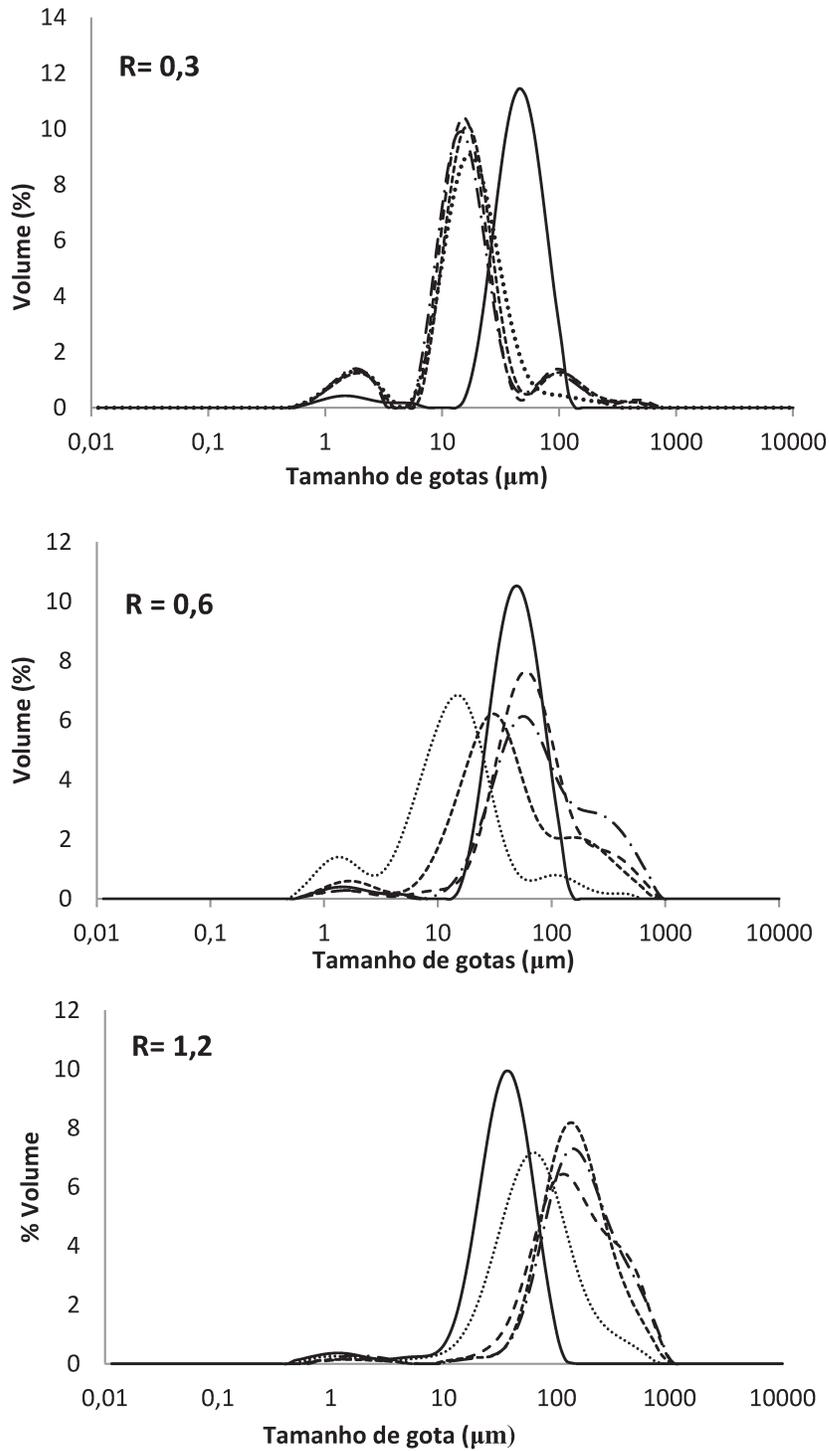


Figura 4.12: Distribuição do tamanho de gota para emulsões com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 nos tempos: (—) 0 h; (····) 24 h; (---) 48 h; (- - -) 72 h e (- · -) 96 h.

As microscopias das emulsões em pH 7 mostram que com conjugados formados após 24 h de reação, quando as emulsões estavam altamente estáveis, as gotas eram menores e aumentaram com conjugados formados a partir de 48 horas de reação. Neste pH, em todas as razões confirmou-se então a ocorrência de coalescência nas emulsões com conjugados formados em horas mais avançadas de reação (Figuras 4.13; 4.14 e 4.15).

Observando – se as imagens de microscopia das emulsões a pH 3,5 apresentadas nas Figuras 4.16, 4.17, e 4.18, pode-se confirmar que as gotas foram maiores no pH 3,5 que em pH 7 no geral, principalmente para tempos menores de reação, e a diferença entre as razões foi mais pronunciada. As emulsões compostas pelos conjugados no pH 3,5 e razão 0,3 apresentaram gotas menos polidispersas quando comparadas à razão 0,6 (Figura 4.12). A menor polidispersão pode ser justificada pela maior quantidade de polissacarídeo na razão 0,3 ter gerado maior viscosidade da fase contínua e maior estabilidade estérica. Ainda no pH 3,5, a razão 1,2 apresentou tamanhos de gotas maiores e pouco homogêneos. Em horas mais avançadas da reação, praticamente não haviam gotas emulsionadas, pois as emulsões foram muito instáveis e encontravam-se totalmente desestruturadas (Figura 4.18).

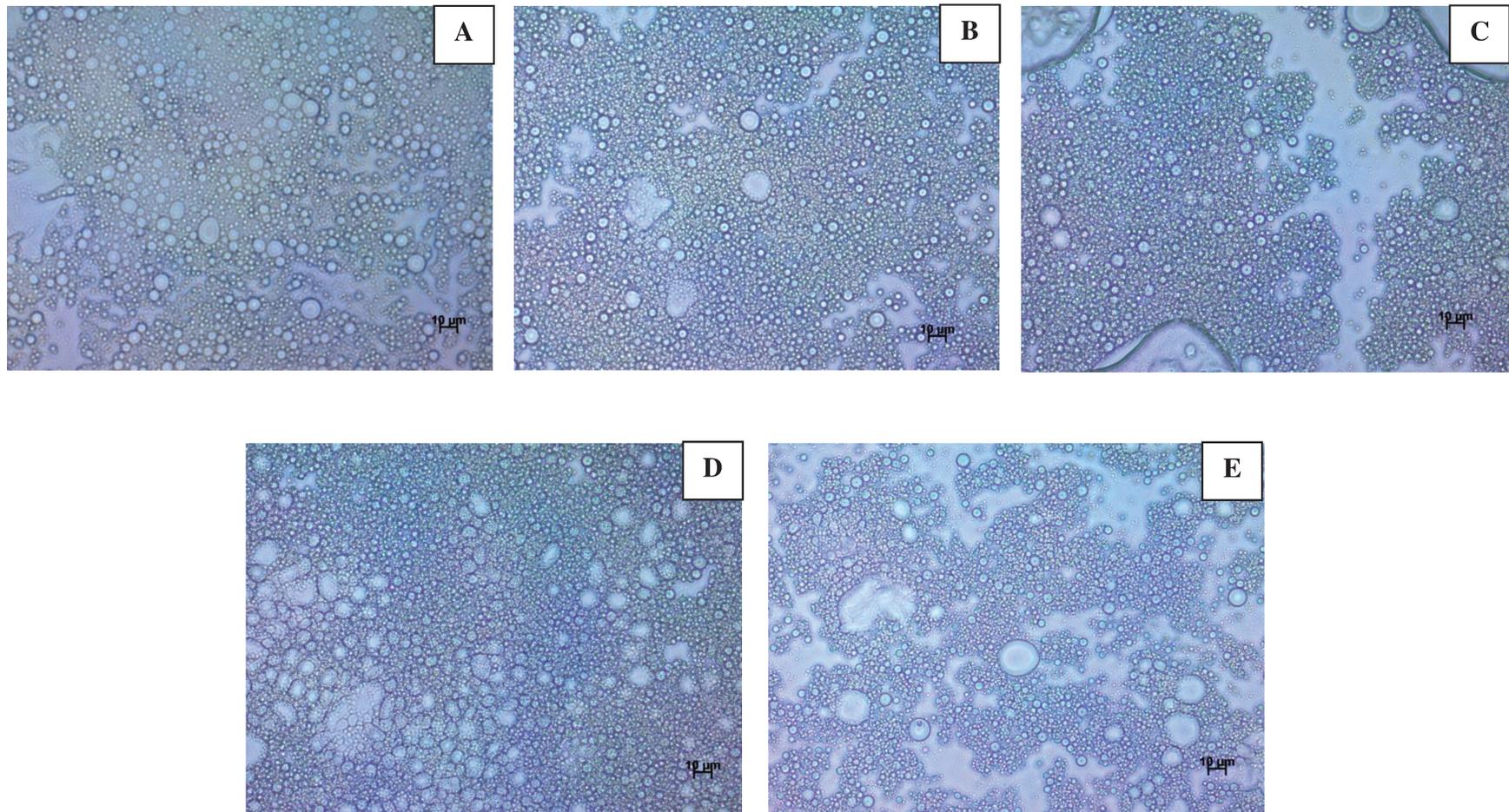


Figura 4.13: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 7 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,3 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h ; (D) 72 h e (E) 96 h.

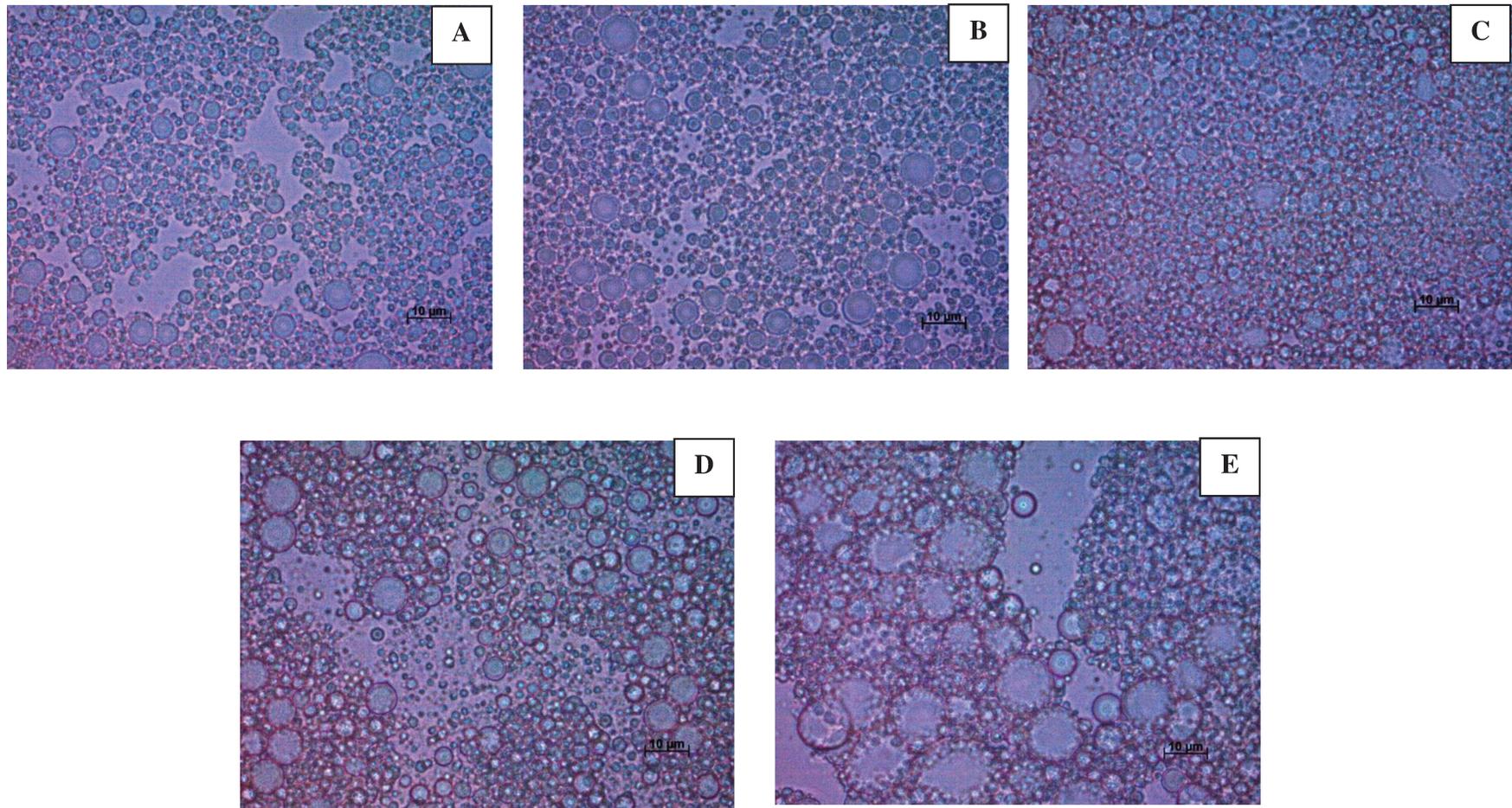


Figura 4.14: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 7 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,6 nos tempos de reação de (A) 0 h (com escala diferente); (B) 24 h; (C) 48 h ; (D) 72 h e (E) 96 h.

