



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Kivia Mislaine Albano

Sistemas complexos de baixo teor de lipídeos estabilizados pela
interação eletrostática entre biopolímeros com aplicação de
ultrassom ou alta pressão

São José do Rio Preto
2017

Kivia Mislaine Albano

Sistemas complexos de baixo teor de lipídeos estabilizados pela
interação eletrostática entre biopolímeros com aplicação de
ultrassom ou alta pressão

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP–Proc.2013/10842-9

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vânia Regina Nicoletti

São José do Rio Preto
2017

Albano, Kivia Mislaine.

Sistemas complexos de baixo teor de lipídeos estabilizados pela interação eletrostática entre biopolímeros com aplicação de ultrassom ou alta pressão / Kivia Mislaine Albano . -- São José do Rio Preto, 2017
214 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Vânia Regina Nicoletti

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Emulsões. 3. Biopolímeros. 4. Proteínas. 5. Pectina. 6. Ultrassom. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.11

Kivia Mislaine Albano

Sistemas complexos de baixo teor de lipídeos estabilizados pela
interação eletrostática entre biopolímeros com aplicação de
ultrassom ou alta pressão

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Engenharia e Ciência de Alimentos,
junto ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos, do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP–Proc.2013/10842-9

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Mauro
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabrera
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Angela Maria Gozzo
UTFPR – Campo Mourão

Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri
UFSCar – Buri

São José do Rio Preto
25 de agosto de 2017

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”
(Madre Teresa de Calcutá).*

“Aos meus pais e meu irmão por seu amor incondicional, em especial à minha mãe por sempre me incentivar nos estudos e acreditar em mim. ”

“Ao Marcelo por ser meu companheiro e pelo seu apoio em minha vida e em minha carreira ”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que Ele me permitiu alcançar, por sempre guiar os meus passos e permitir que eu me realizasse nessa profissão de aprendizagem contínua.

Em especial, agradeço à professora Vânia por seu apoio, orientação e ensinamento durante todos esses anos, por sua dedicação, seriedade e paciência. Acima de tudo por ser uma pessoa tão humana e amiga de seus orientados.

Aos meus pais e meu irmão, que sempre estiveram do meu lado me dando apoio, à minha mãe em especial que desde pequena sempre me incentivou com os estudos e hoje estou aqui, devo isso a você mãe.

Ao Marcelo por ser meu companheiro em todos os momentos, por seu amor, carinho, amizade, compreensão, por estar do meu lado em todas as situações me dando apoio e sendo um marido tão presente tornando meus dias mais felizes.

Ao Thor, sim! Por me mostrar que por mais difícil que seja a situação, que por mais que a vida esteja por um fio, se houver amor e fé tudo se transforma e o resto se ajusta. Obrigada por me ensinar o amor incondicional e o quão valioso são pequenas coisas em nossas vidas.

Aos meus verdadeiros amigos, em especial à Micheli, Elaine e ao JOVIC por todos esses anos de amizade e companheirismo tornando pequenos momentos sempre especiais e divertidos.

Aos professores da graduação e pós-graduação que contribuíram para meu aprendizado e crescimento profissional, vocês sempre serão minha base profissional.

Aos colegas de laboratório Mirian, Larissa, Tiago, Caroline Aranha, Paulo, Poliana, Diana, Marília, João, Elisa, Sun e Yuri por todo companheirismo, amizade, troca de conhecimentos e muitas risadas, com certeza com vocês os dias exaustivos e tristes passaram despercebidos.

À minha aluna de iniciação científica Caroline Pescaroli, por todo seu empenho e dedicação no desenvolvimento desse projeto e também por sua amizade.

Aos técnicos de laboratório por todo suporte durante esses anos e ao Newton (in memoriam) por sua sugestão fundamental para o desenvolvimento desse projeto, você sempre será lembrado com muito carinho.

Às professoras Ana Cristina e Maria Aparecida por sua presença e disponibilidade em meu exame de qualificação e por suas sugestões.

Ao Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa (Laboratório de Física de Sistemas Coloidais-Departamento de Biofísica- Ibilce UNESP) por disponibilizar seu equipamento para que análise de potencial zeta fosse realizada.

À Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Villamaior, ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior (Laboratório de Microscopia e Microanálise - Departamento de Biologia – Ibilce UNESP) pelo auxílio na realização da análise de microscopia confocal de varredura a laser.

Ao professor Paulo José do Amaral Sobral (FZEA-USP) por disponibilizar o espectrômetro para a análise de FTIR.

Aos alunos do programa de pós graduação da Química (UNESP) Ricchard Halan Felix Viegas de Souza e Maicon Segalla Petronio por sua ajuda e colaboração na interpretação dos dados de FTIR.

À Profa. Dr. Miriam Dupas Hubinger e à técnica Vanessa Martins da Silva (Laboratório de Engenharia de Processos – Departamento de Engenharia de Alimentos -UNICAMP) pelo auxílio e colaboração na análise de distribuição de tamanho de partículas.

Aos membros da banca examinadora por sua disponibilidade em participar desta banca de defesa e correção deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de estudos concedida, processo 2013/10842-9.

À Danisco pela doação da pectina e do alginato.

À Tovani Benzaquen pela doação do isolado proteico de soja.

À Alibra Ingredientes pela doação do concentrado proteico de soro.

E por todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram do meu lado e permitiram o andamento desse projeto.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
NOMENCLATURA/ABREVIACÕES.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT	25
1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	28
2-OBJETIVOS.....	32
2.1-Objetivos específicos.....	32
3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1- Emulsões	33
3.2- Biopolímeros comumente aplicados como emulsificantes e estabilizantes	36
3.2.1- Alginato de sódio.....	36
3.2.2- Pectina.....	38
3.2.3- Concentrado proteico de soro de leite (WPC)	40
3.2.4- Isolado proteico de soja (SPI).....	41
3.3- Interações entre proteínas e polissacarídeos	44
3.3.1- Fatores que influenciam a separação de fases	50
3.3.1.1-pH	57
3.3.1.2- Força iônica	58
3.3.1.3- Razão proteína: polissacarídeo	58
3.3.1.4- Tipo do polissacarídeo	60
3.3.1.5- Parâmetros físicos do processo	61
3.4- Reologia de emulsões e misturas de biopolímeros	63
3.5- Efeitos do ultrassom e da alta pressão na microestrutura de sistemas complexos	65
4- MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.1- Materiais	69
4.1- Métodos	69
4.2.1- Determinação da umidade	69
4.2.2- Preparo das soluções estoque.....	69

4.2.3- Preparo das suspensões (complexos sem óleo)	70
4.2.4- Preparo das emulsões	70
4.2.5- Determinação do potencial zeta	71
4.2.6- Turbidimetria	71
4.2.7- Avaliação visual.....	72
4.2.8- Propriedades reológicas	72
4.2.8.1- Cisalhamento estacionário	73
4.2.8.2- Cisalhamento oscilatório.....	73
4.2.9- Espectros de infravermelho (FTIR-ATR)	74
4.2.10- Microscopia	75
4.2.10.1- Microscopia ótica.....	75
4.2.10.2- Microscopia confocal de varredura a laser	75
4.2.11- Distribuição de tamanho de gotas (DTG)	75
4.2.12- Estabilidade das emulsões	75
4.2.13- Composição química das emulsões	76
4.2.14- Análise estatística	76
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1- ANÁLISES DOS BIOPOLÍMEROS PUROS	77
5.1.1- Umidade e especificações físico químicas	77
5.1.2- Potencial zeta	77
5.1.2- Espectros de infravermelho (FTIR -ATR)	79
5.2- SISTEMAS WPC-PECTINA	83
5.2.1- <i>FORMAÇÃO DE COMPLEXOS WPC-PECTINA</i>	83
5.2.1.1- Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica	83
5.2.1.2- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	88
5.2.2 <i>EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS WPC-PECTINA</i> ...	90
5.2.2.1- Avaliação visual das emulsões	90
5.2.2.2- Microscopias ótica e confocal de varredura a laser	92
5.2.2.3- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	95
5.2.2.4- Rampas de aquecimento-resfriamento.....	97

5.2.2.5- Distribuição de tamanho de gotas.....	100
CONCLUSÕES PARCIAIS WPC-PECTINA	102
5.3- SISTEMAS SPI-PECTINA	103
5.3.1- <i>FORMAÇÃO DE COMPLEXOS SPI-PECTINA</i>	103
5.3.1.1- Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica	103
5.3.1.2- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	107
5.3.2 <i>EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS SPI-PECTINA</i>	110
5.3.2.1- Avaliação visual, índice de cremeação (IC) e composição química ...	110
5.3.2.2- Microscopias ótica e confocal de varredura a laser	112
5.3.2.3- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	115
5.3.2.4- Rampas de aquecimento-resfriamento.....	117
5.3.2.5- Distribuição de tamanho de gotas.....	121
CONCLUSÕES PARCIAIS SPI-PECTINA	123
5.4- SISTEMAS WPC-ALGINATO	124
5.4.1- <i>FORMAÇÃO DE COMPLEXOS WPC-ALGINATO</i>	124
5.4.1.1- Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica	124
5.4.1.2- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	128
5.4.1.3- Comportamento reológico - Cisalhamento oscilatório	130
5.4.2 <i>EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS WPC-ALGINATO</i> 132	
5.4.2.1- Avaliação visual, índice de cremeação (IC) e composição química ...	132
5.4.2.2- Microscopias ótica e confocal de varredura a laser	136
5.4.2.3- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	139
5.4.2.4 Comportamento reológico - Cisalhamento oscilatório	141
5.4.2.5- Rampas de aquecimento-resfriamento.....	143
5.4.2.6- Distribuição de tamanho de gotas.....	147
CONCLUSÕES PARCIAIS WPC-ALGINATO	149
5.5- SISTEMAS SPI-ALGINATO	151
5.5.1- <i>FORMAÇÃO DE COMPLEXOS SPI-ALGINATO</i>	151
5.5.1.1- Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica	151
5.5.1.2- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	154
5.5.1.3- Comportamento reológico - Cisalhamento oscilatório	156

5.5.2 <i>EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS SPI-ALGINATO</i> ..	158
5.5.2.1- Avaliação visual, índice de cremeação (IC) e composição química ...	158
5.5.2.2- Microscopias ótica e confocal de varredura a laser	161
5.5.2.3- Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário	165
5.5.2.4- Comportamento reológico - Cisalhamento oscilatório	167
5.5.2.5- Rampas de aquecimento-resfriamento.....	170
5.5.2.6- Distribuição de tamanho de gotas.....	174
CONCLUSÕES PARCIAIS SPI-ALGINATO	176
6- CONCLUSÕES GERAIS.....	178
REFERÊNCIAS	180
APÊNDICES	207
APÊNDICE A	207
APÊNDICE B	208
APÊNDICE C	209
APÊNDICE D	210
APÊNDICE E	211
APÊNDICE F	212
APÊNDICE G	213
APÊNDICE H	214

LISTA DE TABELAS

P.