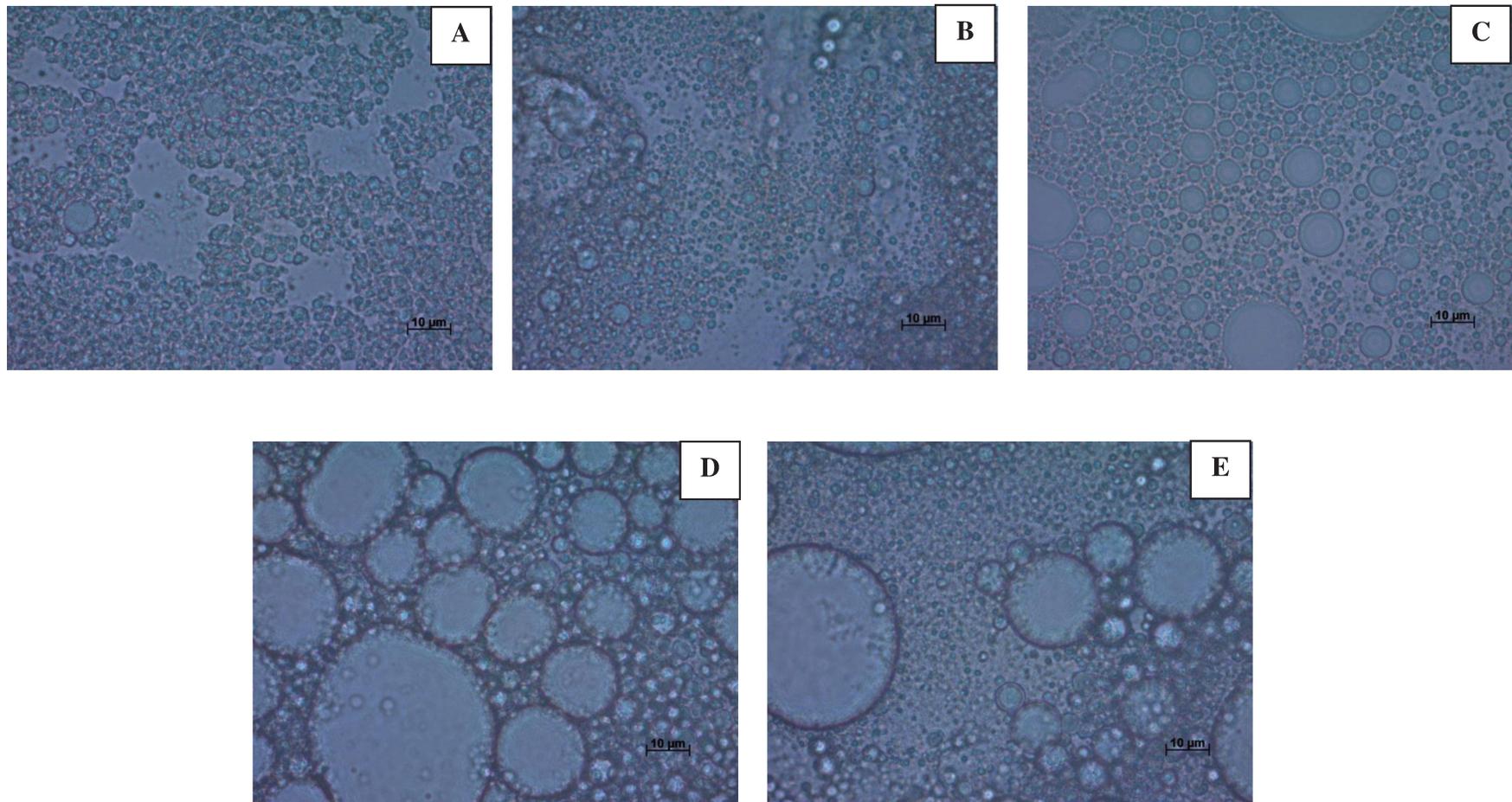


Figura 4.15: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 7 e razão de proteína/polissacarídeo = 1,2 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h ; (D) 72 h e (E) 96 h.

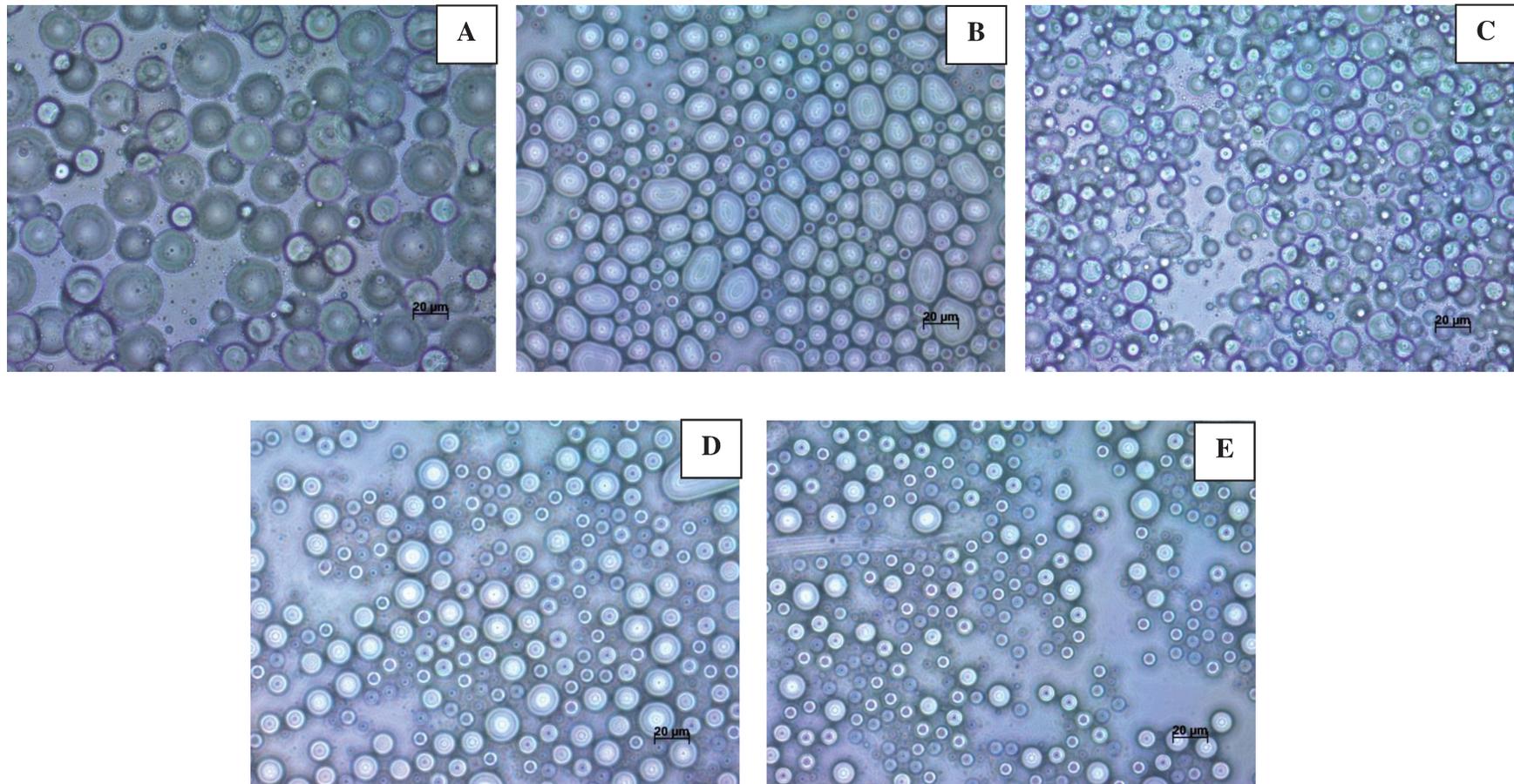


Figura 4.16: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,3 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h ; (D) 72 h e (E) 96 h.

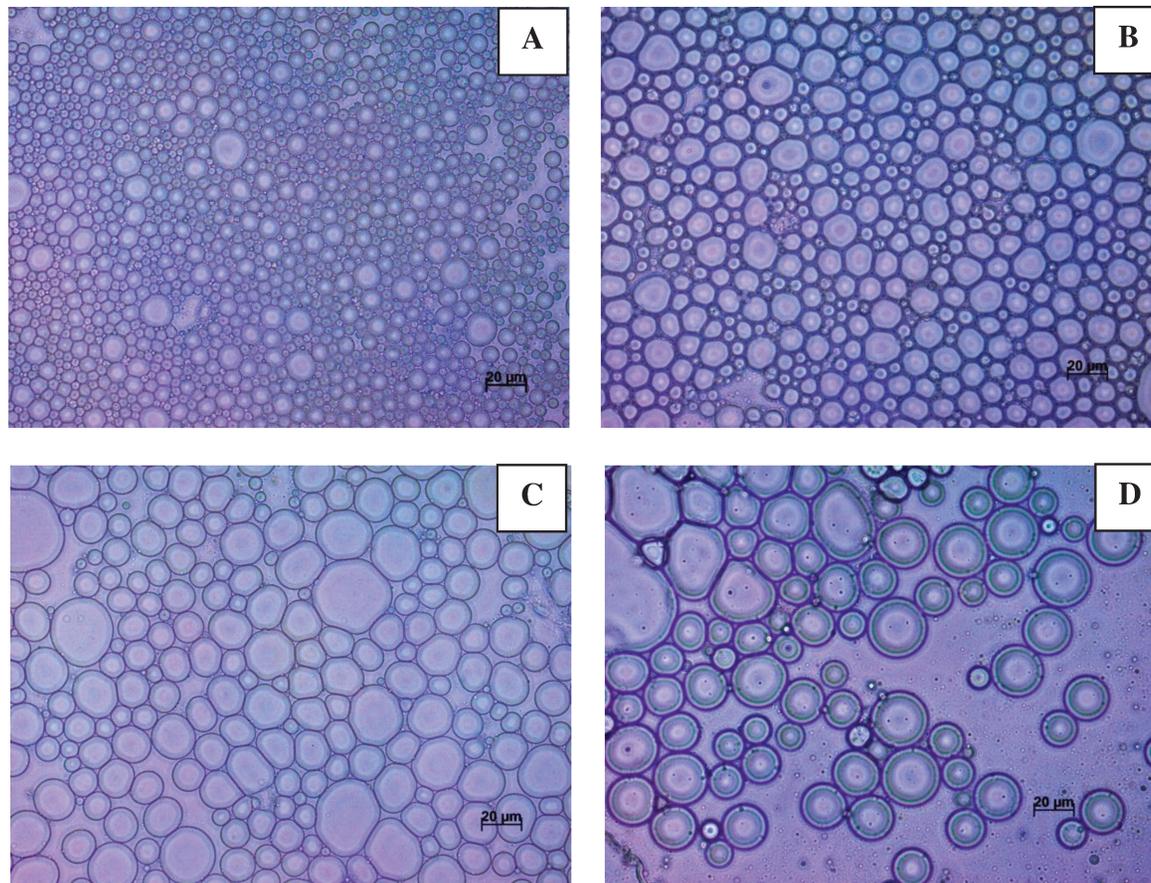


Figura 4.17: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 0,6 nos tempos de reação de (A) 24 h; (B) 48 h ; (C) 72 h e (D) 96 h.

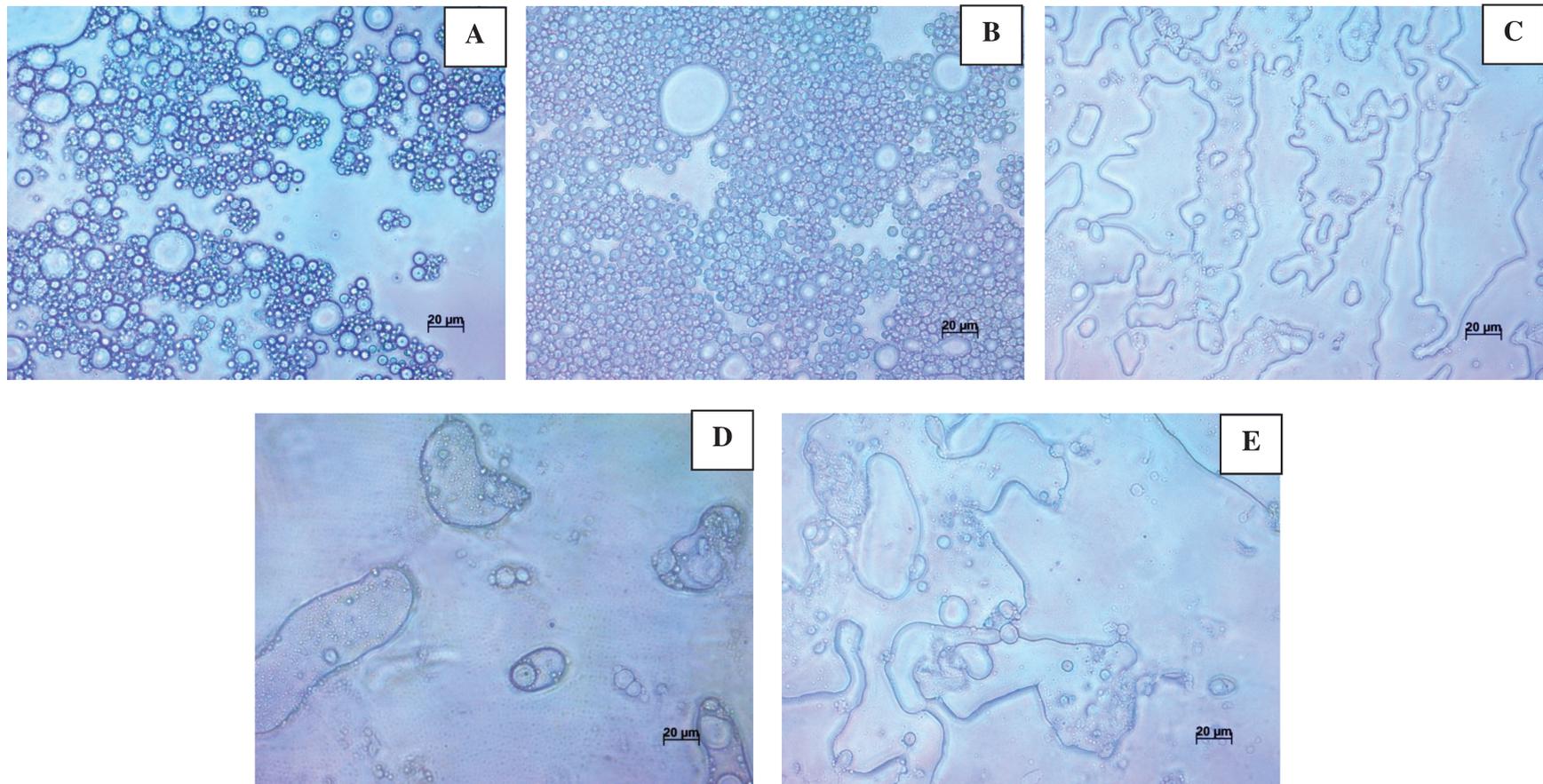


Figura 4.18: Microscopias das emulsões O/A com 2% de mistura/conjugado em pH 3,5 e razão de proteína/polissacarídeo = 1,2 nos tempos de reação de (A) 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h ; (D) 72 h e (E) 96 h.

Xu *et al.*, (2012) observaram comportamento semelhante no tamanho de gotas em emulsões produzidas com conjugados de proteínas do leite e pectina de beterraba em pH 7. Eles observaram que para tempos mais avançados de reação, o tamanho de gota aumentou. Além disso, observaram que os conjugados com maior quantidade de pectina aumentaram a viscosidade das emulsões e melhoraram sua estabilidade.

Conjugados produzidos por proteína do leite e goma de fibra de milho foram usados em emulsões em pH ácido (3,2) e promoveram diminuição do tamanho das gotas devido a afinidade hidrofóbica da proteína ancorada à interface do óleo e da afinidade hidrofílica da longa cadeia de polissacarídeo no meio aquoso (YADAV *et al.*, 2010).

4.2.3 Microscopia Confocal

A Figura 4.19 mostra as imagens obtidas por microscopia confocal das emulsões preparadas com caseinato de sódio puro e as misturas controle e conjugados produzidos em 24 h de reação nas razões 0,3 e 1,2 em pH 7. Nas imagens, a cor vermelha representa o caseinato de sódio. É possível observar a coloração ao redor das gotas nas emulsões, confirmando a presença da proteína na interface entre o óleo e água. Nas emulsões com caseinato de sódio puro, (Figura 4.19), o excesso de proteína ficou homogêneamente distribuído pela fase contínua da emulsão.

No entanto, com adição da goma jataí, a distribuição de proteína deixa de ser homogênea, causando a flocculação e coalescência das gotas (Figuras 4.19 B e C), principalmente com a maior concentração de goma (razão 0,3). Com a reação de Maillard entre a proteína e o polissacarídeo, observa-se que a distribuição da proteína na emulsão volta a ser homogênea (Figura 4.19 D e E), evitando a flocculação das gotas e, conseqüentemente, aumentando a estabilidade das emulsões.

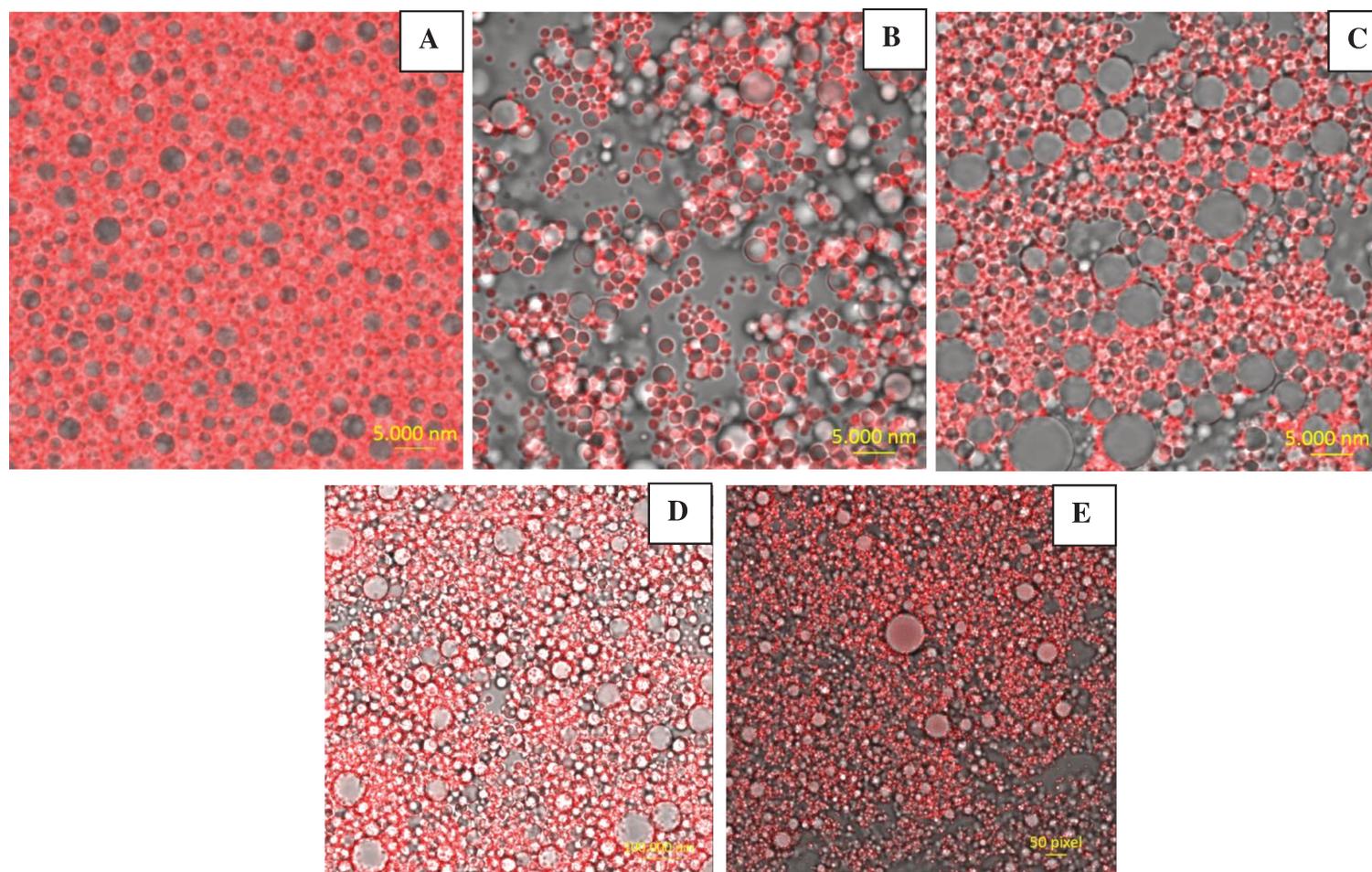


Figura 4.19: Microscopia confocal das emulsões compostas por (A) Caseinato de sódio puro; (B) misturas de caseinato de sódio e goma jataí em pH 7 e razão 0,3 e (C) misturas de caseinato de sódio e goma jataí em pH 7 e razão 1,2; (D) conjugados formados após 24 horas de reação em pH 7 e razão 0,3 e (E) conjugados formados após 24 horas de reação em pH 7 e razão 1,2.

4.2.4 Potencial zeta das emulsões

Para investigar melhor o comportamento dos conjugados nas emulsões foi feita a análise do potencial zeta das emulsões nos valores de pH 7 e 3,5. Os valores foram então correlacionados com o potencial zeta dos conjugados em solução aquosa, bem como com o tamanho de gota das emulsões.

A Figura 4.20 mostra os valores do potencial zeta para todas as emulsões estudadas. O comportamento do potencial zeta das emulsões em um mesmo valor de pH pouco se alterou quando foram variadas as razões. Pode-se observar que em pH 3,5 os valores permaneceram perto de zero para todas os tempos de reação, enquanto em pH 7 para a mistura controle (0h) o potencial zeta atingiu valor negativo elevado. Neste caso, a proteína não estava ligada ao polissacarídeo, e por estar a $\text{pH} > \text{pI}$ ficou carregada negativamente. Com a reação de Maillard, o conjugado apresentou ainda carga negativa, mas em menor intensidade. Quando se relaciona os valores do potencial zeta das soluções de conjugados e das emulsões nos valores de pH estudados, observa-se a semelhança de comportamento. Para todas as soluções de conjugados e misturas o potencial zeta atingiu valores negativos consideráveis em pH 7 e próximos de zero em pH 3,5. Este mesmo comportamento foi observado para as emulsões nas mesmas condições.

Os valores do potencial zeta das emulsões também ajudaram a compreender a distribuição do tamanho de gota das emulsões em alguns casos. As emulsões compostas pelas misturas controle em pH 7 apresentaram carga altamente negativa que foi responsável pela repulsão eletrostática e resultaram em tamanhos de gotas menores e mais homogêneos. Com a formação dos conjugados, a carga negativa foi reduzida a um valor entre 0 e -5 mV, diminuindo a repulsão eletrostática e, assim, resultando na

coalescência das gotas. Em pH 3,5 as gotas da misturas controle apresentaram tamanho de gotas maiores que em pH 7 devido à neutralidade das cargas superficiais.

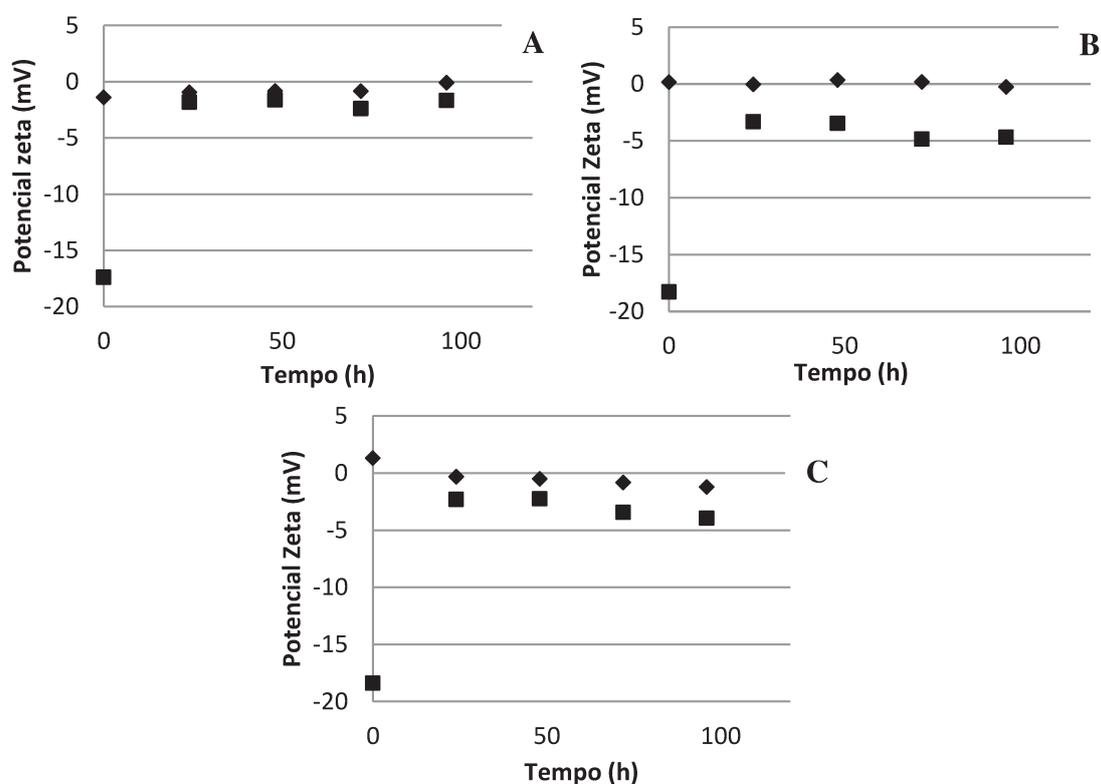


Figura 4.20: Potencial zeta das emulsões nos diferentes tempos de reação de Maillard em (♦) pH 3,5 e (■) pH 7, (A) Razão proteína/polissacarídeo = 0,3; (B) 0,6 e (C) 1,2.

No contexto da estabilidade de emulsões formadas por conjugados de proteína-polissacarídeo em pH ácido, tem-se sugerido que além da melhor solubilidade da proteína em pH distante do pI, a espessura da camada de carboidrato na interface fornece estabilização por repulsão estérica das gotas. A dextrana conjugada com proteína do trigo em pH 7 foi capaz de estabilizar emulsões através de uma camada carregada negativamente na interface O/A. Já com a redução gradual do pH, o potencial zeta atingiu valor zero em pH 4, e excluindo a possibilidade de repulsão eletrostática, a estabilidade foi atribuída ao efeito estérico (WONG *et al.*, 2011).

4.2.5 Reologia

O estudo da reologia auxilia no entendimento mais aprofundado das estruturas e das interações dos componentes básicos dos alimentos como proteínas, carboidratos e gorduras, e pode ajudar a compreender melhor o comportamento das emulsões durante um processo. As propriedades reológicas foram analisadas para adquirir parâmetros que ajudam a caracterizar a estabilidade, textura e resposta à deformação das emulsões (MCCLEMENTS, 2005). Dessa forma, verificou-se como o pH, o conteúdo de proteína e polissacarídeo e o tempo de reação de Maillard afetaram a reologia das emulsões.