Tabela 3.1: Estudos avaliando o efeito de diferentes processos de homogeneização e fatores nas características dos biopolímeros e na obtenção de complexos por biopolímeros aplicados em diferentes processos alimentares.....51

Tabela 3.2:Estudos sobre a interação entre biopolímeros aplicados na estabilização de emulsões avaliando o efeito de diferentes processos de homogeneização e fatores53

Tabela 3.3: Taxas de deformação típicas observadas em alguns processos relevantes em alimentos. Fonte: STEFFE, 199664

Tabela 5.1: Umidade em base seca (u.b.s.) e especificações físico químicas dos biopolímeros.77

Tabela 5.2: Proporções entre os componentes do sistema misto (WPC, PEC e água) e valores de viscosidade (μ (Pa.s)) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções WPC:PEC sem e com aplicação de ultrassom.88

Tabela 5.3: Proporções entre os diferentes componentes (PEC, WPC, óleo e H₂O) das emulsões e valores de viscosidade (μ (Pa.s)) a 25 °C nas rampas descendente (1) e ascendente (2) com diferentes teores de óleo de soja nas proporções WPC:PEC 1:1 e 4:1...92

Tabela 5.4: Proporções entre os componentes do sistema misto (SPI, PEC e água) e valores de índice de consistência (K) a 25 °C nas rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções SPI:PEC sem e com aplicação de ultrassom.108

Tabela 5.5: Proporções entre os diferentes componentes das emulsões nas proporções SPI:PEC 1:1 e 4:1 e a composição química das fases creme e soro das emulsões 4:1.111

Tabela 5.6: Valores de viscosidade (μ) a 25 °C na proporção SPI:PEC 1:1, índice de consistência (K), índice de comportamento (n) e viscosidade infinita (η_{∞}) na proporção SPI:PEC 4:1.115

Tabela 5.7: Proporções entre os componentes do sistema misto (WPC, ALG e água) e valores de índice de consistência (K) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções WPC:ALG sem e com aplicação de ultrassom...128

Tabela 5.8: Proporções entre os diferentes componentes das emulsões e a composição química das fases creme e soro das emulsões nas proporções WPC:ALG 1:1 e 4:1.....134

Tabela 5.9: Valores de índice de consistência (K) e viscosidade infinita (η_{∞}) a 25 °C nas rampas descendente (1) e ascendente (2) na proporção WPC:ALG 1:1 e 4:1 das emulsões tratadas com ultrassom ou alta pressão140

Tabela 5.10: Proporções entre os componentes do sistema misto (SPI, ALG e água) e valores de índice de consistência (K) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções SPI:ALG sem e com aplicação de ultrassom154

Tabela 5.11: Proporções entre os diferentes componentes das emulsões e a composição química das fases creme e soro das emulsões nas proporções SPI:ALG 1:1 e 4:1.....160

Tabela 5.12: Valores de índice de consistência (K) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) na proporção SPI:ALG 1:1 e 4:1 das emulsões tratadas com ultrassom165

LISTA DE FIGURAS

p.

- Figura 3.1.** Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/A. Adaptado de McCLEMENTS, 2007.....34
- Figura 3.2.** Ilustração esquemática de gotas de óleo em água estabilizadas por (A) moléculas anfifílicas adsorvidas na interface óleo-água (ex. proteínas) e (B) macromoléculas não adsorvidas atuando na modificação da viscosidade da fase contínua (ex. polissacarídeos). Adaptado de GARTI E LESER, 2001.36
- Figura 3.3:** Estrutura química do alginato de sódio. a) ácido β -D-manurônico; b) α -L-gulurônico e c) alginato. Fonte: GAVA, 2008.37
- Figura 3.4.** Estrutura geral da pectina. Fonte: BOBBIO, 198939
- Figura 3.5:** Representação esquemática de quatro rotas diferentes para a preparação de emulsões estabilizadas por complexos eletrostáticos de proteína:polissacarídeo. Gotinha de óleo interna é protegida por adsorção de (I) coacervado complexo, (II) camada de proteína, (III) camada de proteína com uma camada exterior de polissacarídeo (bicamada) ou (IV) complexo solúvel. Adaptado de EVANS et al., 2013.46
- Figura 3.6:** Mistura de biopolímeros e vias de interação. Adaptado de DE KRUIF; TUINIER, 2001.48
- Figura 3.7:** Distribuição de cargas dos biopolímeros e região de cargas opostas indica região de coacervação.....60
- Figura 5.1:** Valores de potencial zeta para soluções puras dos biopolímeros ALG (■), PEC (□), SPI (▲) e WPC (Δ) com aplicação de ultrassom (a) e sem aplicação de ultrassom (b) em diferentes valores de pH78

Figura 5.2: Espectros FTIR dos biopolímeros puros (WPC, ALG e PEC) e de suas interações nas proporções 1:1 e 4:1 com aplicação de ultrassom (U) ((b), (d)) e sem aplicação de ultrassom ((a), (c)), pH 3,5 a 25 °C.....	81
Figura 5.3: Espectros FTIR dos biopolímeros puros (SPI, ALG e PEC) e de suas interações nas proporções 1:1 e 4:1 com aplicação de ultrassom (U) ((b), (d)) e sem aplicação de ultrassom ((a), (c)), pH 3,5 a 25 °C.....	82
Figura 5.4: Efeito da proporção WPC:PEC com aplicação de ultrassom (U) (□) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) e imagens dos sistemas após 48h de repouso (b).	84
Figura 5.5: Imagens dos complexos do par WPC:PEC nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes de 10x de aumento. Barra corresponde a 50µm.....	87
Figura 5.6: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente (■,▲) e ascendente (Δ,□) do par WPC:PEC	89
Figura 5.7: Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (WPC:PEC) em diferentes teores de óleo (5, 10 e 15 %). Imagens após 48 horas de repouso.	91
Figura 5.8: Imagens das emulsões do par WPC:PEC nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm	94
Figura 5.9: Micrografias confocais a laser de emulsões com 15% de óleo de soja nas proporções WPC: PEC 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: PEC corada usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: WPC corada usando FITC. As imagens foram obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 µm.....	95