As emulsões foram submetidas a três rampas de taxa de deformação para observar o comportamento reológico dos fluidos com relação ao tempo de cisalhamento. A maioria das emulsões apresentaram pouca ou nenhuma dependência do tempo, exceto as preparadas em pH 3,5 e com a razão 1,2, que tiveram comportamento tixotrópico para todas as horas de reação. Pode-se observar a diminuição da tensão com o tempo cisalhamento, tanto para emulsões com a mistura controle (0 h) (Figura 4.21) quanto para emulsões com conjugado formado após 24 horas de reação (Figura 4.22). Ao mesmo tempo, verifica-se que não houve dependência do tempo para a razão 0,3 neste mesmo pH (Figuras 4.21 A e 4.22 A). É possível inferir que as emulsões com maior quantidade de proteína (razão 1,2) foram mais susceptíveis ao pH 3,5, devido à proximidade ao seu ponto isoelétrico, como discutido anteriormente. Nessa condição, as emulsões preparadas com conjugados com 72 e 96 horas de reação apresentaram alta instabilidade, com um aspecto mais instável e frágil (trincas) que as emulsões com maior quantidade de polissacarídeo (razão 0,3), e uma estrutura que se modificou com a aplicação de forças de cisalhamento. Na razão 0,3 a baixa concentração de proteína não afetou a estabilidade e a estrutura das emulsões, não apresentando comportamento dependente do tempo.

Em pH 7, as emulsões apresentaram comportamento independente do tempo para as razões 0,3 e 0,6, enquanto que para 72 e 96 horas na razão 1,2 foi observada tixotropia. Neste caso, apesar da maior estabilidade dessas emulsões neste pH, certamente foram formados compostos indesejáveis provenientes de estágios avançados da reação de Maillard com menor atividade emulsificante, resultando em uma estrutura mais frágil.

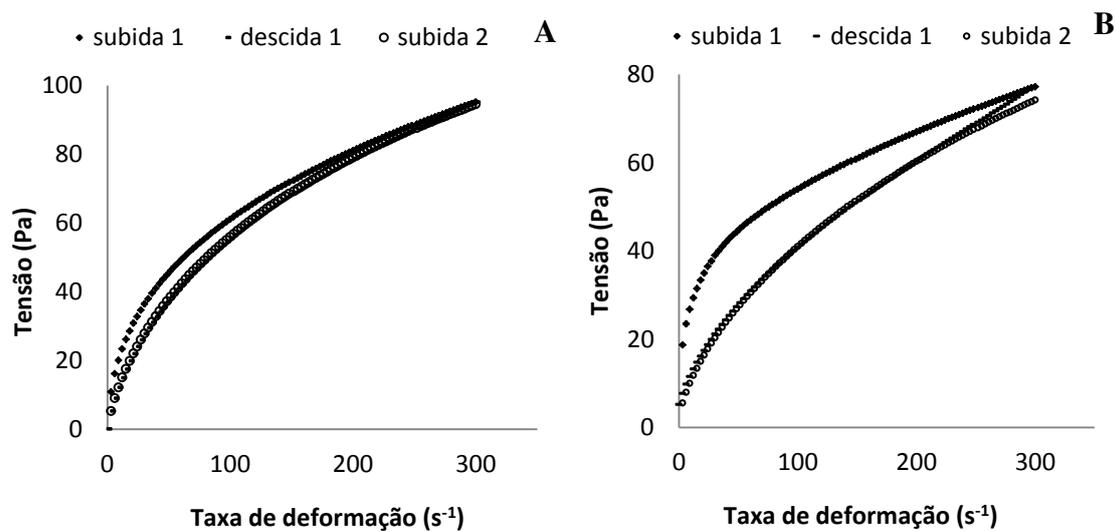


Figura 4.21: Curvas de escoamento das emulsões compostas por misturas controle (0h) em pH 3,5 para avaliação da dependência com o tempo de cisalhamento. Razões de proteína/polissacarídeo: (A) 0,3 e (B) 1,2.

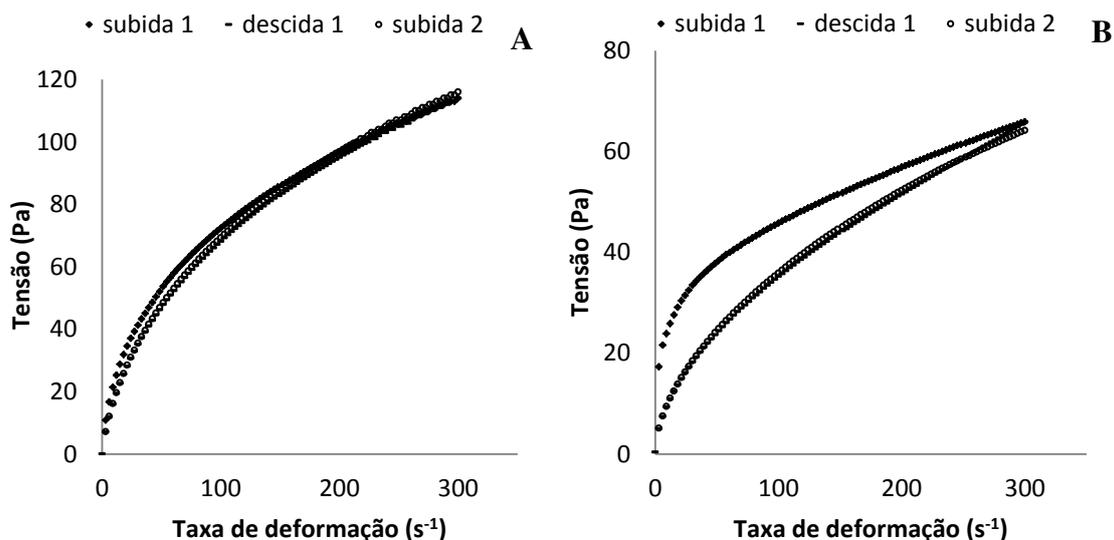


Figura 4.22: Curvas de escoamento das emulsões compostas por conjugados formados após 24 horas de reação em pH 3,5 para avaliação da dependência com o tempo de cisalhamento. Razões de proteína/polissacarídeo: (A) 0,3 e (B) 1,2.

Todas as emulsões cineticamente estáveis por 7 dias de estocagem bem como a fase superior (creme) das emulsões instáveis tiveram o comportamento reológico avaliado em estado estacionário. O modelo da Lei da Potência foi utilizado no ajuste das curvas de escoamento relativas à subida 2, com coeficiente de determinação maior que 0,99 para todas as amostras. Nas Tabelas 4.4 e 4.5 estão apresentados os índices de consistência (k), de comportamento (n) e viscosidade aparente a uma taxa de deformação de 100 s^{-1} (η_{100}). Observa-se que todas as emulsões e fase creme tiveram o índice de comportamento entre 0,40 e 0,62, sendo, portanto classificadas como fluidos pseudoplásticos. É interessante ressaltar que em cada pH, o valor de n foi sempre menor para a razão 0,3; caracterizando emulsões mais pseudoplásticas devido à maior quantidade de goma jataí.

As emulsões preparadas com conjugados em pH 7 tiveram valores de índice de consistência (k) maiores que em pH 3,5 para todas as razões estudadas. Em pH neutro, as emulsões se mostraram mais estruturadas e não separaram de fase por estarem em pH

mais distante do ponto isoelétrico. Além disso, para a razão de 0,3 essa diferença foi mais pronunciada devido à maior quantidade de polissacarídeo presente nas emulsões. Todavia, nesta razão não houve diferença significativa entre amostras controle nos diferentes valores de pH nem em relação às horas iniciais de reação. Por outro lado, nas razões 0,6 e 1,2 o índice de consistência das amostras controle foi menor em pH 7 que pH 3,5 e apresentou diferença entre a mistura controle e os conjugados, evidenciando efeito da reação de Maillard nas propriedades reológicas das emulsões.

Os valores da viscosidade aparente a altas taxas de deformação (η_{100}) permitiu uma melhor avaliação das diferenças causadas pela variação do pH e razão proteína/polissacarídeo. Para todos os tratamentos estudados, comparando-se as razões em um mesmo pH, a viscosidade aparente foi maior para emulsões onde a goma jataí estava presente majoritariamente (razão 0,3). Este comportamento foi observado para todos os tempos de reação em pH 7 e pH 3,5. Houve diferença na viscosidade aparente também quando se compararam os diferentes valores de pH, uma vez que o efeito da goma jataí foi bem mais pronunciado em pH neutro. Deve-se ainda considerar que em pH 7 a proteína encontra-se solúvel e supostamente melhor organizada na interface, e por isso complementa o efeito do polissacarídeo. A longa cadeia deste polissacarídeo certamente proporcionou um aumento na espessura da camada interfacial e aumentou a viscosidade da fase aquosa. Assim, as condições de pH neutro e maior quantidade de goma jataí proporcionaram emulsões mais viscosas e estruturadas.

Na razão 0,3 para todas as horas de reação, o valor de η_{100} foi menor em pH 3,5. Neste pH, para as emulsões compostas por conjugados formados após 96 horas e razão 1,2 que separaram de fase, o aumento da viscosidade da em relação a razão 0,6 se deve principalmente ao mecanismo de floculação tendo em vista que foi analisada a fase creme (emulsão mais concentrada).

Tabela 4.4: Efeito da razão proteína/polissacarídeo e pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas com as misturas controle ou os conjugados obtidos após 24 e 48 horas de reação de Maillard.

pH	Razão	Controle			24 horas			48 horas		
		k (Pa.s ⁿ)	n	η_{100} (Pa.s)	k (Pa.s ⁿ)	n	η_{100} (Pa.s)	k (Pa.s ⁿ)	n	η_{100} (Pa.s)
3,5	0,3	5,14 ^{Aaa}	0,50 ^{Aaa}	0,51 ^{Aaa}	5,39 ^{Aaa}	0,51 ^{Aaa}	0,56 ^{Aab}	5,38 ^{Aaa}	0,51 ^{Aaa}	0,56 ^{Aab}
	0,6	3,35* ^{Baa}	0,54* ^{Baa}	0,41* ^{Baa}	1,92 ^{Bab}	0,61 ^{Bab}	0,31 ^{Bab}	1,45* ^{Bac}	0,62* ^{Bab}	0,25* ^{Bac}
	1,2	3,45* ^{Baa}	0,54* ^{Baa}	0,41* ^{Baa}	3,19 ^{Caa}	0,53 ^{Caa}	0,36 ^{Caa}	1,54 ^{Bab}	0,55 ^{Caa}	0,15 ^{Cab}
7	0,3	5,51 ^{Aaa}	0,48 ^{Ab_a}	0,51 ^{Aaa}	13,11 ^{Ab_b}	0,41 ^{Ab_b}	0,88 ^{Ab_b}	17,31 ^{Ab_c}	0,40 ^{Ab_c}	1,25 ^{Ab_c}
	0,6	2,14 ^{Bba}	0,57 ^{Bba}	0,30 ^{Bba}	6,37 ^{Bbb}	0,50 ^{Bbb}	0,62 ^{Bbb}	4,49 ^{Bbc}	0,54 ^{Bba}	0,53 ^{Bbc}
	1,2	1,23* ^{Cba}	0,59* ^{Cba}	0,19* ^{Cba}	5,23 ^{Cbb}	0,49 ^{Bbb}	0,49 ^{Cbb}	2,61 ^{Cbc}	0,57 ^{Cac}	0,35 ^{Bbc}

Letras diferentes indicam diferenças significativas a $p < 0,05$. Letras maiúsculas: diferenças entre os valores das razões de proteína/polissacarídeo em mesmo pH. Letras minúsculas: diferenças entre os valores de pH em uma mesma razão de biopolímeros. Letras minúsculas sublinhadas: diferenças entre os valores das horas de reação em um mesmo pH e mesma razão (*) Valores obtidos da fase creme.

Tabela 4.5: Efeito da razão proteína/polissacarídeo e pH nos parâmetros reológicos ajustados ao modelo Lei da Potência das emulsões estabilizadas pelos conjugados obtidos após 72 e 96 horas de reação de Maillard.

pH	Razão	72 horas			96 horas		
		k (Pa.s ⁿ)	n	η_{100} (Pa.s)	k (Pa.s ⁿ)	n	η_{100} (Pa.s)
3,5	0,3	4,10 ^{Aab}	0,54 ^{Aab}	0,49 ^{Aaa}	3,74 ^{Aab}	0,55 ^{Aab}	0,48 ^{Aaa}
	0,6	1,70 ^{Bacb}	0,59 ^{Bac}	0,28 ^{Bacb}	1,79* ^{Bacb}	0,56* ^{Aad}	0,24* ^{Bac}
	1,2	1,82* ^{Bab}	0,51* ^{Ca}	0,20* ^{Cab}	2,5* ^{ABaa}	0,52* ^{Aaa}	0,32* ^{Caab}
7	0,3	14,76 ^{Abd}	0,41 ^{Abb}	0,98 ^{Abb}	15,96 ^{Abd}	0,41 ^{Abb}	1,07 ^{Abcb}
	0,6	4,91 ^{Bbc}	0,54 ^{Baa}	0,56 ^{Bbd}	4,96 ^{Bbc}	0,52 ^{Baa}	0,55 ^{Bbcd}
	1,2	3,09 ^{Cbc}	0,56 ^{Bbc}	0,41 ^{Cbc}	2,56 ^{Cac}	0,58 ^{Baca}	0,37 ^{Cac}

Letras diferentes indicam diferenças significativas a $p < 0,05$. Letras maiúsculas: diferenças entre os valores das razões de proteína/polissacarídeo em mesmo pH. Letras minúsculas: diferenças entre os valores de pH em uma mesma razão de biopolímeros. Letras minúsculas sublinhadas: diferenças entre os valores das horas de reação em um mesmo pH e mesma razão. (*) Valores obtidos da fase creme.

Perrechil *et al.*, (2009) estudaram soluções de caseinato de sódio e goma jataí com adição de glucona delta lactona, e verificaram que em sistemas de uma única fase, o aumento da concentração do polissacarídeo (1,3% m/v) resultou em aumento da viscosidade aparente para uma concentração fixa de proteína (0,5% m/v). Além disso, observaram também menores valores de índice de comportamento (n) em soluções com maior conteúdo de goma jataí, caracterizando maior pseudoplasticidade. Assim, confirma-se o efeito do polissacarídeo na viscosidade aparente das emulsões e classificação destes fluidos como pseudoplásticos.

Para quase todas as emulsões estudadas, as medidas reológicas dinâmicas apresentaram comportamentos semelhantes, em que o módulo de armazenamento ou elástico (G') foi maior que o módulo de dissipação ou viscoso (G'') em função da frequência. A predominância do G' caracteriza sistemas mais estruturados. A Figura 4.23 apresenta as medidas reológicas de emulsões em pH 3,5 e razão proteína/polissacarídeo = 0,3. Nessas condições, para maiores tempos de reação (72 e 96 horas) observou-se que os valores dos módulos permaneceram semelhantes entre si ao longo do aumento da frequência, o que caracteriza um gel fraco. As curvas de G' e G'' em função da frequência das demais amostras estão apresentados no Apêndice. As emulsões em pH 3,5 e razão 1,2 apresentaram valores de G' maiores que G'' mesmo nos maiores tempos de reação quando as emulsões apresentaram estrutura frágil e o índice de separação de fases foi alto. Isso pode ser explicado pelo uso de fase creme nas análises reológicas que tinha maior concentração de óleo.

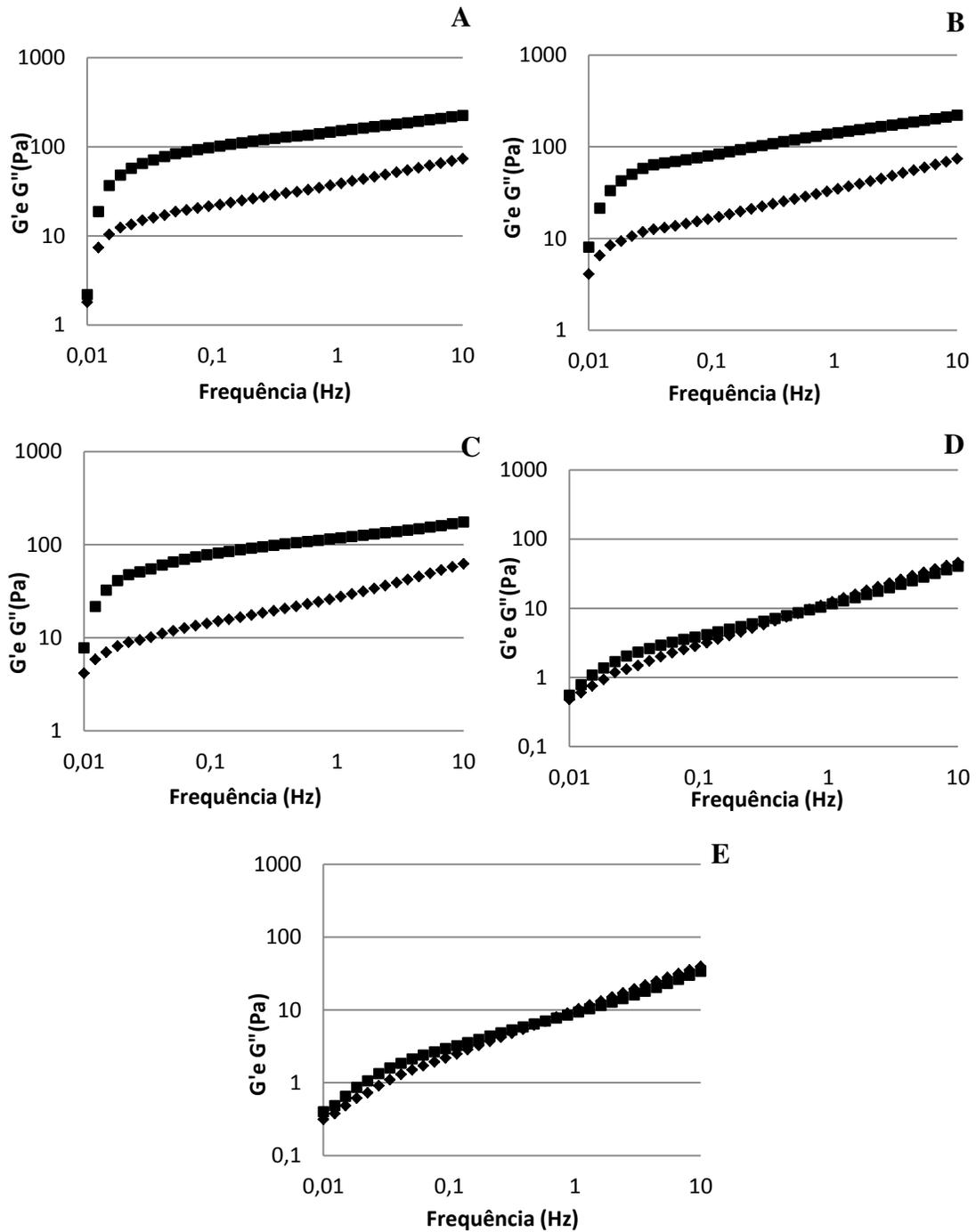


Figura 4.23: Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsões estabilizadas em pH 3,5 e razão 0,3. Módulo elástico G' (■) e módulo viscoso G'' (◆). Tempos de reação (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h e (E) 96h.

Os valores do módulo complexo (G^*) também foram avaliados e mostraram-se dependentes da frequência na maioria das emulsões estudadas, revelando estruturas menos estáveis em relação ao tempo de observação. A Figura 4.24 apresenta o comportamento das amostras em relação ao módulo complexo para os vários tempos de reação em determinado pH e razão proteína/polissacarídeo. Em pH 7, para todas as razões e tempos de reação, o módulo complexo apresentou leve aumento com o aumento da frequência. Para as razões 0,3 e 0,6, os maiores valores de G^* ocorreram com complexos obtidos em 24 horas de reação, demonstrando comportamento mais estruturado em relação aos tempos mais avançados. Além disso, os valores do módulo complexo em pH 7 foram superiores aos valores do pH 3,5 na maioria condições. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que em pH neutro as soluções foram mais estáveis devido à repulsão eletrostática das proteínas juntamente com a repulsão estérica proporcionada pelos polissacarídeos, que conferiu caráter de soluções mais estruturadas.

Em pH 3,5, as emulsões com maior conteúdo de proteína (razão 1,2) apresentaram pouca dependência da frequência. Apesar das emulsões produzidas com conjugados de 72 e 96 horas terem sido muito instáveis nesta razão e pH, a fase superior não apresentou valores muito baixos de G^* , provavelmente por estar com maior concentração de óleo e, provavelmente de conjugados. Ao contrário destas, para as demais razões o G^* aumentou com o aumento da frequência, porém com comportamentos diferentes. Na razão 0,3 para 0, 24, e 48 horas de reação, os maiores valores de G^* ocorreram principalmente devido aos valores de G' , que foram superiores aos de G'' e caracterizaram emulsões mais consistentes. Já para 72 e 96 horas de reação, os módulos elástico e viscoso tiveram comportamentos

semelhantes e, as amostras foram caracterizadas como mais frágeis devido à forte variação do módulo complexo com a frequência.

Estudos feitos com emulsões estabilizadas por caseinato de sódio com adição de diferentes quantidades de goma jataí apresentaram também separação de fases para baixas concentrações de polissacarídeos em valores de pH 5 e 3,7. Porém, o módulo complexo da fase creme não apresentou valor baixo devido ao seu comportamento viscoelástico que foi atribuído à aglomeração das gotas da fase mais rica em óleo. Outro resultado semelhante foi a maior dependência da frequência em sistemas que não apresentaram separação de fases (PERRECHIL e CUNHA, 2010).

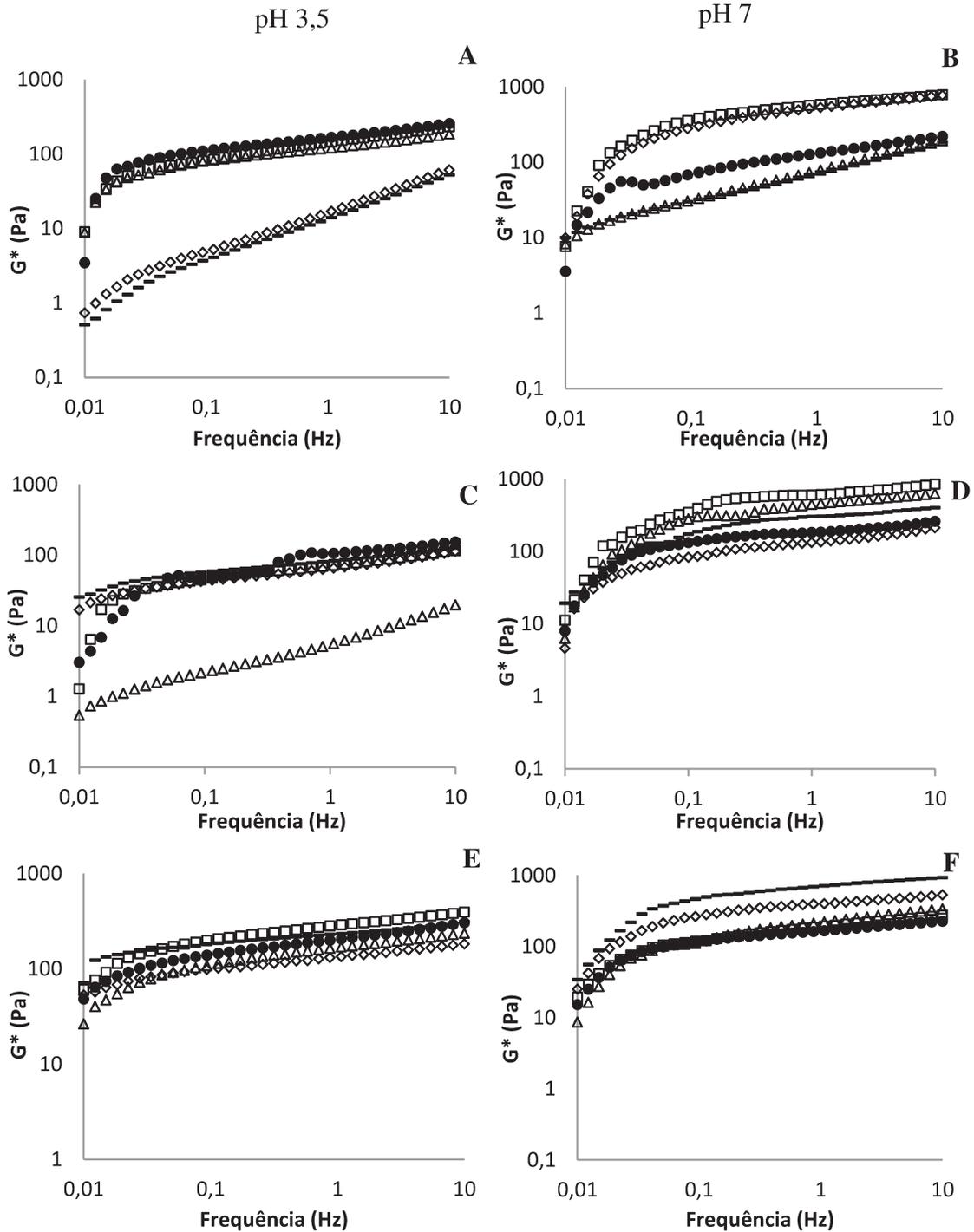


Figura 4.24: Módulo complexo (G^*) das emulsões estabilizadas por misturas controle (●) e conjugados formados após reação de 24 h (□), 48 (Δ), 72h (◇) e 96 h (▽). Nas condições de (A) pH 3,5 e razão 0,3; (B) pH 7 e razão 0,3; (C) pH 3,5 e razão 0,6; (D) pH 7 e razão 0,6; (E) pH 3,5 e razão 1,2 e (F) pH 7 e razão 1,2.

4.2.6 Tensiometria e Reologia interfacial

Com o objetivo de estudar a estabilidade as propriedades reológicas da interface, foram analisadas a tensão interfacial dinâmica e o módulo complexo dilatacional das interfaces óleo – água dos sistemas equivalentes a algumas emulsões que foram estáveis em pH 7. Foram estudadas as interfaces do óleo de soja com a solução de biopolímeros em todas as razões proteína-polissacarídeo nos tempos de 0 h (controle) e 24 h de reação de Maillard.

Na Figura 4.25 observa-se a tensão na interface entre óleo e as soluções com conjugados formados após 24 horas de reação de Maillard e suas respectivas misturas controle. Ao se comparar o comportamento da tensão interfacial dos conjugados formados e misturas com o caseinato de sódio puro, observa-se que para todas as razões estudadas os conjugados foram capazes de diminuir a tensão na interface.