Figura 5.10: Comportamento reológico das emulsões em 5 % (■,□), 10 % (▲,△) e 15 % (●,○) de óleo na proporção 1:1 (a) e 4:1 (b), curvas de escoamento descendente (símbolos fechados) e ascendente (símbolos abertos)	96
Figura 5.11: Rampas de aquecimento-resfriamento: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); Rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲), de emulsões nas proporções 1:1 (a) e 4:1 (b) com 15% de óleo de soja, pectina (c) e (d) WPC puros	98
Figura 5.12: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W nas proporções WPC: PEC (a) 1: 1 e (b) 4: 1 com 5% (▲), 10% (○) e 15% (■) óleo de soja	100
Figura 5.13: Efeito da proporção SPI:PEC com aplicação de ultrassom (U) (□) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) e imagens dos sistemas após 48h de repouso.	104
Figura 5.14: Imagens dos complexos do par SPI:PEC nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes de 10x de aumento. Barra corresponde a 50µm	106
Figura 5.15: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente (■, ▲) e ascendente (△, □) do par SPI:PEC	109
Figura 5.16: Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (SPI:PEC)) em diferentes teores de óleo (5, 10 e 15 %). Imagens após 48 horas de repouso.	110
Figura 5.17: Imagens das emulsões (1:1) e dos cremes (4:1) do par SPI:PEC nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm.....	113
Figura 5.18: Micrografias confocais a laser de emulsões com 15% de óleo de soja nas proporções SPI: PEC 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: PEC corada usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: SPI corado usando FITC. As imagens foram	

obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 μm114

Figura 5.19: Viscosidade das emulsões com 5 % (■), 10 % (Δ) e 15 % (●) de óleo de soja na proporção SPI:PEC 1:1 (a) e 4:1 (b)116

Figura 5.20: Rampas de aquecimento-resfriamento: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); Rampa 2 de 72 a 5 °C ($\circ$); rampa 3 de 5 a 25 °C ($\blacktriangle$), dos biopolímeros puros, pectina (a) e SPI (b) e das emulsões nas proporções 1:1 (c) e 4: 1 (d) com 15% de óleo.118

Figura 5.21: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W nas proporções SPI: PEC (a) 1: 1 e (b) 4: 1 com 5% ($\blacktriangle$), 10% ($\circ$) e 15% (■) óleo de soja122

Figura 5.22: Efeito da proporção WPC:ALG com aplicação de ultrassom (U) ($\square$) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) e imagens dos sistemas após 48h de repouso.124

Figura 5.23: Imagens dos complexos do par WPC:ALG nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes de 10x de aumento. Barra corresponde a 50 μm127

Figura 5.24: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente ((■) e ($\blacktriangle$)) e ascendente ((Δ) e ($\square$)) do par WPC:ALG129

Figura 5.25: Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações na frequência de 1 rad/s para o sistema WPC:ALG130

Figura 5.26: Módulos de armazenamento, G' (■, $\blacktriangle$), e módulo de dissipação, G'' (Δ , $\square$) dos complexos para proporções 3:1 (a), 4:1 (b) e 5:1 (c) com aplicação de ultrassom (triângulos) e sem aplicação do ultrassom (quadrados) do par WPC:ALG.. 132

- Figura 5.27:** Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (WPC:ALG) em diferentes teores de óleo (15, 20 e 25 %). Imagens após 48 horas de repouso. (a) ultrassom. (b) homogeneizador a alta pressão.....133
- Figura 5.28:** Imagens das emulsões WPC:ALG tratadas com ultrassom nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde 20µm.137
- Figura 5.29:** Imagens das emulsões tratadas com alta pressão do par WPC:ALG na proporção 1:1 com diferentes teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm.....138
- Figura 5.30:** Micrografias confocais a laser de emulsões com 25% de óleo de soja nas proporções WPC:ALG 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: ALG corado usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: WPC corado usando FITC. As imagens foram obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 µm.....139
- Figura 5.31:** Viscosidade das emulsões (rampa ascendente) com 15 % (■), 20 % (Δ) e 25 % (●) de óleo de soja na proporção WPC:ALG 1:1 (a) e 4:1 (b) sonicadas com ajuste do Modelo de Sisko e 1:1 (c) homogeneizadas a alta pressão com ajuste da Lei da Potência.....141
- Figura 5.32:** Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações na frequência de 1 rad/s para emulsões do sistema WPC:ALG142
- Figura 5.33:** Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos) para emulsões na proporção WPC:ALG 4:1 com 15 % (■,□), 20 % (▲,Δ) e 25 % (●,○).143
- Figura 5.34:** Rampas de aquecimento-resfriamento constante: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲), do alginato de sódio (a), do WPC (b) puros e da emulsão na proporção 1: 1 (c) com 25% de óleo de soja.144