Comparando a evolução da tensão interfacial na razão 1,2, praticamente não se observa diferença entre o caseinato de sódio puro e a mistura, provavelmente porque a proteína na interface já atingiu a saturação nesta razão e mesmo em maior quantidade (caseinato puro) não sofreu alteração na tensão interfacial. No entanto, nota-se que o conjugado (24 h de reação) causou pequena diminuição da tensão interfacial, evidenciando um efeito sinérgico após a formação do complexo entre os dois biopolímeros. O efeito pode ser associado à ligação covalente formada entre o caseinato de sódio e goma jataí, pela atuação da proteína na interface ligada fortemente ao polissacarídeo altamente hidrofílico que, solúvel na fase aquosa, proporcionou aumento da espessura na interface. Além disso, o comportamento da tensão ao longo do tempo se manteve similar ao da proteína pura, com a redução lenta e contínua da tensão devido à conformação da proteína na interface. Segundo

Bouyer *et al.*, (2011), em baixas concentrações de proteína, a primeira molécula a alcançar a interface pode se adsorver completamente na interface e ocupar grande área superficial. Por outro lado, em altas concentrações, as proteínas podem fazer fortes interações laterais na interface, que provavelmente irá induzir a maior compactação da conformação proteica.

Na razão 0,6 a tensão interfacial do sistema com o conjugado pouco se alterou com relação à mistura controle, apresentando queda acentuada da tensão nos primeiros minutos seguida de rápida estabilização. Este comportamento é característico da interface com soluções de polissacarídeo. Comportamento similar foi observado na interface com a solução do conjugado à razão de 0,3. Porém, nesta razão, a tensão interfacial aumentou sua estabilidade com reação do biopolímero. Comparando-se o efeito das três razões na tensão interfacial, verifica-se que na razão 1,2 o conjugado (24 h) apresentou melhor efeito que a proteína livre (mistura controle) durante todo o tempo de observação, enquanto o conjugado formado com maior proporção de polissacarídeo (razão 0,3) apresentou redução da tensão interfacial apenas no início.

Garti e Reichman (1994) reportaram que as gomas guar e jataí apresentam limitada atividade de superfície, mas forte atividade interfacial devido à facilidade que possuem de se depositarem na interface. Assim, formam um filme sobre a gota de óleo e se reorganizam na superfície formando uma camada polimérica com fraca adsorção dos grupos na interface, mas forte estabilidade estérica. Com isso, como observado neste trabalho, a tensão interfacial decresce e se estabiliza rapidamente.

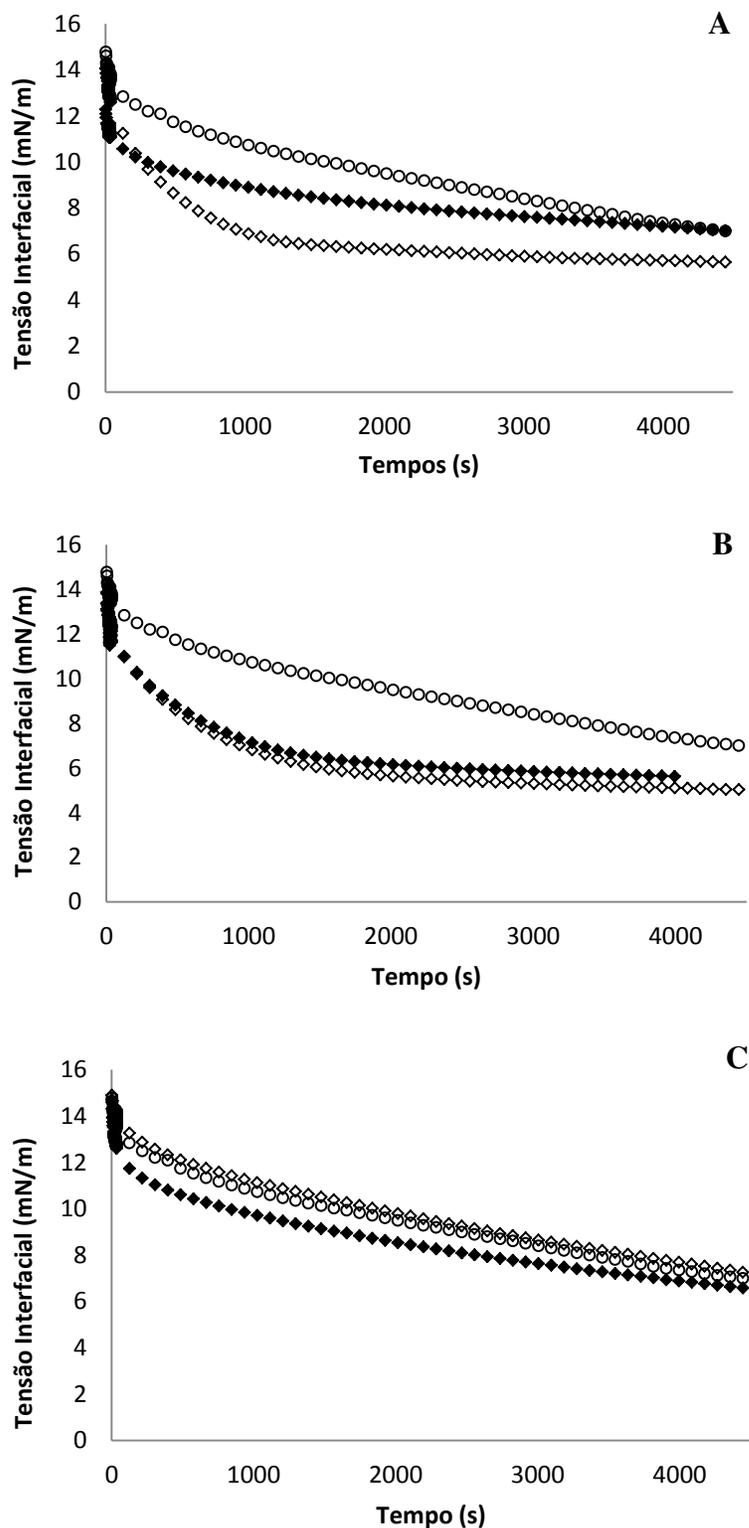


Figura 4.25: Tensão interfacial com o tempo, (A) Razão 0,3; (B) 0,6 e (C) 1,2, (○) Caseinato de sódio; (◇) mistura controle e (◆) conjugados formados após 24 horas de reação.

Os valores do módulo complexo de viscoelasticidade (E^*) mostraram diferenças entre os conjugados e misturas controle em uma mesma razão, bem como do caseinato de sódio (Figura 4.26). Na razão 0,3 o valor de E^* foi maior para o conjugado formado em 24 horas que para a mistura controle (Figura 4.26 A), e ambos os valores mantiveram estáveis com o tempo. Essa característica se atribui à boa estabilidade do filme entre as fases oleosa e aquosa, que é mais elástico e apresenta um comportamento mais estável a perturbações. Devido ao maior valor de E^* , a elasticidade da interface da gota das emulsões com conjugados é maior que da mistura controle. A complexação dos biopolímeros, portanto, levou a um aumento da resistência da interface. A presença da maior quantidade do polissacarídeo certamente proporcionou maior rigidez à parede interfacial devido a sua cadeia longa e conseqüentemente no aumento da espessura do filme. Assim como a goma jataí, a goma arábica quando utilizada junto à β -lactoglobulina em maiores concentrações também foi capaz de promover maior elasticidade e resistência na interface (BOUYER *et al.*, 2011).

À razão de 0,6, apesar de não apresentar altos valores de E^* , a interface manteve seus valores praticamente estáveis, porém menos que à razão 0,3 (Figura 4.26 B). Ao contrário da razão 0,3, a emulsão produzida com o conjugado apresenta interface com E^* menor que o da interface da emulsão da mistura controle.

Os valores do módulo complexo na razão 1,2 também foram maiores para os conjugados que para as misturas controle, caracterizando uma interface mais elástica, porém não tão estável quanto na razão 0,3 devido às variações do valor de E^* com o tempo (Figura 4.26 C), de forma similar ao que ocorre na interface com o caseinato de sódio puro.

Apesar da alta atividade de superfície, indicada pela baixa tensão interfacial, a interface não apresentou resistência e estruturação como nas emulsões dos sistemas com maior concentração de polissacarídeos. Logo, a reação de Maillard na razão 1,2 levou à formação de uma interface mais elástica, porém não tão estável.

Deve-se ressaltar que para a longa estabilidade de emulsões, o que realmente importa é o quanto as características moleculares dos biopolímeros adsorvidos na camada interfacial estão de acordo com as condições necessárias para se produzir uma barreira macromolecular na interface (DICKINSON, 2003).

De acordo com os resultados, observou-se que a presença do polissacarídeo foi importante para aumentar a estabilidade da interface pelo aumento de sua espessura, e que a conjugação dos biopolímeros resultou em uma maior elasticidade da interface.

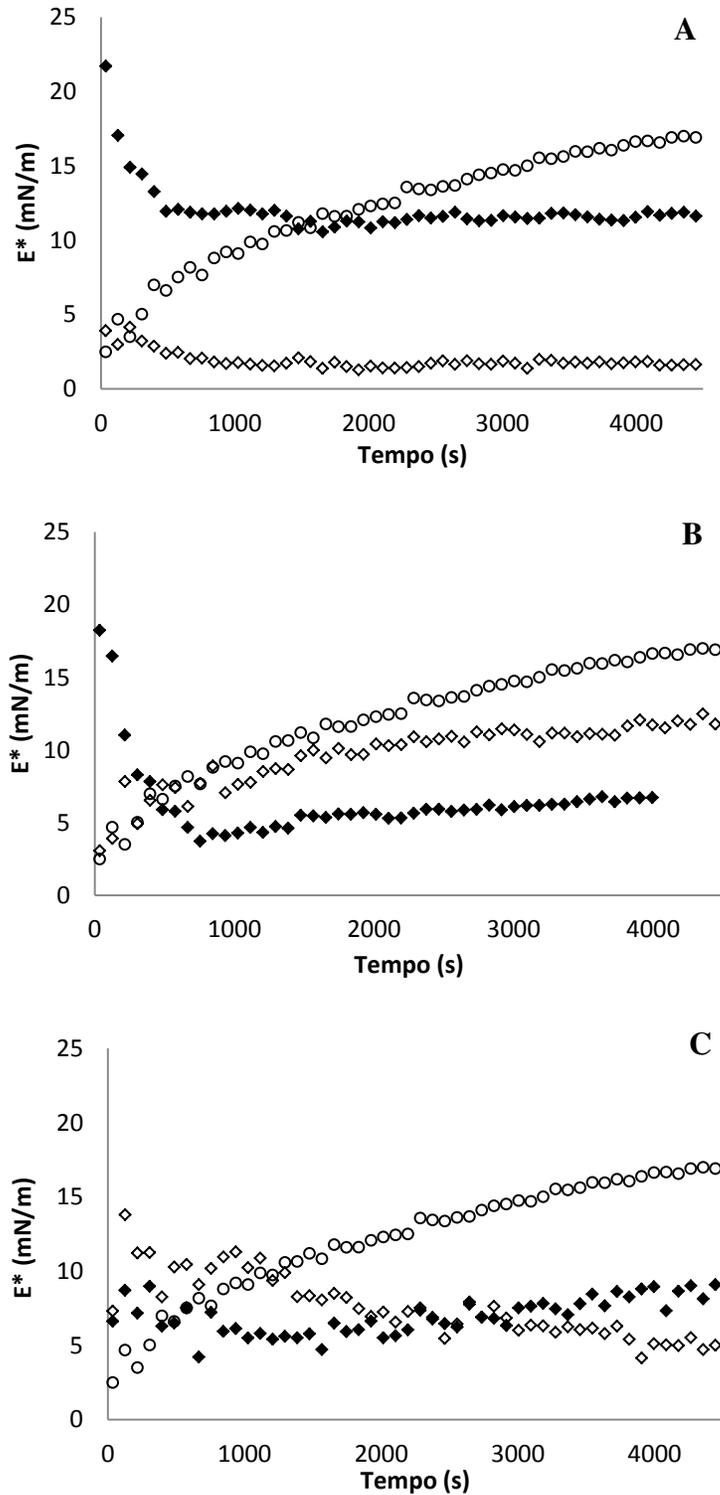


Figura 4.26: Módulo complexo dilatacional em função do tempo. (A) Razão 0,3; (B) razão 0,6 e (C) razão 1,2, (○) Caseinato de sódio; (◇) mistura controle e (◆) conjugados formados após 24 horas de reação.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi observada a formação de conjugados de caseinato de sódio – goma jataí nas condições estudadas (80°C / 79% UR). A eletroforese indicou a formação do conjugado pelo desaparecimento das bandas de α - e β - caseína e aparecimento de compostos de alta massa molecular. Adicionalmente, a análise de FTIR permitiu identificar alteração nos picos dos grupos funcionais após as ligações proteína-polissacarídeo ocorridos na reação de Maillard em todas as razões estudadas. Os parâmetros de cor também evidenciaram o avanço da reação devido ao aumento da cor amarela dos conjugados ao longo do tempo, quando comparados às misturas controle. A partir dos resultados ficou evidente a importância do tempo de reação e da razão proteína/polissacarídeo nas características dos diferentes conjugados. Dessa forma, esses novos compostos apresentaram comportamentos diferenciados nas emulsões principalmente quando foram submetidos a diferentes pH.

As emulsões em pH 7 foram mais estáveis que em pH 3,5 devido à maior solubilidade da proteína em pH neutro. Em pH 3,5 a instabilidade ocorreu principalmente nas emulsões preparadas com conjugados em que a proteína estava presente em maior quantidade (razão 1,2). Este comportamento pode ser explicado pela maior proximidade da proteína ao seu ponto isoelétrico ($pI = 4,6$), e pela menor viscosidade da fase contínua uma vez que havia menor quantidade de polissacarídeo que nas outras razões.

A razão 0,3, que apresenta maior concentração de polissacarídeo, foi a que levou à maior estabilidade da emulsão em ambos os valores de pH. Tal comportamento foi associado à maior viscosidade destas emulsões. Os valores de viscosidade e módulo complexo foram maiores nesta razão e em pH 7, caracterizando emulsões mais

estruturadas. O módulo complexo dilatacional indicou uma interface mais rígida e estável na presença de conjugados preparados com 24 horas de reação em pH 7 e razão 0,3.