Figura 5.35: Rampas de aquecimento-resfriamento oscilatório: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲), do alginato de sódio (a), do WPC (b) puros e da emulsão na proporção 4:1 (a) com 25% de óleo de soja. Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos). .	146
Figura 5.36: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W sonicadas nas proporções WPC:ALG (a) 1: 1 e (b) 4: 1 e emulsões submetidas à alta pressão 1:1 (c) com 15% (▲), 20% (○) e 25% (■) de óleo de soja	148
Figura 5.37: Efeito da proporção SPI:ALG com aplicação de ultrassom (U) (□) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) e imagens dos sistemas após 48h de repouso.	151
Figura 5.38: Imagens dos complexos do par SPI:ALG nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes de 10x de aumento. Barra corresponde a 50µm	153
Figura 5.39: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente (■, ▲) e ascendente (Δ, □) do par SPI:ALG	155
Figura 5.40: Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações na frequência de 1 rad/s para o sistema SPI:ALG	157
Figura 5.41: Módulos de armazenamento, G' (■; ▲), e módulo de dissipação, G'' (Δ; □) dos complexos nas proporções 3:1 (a), 4:1 (b) e 5:1 (c) com aplicação de ultrassom (triângulos) e sem aplicação do ultrassom (quadrados) do par SPI:ALG	157
Figura 5.42: Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (SPI:ALG) em diferentes teores de óleo (15, 20 e 25 %). Imagens após 48 horas de repouso. (a) ultrassom. (b) homogeneizador a alta pressão.	158

Figura 5.43: Imagens das emulsões do par SPI:ALG nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm	163
Figura 5.44: Imagens das emulsões tratadas com alta pressão do par SPI:ALG na proporção 1:1 com diferentes teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm.....	164
Figura 5.45: Micrografias confocais a laser de emulsões com 25% de óleo de soja nas proporções SPI:ALG 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: ALG corado usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: SPI corado usando FITC. As imagens foram obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 µm.....	164
Figura 5.46: Viscosidade das emulsões (rampa ascendente) com 15 % (■), 20 % (Δ) e 25 % (●) de óleo de soja na proporção SPI:ALG 1:1 (a) e 4:1 (b) sonicadas com ajuste da Lei da Potência e 1:1 (c) homogeneizadas a alta pressão.....	166
Figura 5.47: Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações na frequência de 1 rad/s para emulsões do sistema SPI:ALG sonicadas (a) e submetidas a alta pressão (b) em suas condições extremas.....	168
Figura 5.48: Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos) das emulsões sonicadas, SPI:ALG 1:1 (a) e 4:1 (b) e à alta pressão 1:1 (c) com 15 % (■,□), 20 % (▲,Δ) e 25 % (●,○).....	169
Figura 5.49: Rampas de aquecimento-resfriamento oscilatório: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲), do alginato de sódio (a), do SPI (b) puros e da emulsão na proporção 1:1 (c) e 4:1 (d) com 25% de óleo de soja. Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos).	172

Figura 5.50: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W sonicadas nas proporções SPI:ALG (a) 1: 1 e (b) 4: 1 e emulsões submetidas à alta pressão 1:1 (c) com 15% (▲), 20% (○) e 25% (■) de óleo de soja175

NOMENCLATURA/ABREVIACÕES

PEC: Pectina

ALG: Alginato de sódio

SPI: Isolado Proteico de Soja

WPC: Concentrado Proteico de Soro

O/W: Emulsão óleo/água

US: Ultrassom

IC: Índice de Cremação

H: Altura da fase inferior (soro) das emulsões

H₀: Altura inicial das emulsões

D₃₂: Diâmetro médio superficial das gotas (mm)

pI: ponto isoelétrico da proteína

pH: Potencial Hidrogeniônico

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)

ATR: Reflexão Total Atenuada

NaOH: Hidróxido de sódio

HCl: Ácido clorídrico

τ : tensão de cisalhamento (Pa)

$\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s^{-1})

μ : a viscosidade constante de proporcionalidade para um fluido newtoniano (Pa.s)

K : índice de consistência (Pa.sⁿ),

n : índice de comportamento

η_{ap} : viscosidade aparente (Pa.s)

η_{∞} : a viscosidade infinita (Pa.s).

R^2 : coeficiente de determinação

G' : Módulo elástico ou de armazenamento (Pa)

G'' : Módulo viscoso ou de dissipação de energia (Pa)

U.B.S: Umidade em Base Seca

kHz: quilohertz, equivalente à mil hertz.

rad/s: frequência ou velocidade angular

RESUMO

Sistemas de partículas coloidais a base de biopolímeros naturais vêm sendo cada vez mais usados como sistemas de encapsulação ou de veiculação de ingredientes ativos, ou ainda para modular as propriedades sensoriais dos alimentos. A maior parte dessas aplicações envolve uma etapa de emulsificação durante o processamento. A heteroagregação de gotículas de lipídeos com proteínas e polissacarídeos pode ser usada para criar emulsões altamente viscosas ou similares a géis, mas com um conteúdo de óleo menor que as emulsões convencionais. Essa agregação é induzida pela mistura de uma emulsão primária - na qual as gotículas de óleo são estabilizadas por uma proteína - com uma solução de polissacarídeo em pH no qual os biopolímeros apresentam cargas opostas. A aplicação de ultrassom (US) de alta intensidade e de homogeneizador a alta pressão com o objetivo de alterar propriedades funcionais dos biopolímeros vem sendo bastante estudada e, além disso, são métodos que possibilitam a preparação de emulsões com tamanhos de gotas reduzidos. Inicialmente, foi determinado o potencial zeta das proteínas (concentrado proteico de soro de leite, WPC, isolado proteico de soja, SPI) e polissacarídeos (pectina e alginato de sódio) puros, buscando identificar o pH de maior potencial de interação, constatando ocorrer no pH 3,5. Em seguida, foi investigada a interação entre os pares de proteína-polissacarídeo (WPC/Pectina, WPC/Alginato, SPI/Pectina e SPI/Alginato) no pH 3,5 em função da razão proteína:polissacarídeo (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e 5:1), com e sem a aplicação de ultrassom. Foram feitos ensaios de turbidimetria, avaliação visual, microscopia ótica, bem como de reologia em cisalhamento constante com ajuste de modelos reológicos e em cisalhamento oscilatório, ambos a 25 °C. Após essa avaliação, devido às características físicas apresentadas sistemas com e sem aplicação de US na razão proteína:polissacarídeo 1:1 (sem forte separação de fases) e 4:1 (com forte separação de fases) foram selecionados