Em pH 3,5 as emulsões utilizando conjugados formados após 24 horas de reação mostraram gotas menores e aparentemente mais estáveis comparadas às misturas controle. Sugere-se então que após a formação do conjugado em estágio inicial da reação de Maillard (24 horas) a proteína tenha se ancorado fortemente na superfície da gota, diminuindo a tensão interfacial. Simultaneamente, o polissacarídeo, que é altamente hidrofílico, tornou a camada interfacial mais espessa e aumentou a viscosidade da fase contínua. Por outro lado, os conjugados obtidos em maiores tempos de reação levaram a emulsões mais instáveis provavelmente porque nos estágios avançados da reação de Maillard foram formados compostos com menor atividade emulsificante.

Assim, revela-se fundamental a função dos polissacarídeos e da reação de Maillard com a proteína, principalmente para emulsões aplicadas em produtos ácidos, pois com isso promoveu – se a repulsão estérica das gotas e gerou - se maior estabilidade mesmo em condições adversas de pH. Dessa forma, o conjugado apresenta-se como uma alternativa à proteína como agente emulsificante devido à sua maior aplicabilidade em diferentes formulações de alimentos, principalmente os produtos acidificados.

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M.; DICKINSON, E. Whey protein–maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 4, p. 607-616, 2007.

AMES, J. M. The Maillard Reaction. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Biochemistry of Food Proteins**. London: Elsevier, 1992. cap. 4, p.99-153.

BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; POTIER, I. L.; KERDANIEL, T. D. F. D.; GROSSIORD, J.-L.; ROSILIO, V.; AGNELY, F. Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum arabic. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 354, n. 2, p. 467-477, 2011.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; SIMÕES, J.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, M. R. M.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 179-185, 2011.

CHU, B.; ZHOU, Z.; WU, G. W.; FARRELL, H. M. Laser-light scattering of model casein solutions - effect of high temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, n. 1, p. 102-112, 1995.

CUI, W.; WU, Y.; ESKIN, N. A. M.; GOFF, H. D. An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1141-1146, 2009.

DALGLEISH, D. G. Food emulsions stabilized by proteins. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 2, n. 6, p. 573-577, 1997.

DICKINSON, E. **An introduction to food colloids**. Oxford: Oxford University Press, 1992.

DICKINSON, E. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 15, n. 2, p. 161-176, 1999.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25-39, 2003.

DICKINSON, E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. **Soft Matter**, v. 4, n. 5, p. 932-942, 2008.

DICKINSON, E.; GALAZKA, Y. B. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of beta-lactoglobulin with polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 3, p. 281-296, 1991.

DILLS, W. L. Protein Fructosylation - Fructose and the Maillard Reaction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 5, p. S779-S787, 1993.

EINHORN-STOLL, U.; ULBRICH, M.; SEVER, S.; KUNZEK, H. Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 2, p. 329-340, 2005.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. The caseins. In: YADA, R. Y. (Ed.). **Proteins in food processing**. Boca Raton; Cambridge, Eng.: CRC Press ; Woodhead Pub., 2004. p.29-62.

FRIBERG, S. E.; LARSSON, K.; SJOBLOM, J. Food Emulsions. In: (Ed.). 4 th ed. Hoboken: Marcel Dekker Inc., 2003.

FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: An overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 631-653, 1996.

GARTI, N.; REICHMAN, D. Surface properties and emulsification activity of galactomannans. **Food Hydrocolloids**, v. 8, n. 2, p. 155-173, 1994.

GU, F.-L.; KIM, J. M.; ABBAS, S.; ZHANG, X.-M.; XIA, S.-Q.; CHEN, Z.-X. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 505-511, 2010.

HUANG, G.-Q.; SUN, Y.-T.; XIAO, J.-X.; YANG, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 534-539, 2012.

HURRELL, R. F. Reactions of food proteins during processing and storage and their nutritional consequences. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Developments in food proteins**. London: Elsevier, v.3, 1984. p.213-244.

KIM, H.; CHOI, S.; SHIN, W.; MOON, T. Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1049-1056, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 - 685, 1970.

LITTOZ, F.; MCCLEMENTS, D. J. Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: Cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1203-1211, 2008.

LIU, Y.; ZHAO, G.; ZHAO, M.; REN, J.; YANG, B. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 901-906, 2012.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; VICENTE, A. A. Synergistic effects between κ -carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 280-289, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions - principles, practice, and techniques**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 159, n. 2, p. 213-228, 2010.

MÖBIUS, D.; MILLER, R. **Proteins at Liquid Interfaces**. Burlington: Elsevier, 1998.

MODLER, H. W. Functional-Properties of Nonfat Dairy Ingredients - a Review - Modification of Products Containing Casein. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 9, p. 2195-2205, 1985.

MORRIS, G. A.; SIMS, I. M.; ROBERTSON, A. J.; FURNEAUX, R. H. Investigation into the physical and chemical properties of sodium caseinate-maltodextrin glyco-conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 6, p. 1007-1014, 2004.

NAKAMURA, S.; JING, H. Production and use of Maillard products as oxidative stress modulators. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 3, p. 291-298, 2005.

O'REGAN, J.; MULVIHILL, D. M. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1257-1267, 2009.

OLIVER, C.; MELTON, L.; STANLEY, R. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 4, p. 337-350, 2006.

PERRECHIL, F.; BRAGA, A.; CUNHA, R. Interactions between sodium caseinate and LBG in acidified systems: Rheology and phase behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2085-2093, 2009.

PERRECHIL, F.; CUNHA, R. Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: Influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 4, p. 441-448, 2010.

PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. Stabilization of multilayered emulsions by sodium caseinate and κ -carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 606-613, 2013.

RAVERA, F.; LOGLIO, G.; KOVALCHUK, V. I. Interfacial dilational rheology by oscillating bubble/drop methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 4, p. 217-228, 2010.

SEMENOVA, M. G.; DICKINSON, E.; BURLAKOVA, E. B.; ZAIKOV, G. E. **Biopolymers in food colloids : thermodynamics and molecular interactions**. Leiden; Boston: Brill, 2010.

SU, J.-F.; YUAN, X.-Y.; HUANG, Z.; WANG, X.-Y.; LU, X.-Z.; ZHANG, L.-D.; WANG, S.-B. Physicochemical properties of soy protein isolate/carboxymethyl cellulose blend films crosslinked by Maillard reactions: Color, transparency and heat-sealing ability. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 1, p. 40-46, 2012.

VICENTINI, N. M.; DUPUY, N.; LEITZELMAN, M.; CEREDA, M. P.; SOBRAL, P. J. A. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. **Spectroscopy Letters**, v. 38, n. 6, p. 749-767, 2005.

WONG, B.; DAY, L.; AUGUSTIN, M. Deamidated wheat protein-dextran Maillard conjugates: Effect of size and location of polysaccharide conjugated on steric stabilization of emulsions at acidic pH. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1424-1432, 2011.

XU, D.; WANG, X.; JIANG, J.; YUAN, F.; GAO, Y. Impact of whey protein – Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 258-266, 2012.

XU, X.; LI, B.; KENNEDY, J. F.; XIE, B. J.; HUANG, M. Characterization of konjac glucomannan–gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 2, p. 192-197, 2007.

YADAV, M. P.; PARRIS, N.; JOHNSTON, D. B.; ONWULATA, C. I.; HICKS, K. B.
Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability.
Carbohydrate Polymers, v. 81, n. 2, p. 476-483, 2010.

APÊNDICE

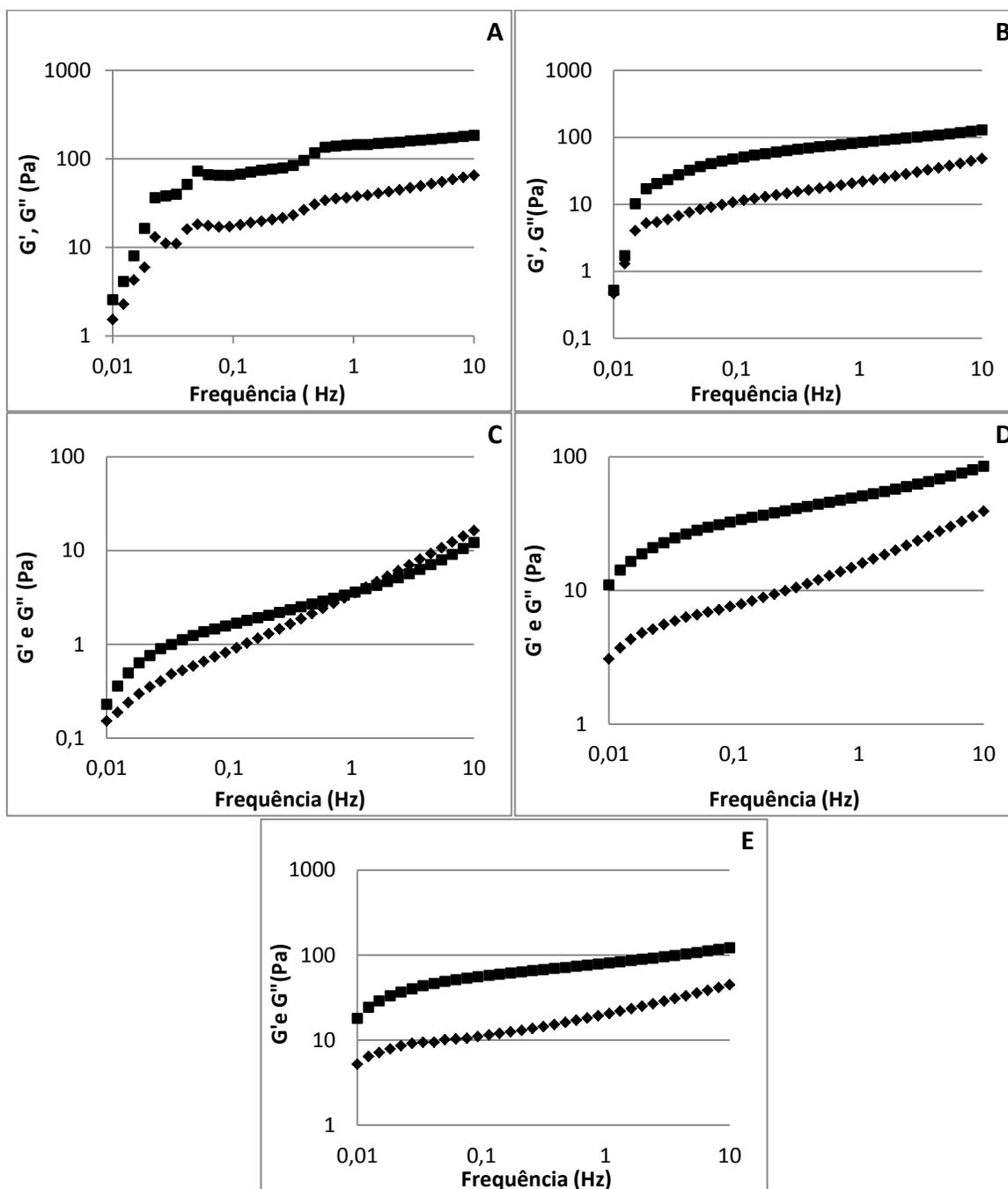


Figura A: Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsões estabilizadas em pH 3,5 e razão 0,6. Módulo elástico G' (■) e módulo viscoso G'' (◆). Tempos de reação (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h e (E) 96h.

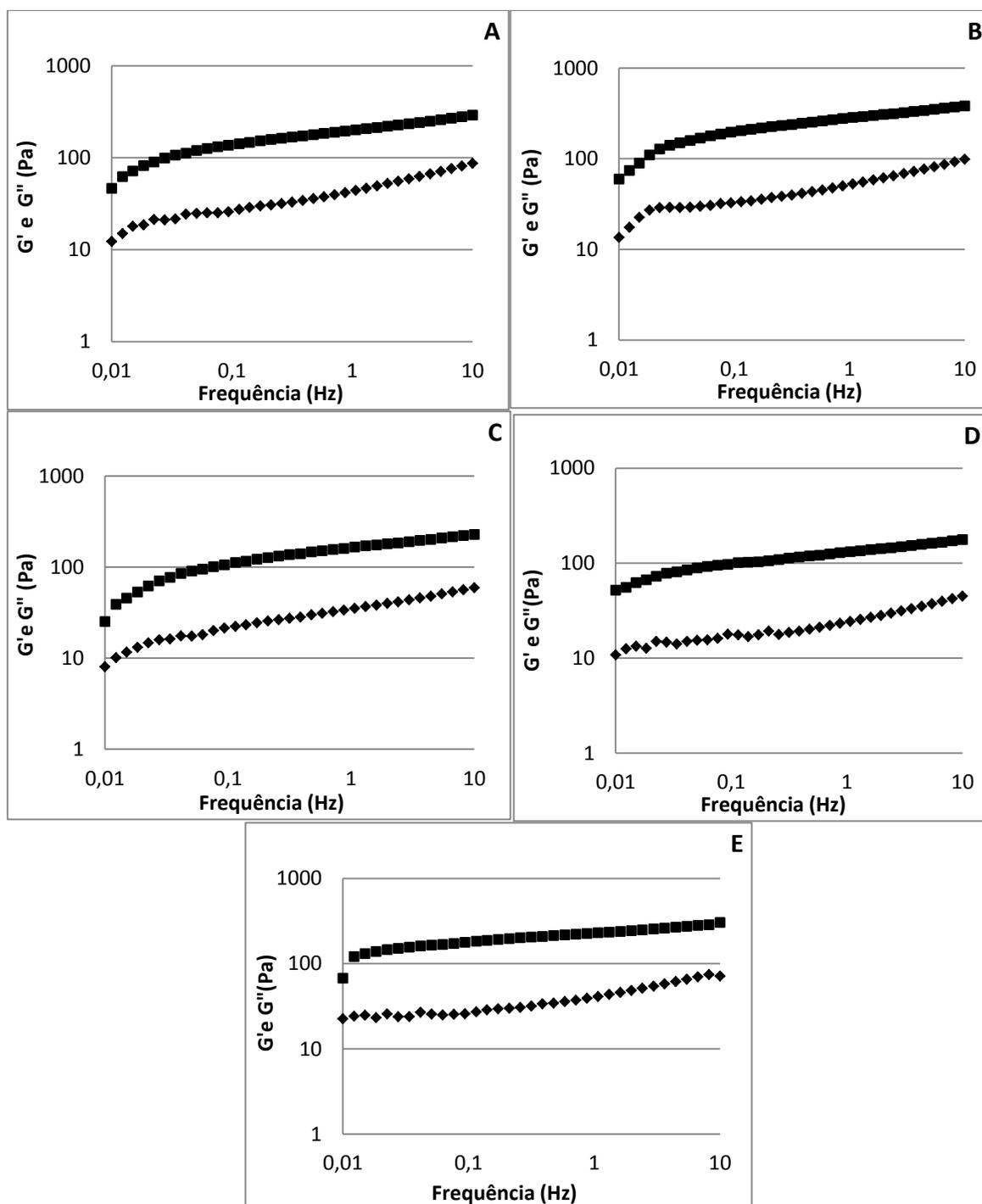


Figura B: Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsões estabilizadas em pH 3,5 e razão 1,2. Módulo elástico G' (■) e módulo viscoso G'' (◆). Tempos de reação (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h e (E) 96h.