para análise de FT-IR e preparo das emulsões. A turbidimetria indicou que a aplicação de ultrassom ocasionou a diminuição de tamanho das partículas complexadas dispersas no meio, gerando uma solução menos turva, o que consequentemente diminuiu a leitura de absorbância, exceto para o par SPI:PEC. Para os pares contendo alginato, a avaliação visual permitiu observar a formação de complexos coacervados que sedimentaram, indicando a forte interação eletrostática entre os polímeros. Os pares com pectina não apresentaram sedimentação, mas complexos também foram formados, porém solúveis o que pode indicar a miscibilidade dos polímeros. Os modelos reológicos Lei da Potência, Sisko e Newton ajustaram-se bem aos dados ($R^2 > 0,9$) de acordo com as características das amostras. Os pares WPC:ALG e SPI:ALG apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$), o índice de consistência (K) aumentou com o aumento da proporção de proteína, e houve leve tixotropia. No entanto, a aplicação de ultrassom reduziu a tixotropia do par SPI:ALG por reduzir o tamanho dos complexos minimizando os efeitos da taxa de deformação aplicada. O comportamento dos pares WPC:PEC e SPI:PEC mostraram que a pectina interage com as proteínas de forma diferente que o alginato; apresentando comportamento predominantemente newtoniano. Nos ensaios de cisalhamento oscilatório, com os pares de alginato G' foi maior que G'' em toda faixa de frequência aplicada, indicando um material estruturado e viscoelástico. A microscopia ótica confirmou as imagens obtidas na avaliação visual e ajudou a explicar com mais clareza os dados obtidos nos ensaios de reologia. O FTIR indicou os grupos estruturais das aminas, estiramento C-H, amidas I e II presentes nas proteínas e as hidroxilas, a estrutura do sacarídeo e ácidos carboxílicos I e II encontrados nos polissacarídeos. A reologia das emulsões sonicadas foi investigada em cisalhamento constante e oscilatório e os resultados indicaram que as emulsões preparadas com proteínas e pectina, apresentaram comportamento newtoniano. Essas emulsões foram formadas por pequenas gotas e se mostraram estáveis, exceto em algumas proporções de SPI, onde houve instabilidade. Emulsões preparadas com proteínas e alginato apresentaram comportamento pseudoplástico e embora com

separação de fases, o creme permaneceu estável no decorrer de 7 dias; houve formação de gotas maiores e o índice de cremeação diminuiu com o aumento de óleo, tendendo a uma emulsão estável para proporção 1:1. A influência dos componentes na instabilidade das emulsões foi comprovada pela análise de composição química. Cremes das emulsões com alginato apresentaram $G' > G''$ em toda faixa de frequência aplicada, indicando ser um material estruturado. Na sequência do trabalho foram realizadas análises do comportamento reológico das emulsões em função de rampas de aquecimento/resfriamento que permitiram identificar o efeito da temperatura nas emulsões e a influência do biopolímero predominante. A microscopia confocal de varredura a laser permitiu identificar a forma física e a distribuição das gotas para cada sistema, que foi comprovada pela análise de distribuição de tamanho de gotas, que apresentou pequenas gotículas para sistemas com pectina e maiores gotas nos sistemas com alginato. Por fim, foi aplicado um homogeneizador de alta pressão de dois estágios nas emulsões com alginato na proporção 1:1 que propiciou a estabilização das emulsões com significativa redução do tamanho de gotículas em relação às emulsões preparadas com ultrassom, diagnosticado por análise visual, microscopia ótica e análise de distribuição de tamanho de gotas, além da redução da viscosidade aparente em ambos sistemas e a permanência de um material estruturado com $G' > G''$ em toda frequência aplicada. Conclui-se que os biopolímeros e os processos de homogeneização utilizados no preparo das emulsões tiveram forte influência na estabilização de emulsões. As emulsões estáveis obtidas sugerem sua aplicação como possíveis substitutos de gordura devido ao baixo teor de lipídeos assim como os cremes são uma alternativa na melhoria de atributos sensoriais de produtos alimentícios devido às características reológicas apresentadas.

Palavras-chave: emulsões O/W, sistemas coloidais, comportamento reológico, métodos de homogeneização, proteínas de soro e soja, polissacarídeos pectina e alginato