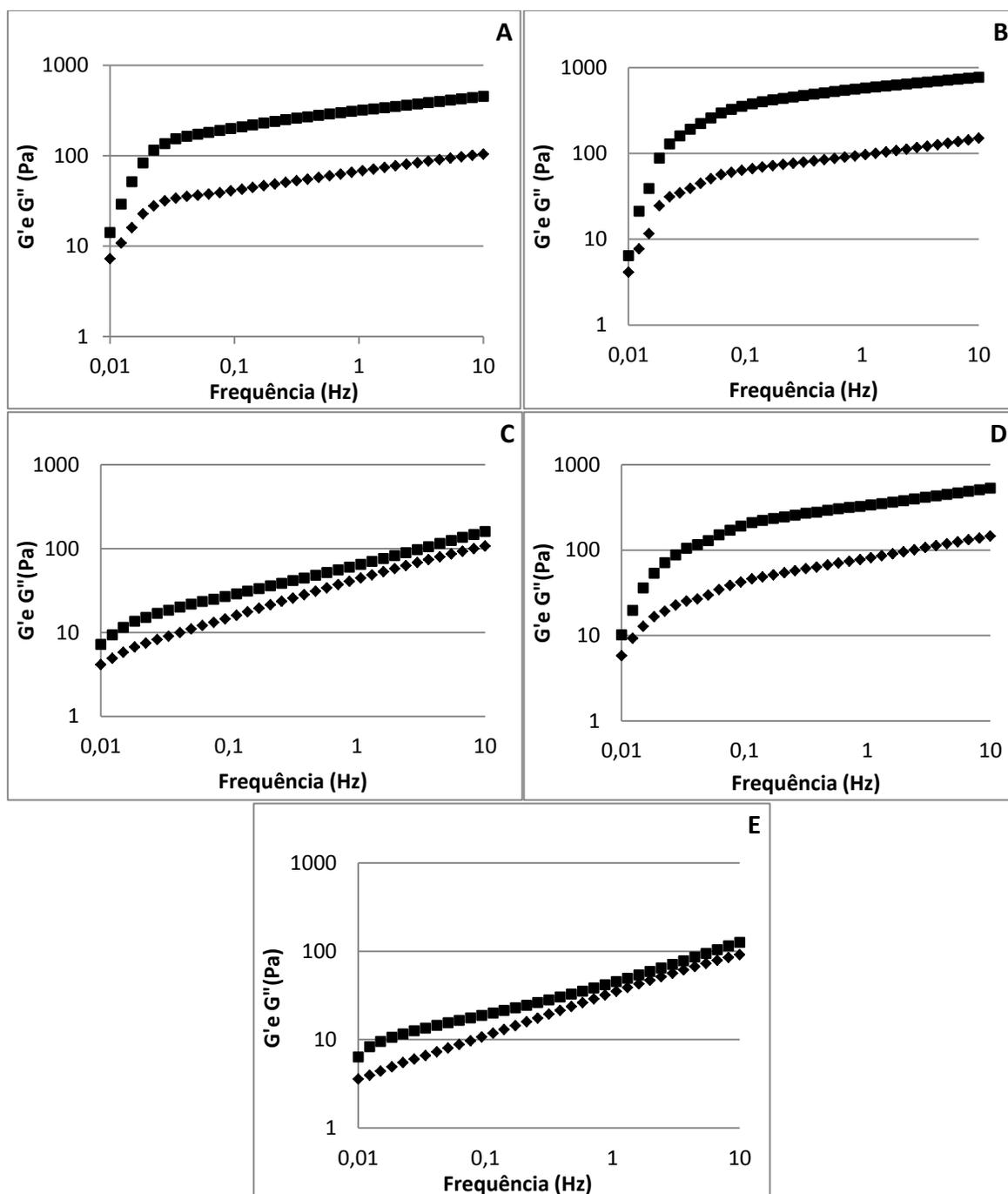


Figura C: Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsões estabilizadas em pH 7 e razão 0,3. Módulo elástico G' (■) e módulo viscoso G'' (◆). Tempos de reação (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h e (E) 96h.

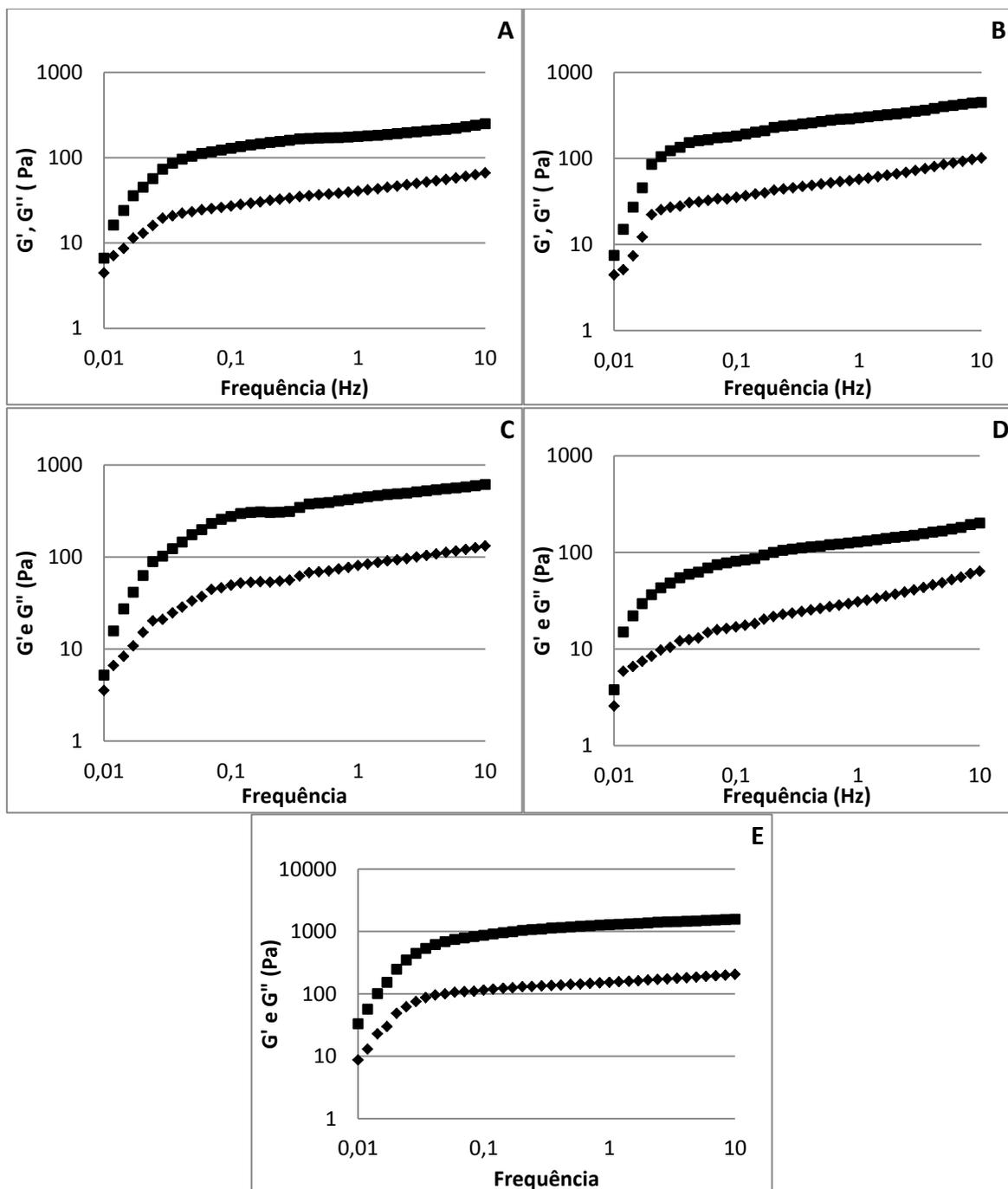


Figura D: Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsões estabilizadas em pH 7 e razão 0,6. Módulo elástico G' (■) e módulo viscoso G'' (◆). Tempos de reação (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h e (E) 96h.

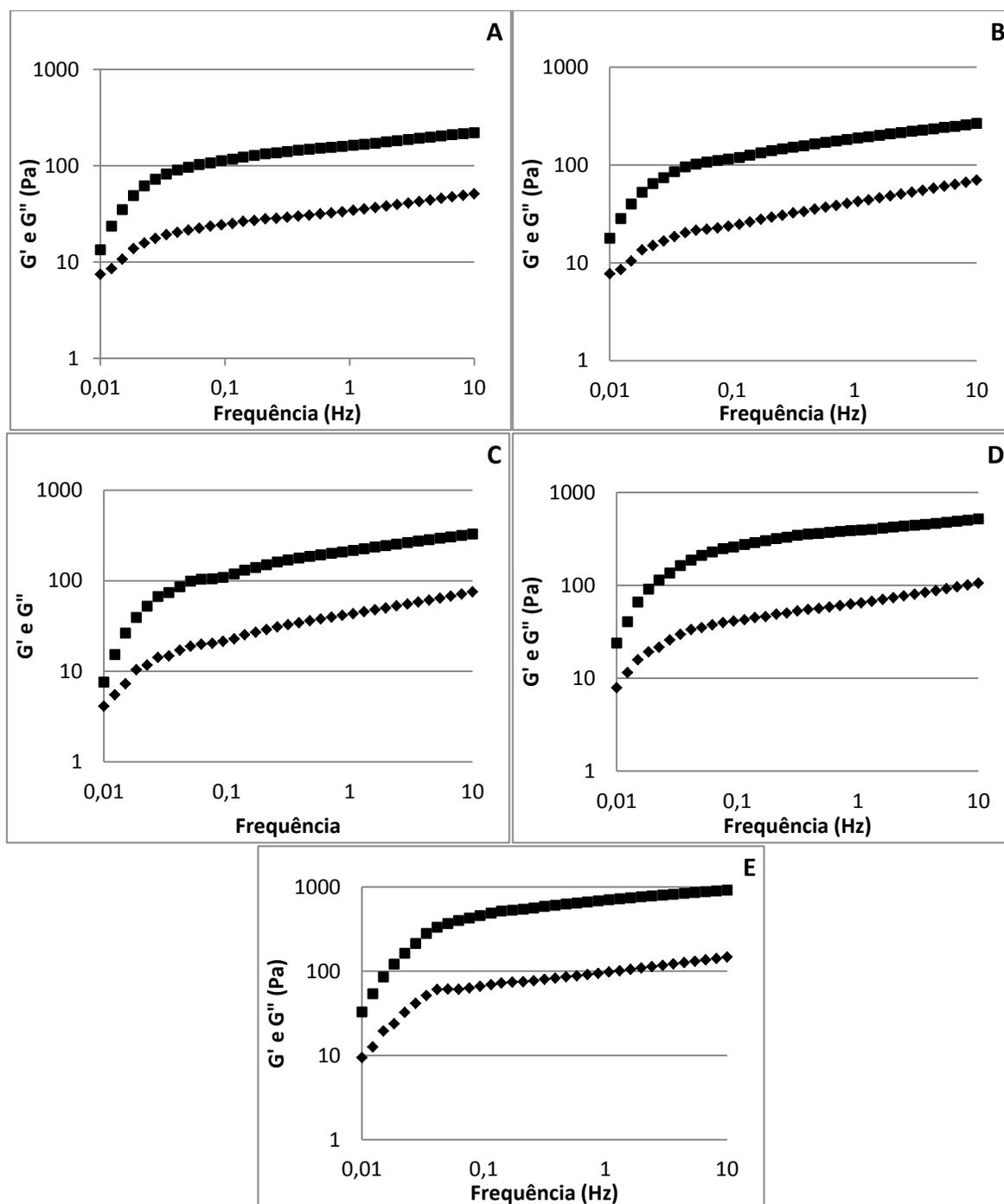


Figura E: Propriedades reológicas dinâmicas do comportamento de emulsões estabilizadas em pH 7 e razão 1,2. Módulo elástico G' (■) e módulo viscoso G'' (◆). Tempos de reação (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h e (E) 96h.