ABSTRACT

Systems based on colloidal particles of natural biopolymers are being increasingly used as encapsulation systems, for delivering active ingredients, or to modulate the sensory properties of food. Most of these applications involve a step of emulsification during processing. The hyper-aggregation of the lipid droplets with proteins and polysaccharide can be used to create highly viscous emulsions or gels similar to, but with lower oil content than conventional emulsions. This aggregation is induced by mixing a primary emulsion - with oil droplets stabilized by a protein - and a polysaccharide solution at a pH at which the biopolymers have opposite charges. The application of high intensity ultrasound with the aim of changing functional properties of biopolymers has been widely studied and, in addition, the use of ultrasound is one of methods that allow the preparation of emulsions with reduced droplet sizes. The zeta potential of pure proteins (whey protein concentrate, WPC, soy protein isolate, SPI) and pure polysaccharides (pectin and sodium alginate), was determined searching for the pH value at which the potential for electrostatic interactions are maximum, occurring at pH 3.5. The interaction between polysaccharide-protein pairs (WPC/Pectin, WPC/Alginate, SPI/Pectin e SPI/Alginate) was investigated at pH 3.5 as a function of the protein:polysaccharide ratio (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 and 5:1), with and without ultrasound application. The systems were analyzed by turbidimetry, visual evaluation, optical microscopy, and rheological measurements under steady shear, with adjustment of rheological models, and under oscillatory shear, at 25 °C. After this evaluation, due to the physical characteristics presented systems with and without US application in the protein:polysaccharide ratios 1:1 (without strong phase separation) and 4:1 (with strong phase separation), were selected for FTIR analysis and emulsions preparation. Turbidity values indicated that the application of ultrasound decreased the size of complexes dispersed in the medium, generating a less turbid solution which, consequently, resulted in lower absorbance reading,

except for the pair SPI:PEC. Visual assessment showed formation of complex coacervates that sedimented in the pairs containing alginate, indicating a strong electrostatic interaction between biopolymers. The pairs with pectin did not show sediment formation, but complexes were also formed, however soluble which could indicate miscibility of the biopolymers. The rheological models Law of Power, Sisko and Newton fitted well to the data ($R^2 > 0.9$) according to the characteristics of the samples. The pairs WPC: ALG and SPI:ALG exhibited pseudoplastic behavior ($n < 1$), the consistency index (K) increased with the increase of the proportion of protein, and there was a slight thixotropy. However, the application of ultrasound reduced thixotropy of the pair SPI: ALG because reduced the size of the complexes by minimizing the effects of the applied strain rate. The rheology of the pairs WPC:PEC and SPI:PEC showed that pectin has a different behavior than alginate, presenting predominantly Newtonian behavior. In oscillatory shear tests, with alginate pairs G' was greater than G'' to all pairs along the frequency range applied, indicating a structured viscoelastic material. Optical microscopy confirmed the images obtained in the visual assessment and helps explaining more clearly the data obtained in the rheological tests. FTIR indicated the structural groups of amines, C-H stretch, amides I and II present in proteins, and hydroxyls, saccharide structure and carboxylic acids I and II found in polysaccharides. Rheological testing of sonicated emulsions in steady and oscillatory shear were also performed. Emulsions prepared with proteins and pectin, showed Newtonian behavior and were stable, with small droplets, and no phase separation, except for SPI, in which some proportions showed instability. Emulsions made with proteins and alginate exhibited pseudoplastic behavior and although with phase separation, the cream remained stable over 7 days. There was formation of larger droplets and creaming rate decreased with increasing oil content, tending to a stable emulsion in the proportion 1:1. The components influence on the emulsion instability was confirmed by the chemical composition analysis. Creams from emulsions with alginate showed $G' > G''$ across the frequency range applied, indicating a structured, viscoelastic system. Following work

rheological analyzes were performed on the emulsions in function heating /cooling ramp which allowed to identify the temperature effect on the emulsions and the influence of the predominant biopolymer. The confocal microscopy allowed to identify the physical form and the droplets size distribution for each system that was proven by the droplet size analysis that showed small droplets for pectin systems and larger droplets in alginate systems. Finally, a two-stage high-pressure homogenizer was applied in 1:1 emulsions with alginate, which allowed the emulsions stabilization with significant reduction of droplets size distribution in relation to emulsions prepared with ultrasound, diagnosed by visual analysis, optical microscopy and droplet size analysis, in addition to the apparent viscosity reduction in both systems and the permanence of a structured material ($G' > G''$) at applied frequency. It is concluded that the biopolymers and the homogenization processes used in the emulsions preparation had a strong influence on the emulsions stabilization. The stable emulsions obtained suggest their application as possible fat substitutes due to the lipids content low, as well as the creams are a alternative in the improvement of sensory attributes of food products and in the bioactive compounds microencapsulation due to its presented rheological characteristics.

Keywords: O / W emulsions, colloidal systems, rheological behavior, homogenization methods, whey and soy proteins, pectin and alginate polysaccharides

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As gorduras desempenham diversas e importantes funções no organismo como: prover energia, manter a temperatura do corpo constante, proteger os órgãos vitais, facilitar a absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K e promover o esvaziamento lento do estômago, resultando na sensação de saciedade devido a sua alta densidade energética (9 cal/g). Porém, talvez a mais importante característica da gordura seja a sua contribuição para o apelo sensorial dos alimentos, sendo determinante para a textura dos mesmos. Por outro lado, o consumo de altas quantidades de gordura está relacionado com o aumento do risco da obesidade e de alguns tipos de câncer, sendo que a ingestão de ácidos graxos saturados está associada ao aumento do colesterol sanguíneo e às doenças coronarianas. Esforços são necessários para a redução do consumo de gorduras e os substitutos de gordura podem facilitar o atendimento desse objetivo por oferecer uma maneira segura, efetiva e factível de manter a palatabilidade de alimentos com quantidades controladas de gordura e/ou energia (OSPINA-E et al., 2012; MAO; McCLEMENTS, 2012; PINHEIRO; PENA, 2004).

A preferência dos consumidores por produtos que apresentam reduzido teor de gordura, porém com a mesma textura e sabor agradável do produto tradicional, tem crescido nos últimos anos. Esses alimentos processados são estruturados e estabilizados por um complexo arranjo dos constituintes alimentícios e, dentre estes, as proteínas e os polissacarídeos desempenham um papel chave devido às suas propriedades funcionais tecnológicas e de interação. O desenvolvimento de produtos alimentícios nutritivos e sensorialmente aceitáveis demanda o desenvolvimento de micro e nanoestruturas específicas (NEHIR EL; SIMSEK, 2011; CAVALLIERI, 2007).

Os alimentos são sistemas particulados e dispersos, baseados em estruturas que ocorrem naturalmente ou que são criadas artificialmente através do processamento. Os elementos responsáveis pelas características estruturais que conferem identidade e qualidade aos alimentos incluem células, fibras e agregados proteicos, grânulos de amido, redes de biopolímeros, cristais de gelo, açúcares e lipídeos, gotas de óleos, bolhas e partículas de natureza coloidal. Biopolímeros como proteínas e polissacarídeos são constituintes fundamentais de alguns elementos estruturais dos alimentos e são também capazes de estabilizar outras classes desses elementos. Sistemas de partículas coloidais desenvolvidos com base em biopolímeros naturais vêm sendo cada vez mais usados no processamento de alimentos para aplicação como sistemas de encapsulação ou de veiculação de ingredientes ativos, ou ainda para modular as propriedades sensoriais dos alimentos. A maior parte dessas

aplicações envolve uma etapa de emulsificação durante o processamento (JONES; McCLEMENTS, 2011; AGUILERA, 2005).

A água é um ótimo solvente para os biopolímeros, mas misturas de dois ou mais biopolímeros podem apresentar incompatibilidade termodinâmica, resultando na separação de fases. Em alguns casos, a imiscibilidade leva à formação espontânea de duas camadas, mas em muitos outros casos, a separação de fases induz a uma morfologia de solução macroscopicamente homogênea e que exhibe propriedades reológicas interessantes. Em particular, essas misturas são usadas como substitutos de gordura na formulação de alimentos (CAPRON; COSTEAUX; DJABOUROV, 2001) mas, também podem proporcionar a obtenção de cremes devido à instabilidade das emulsões (PERRECHIL; CUNHA, 2013). Oliveira (2016) avaliou a aplicação de biopolímeros na estabilização de emulsões submetidas ou não ao tratamento ultrassônico e constatou que a fase rica em biopolímeros apresentava a fase óleo emulsificada gerando o creme e concluiu que as gotas encontradas nos cremes sonicados foram semelhantes às de uma emulsão. Assim, esses cremes podem ser aplicados como sistemas de microencapsulação, na melhoria de aspectos sensoriais e no desenvolvimento de novos produtos devido às características reológicas apresentadas e ao seu alto potencial de viscosidade.

A separação de fases em misturas de biopolímeros é sempre acompanhada por alterações no comportamento reológico, que pode diferir bastante do comportamento dos compostos puros, ao mesmo tempo em que o histórico de deformações (por exemplo, durante a agitação ou homogeneização) também pode afetar a reologia do sistema. Vários trabalhos discutem a aplicação de diferentes taxas de cisalhamento na obtenção de microestruturas variadas a partir de misturas de biopolímeros (WINDHAB et al., 2005; VAN DER GOOT et al. 2008; FRITH, 2010).

Várias combinações e diversas técnicas têm sido testadas para obtenção do melhor substituto de gordura englobando todos os aspectos sensoriais, nutritivos e funcionais nos alimentos. Dentre elas, pode-se citar a heteroagregação de gotículas de lipídeos com proteínas e polissacarídeos, processo que pode ser usado para criar emulsões altamente viscosas ou similares a géis, mas com um conteúdo de óleo bem menor que as emulsões convencionais. Essa heteroagregação é induzida pela mistura de uma suspensão de partículas coloidais, isto é, gotículas de óleo estabilizadas por uma camada de proteína (por exemplo, β -lactoglobulina) com uma solução de carboidrato (por exemplo, pectina) em pH no qual a

proteína e o carboidrato apresentam cargas opostas, o que, para os biopolímeros citados, ocorre em torno de $\text{pH} = 4$ (SIMO et al., 2012).

Chung; Degner; McClements (2013) concluíram que as propriedades de uma emulsão com teor reduzido de gordura são influenciadas pelo teor do hidrocolóide (goma locusta) usado como estabilizante. O tamanho das partículas e a viscosidade aparente do sistema aumentaram com o aumento do teor de goma, enquanto a claridade e a estabilidade diminuíram. As alterações nas propriedades físico-químicas das emulsões foram atribuídas a mudanças na microestrutura do sistema, isto é, às interações estruturais das moléculas do hidrocolóide com as gotas lipídicas em suspensão. Em outro trabalho, os mesmos autores avaliaram a reologia e a microestrutura de dispersões de partículas contendo gotículas de gordura e grânulos de amido, onde as gotículas de gordura foram revestidas por surfactantes lipídicos ou proteínas globulares (proteína de soro de leite). Nesse caso, observou-se que a viscosidade aparente aumentou com o aumento do teor de gordura para as gotículas revestidas por proteína e diminuiu para as gotículas revestidas por surfactantes lipídicos (CHUNG; DEGNER; McCLEMENTS, 2012).

A aplicação de ultrassom de alta intensidade com o objetivo de alterar propriedades funcionais dos biopolímeros, tais como viscosidade e gelificação, também vem sendo estudada (ARZENI et al. 2012; GORDON; PILOSOFF, 2010; CAMINO; PÉREZ; PILOSOFF, 2009). Além disso, o uso do ultrassom é um dos métodos que possibilitam a preparação de emulsões com tamanhos de gotas reduzidos (CHANDRAPALA et al., 2012). Mudanças nas condições de aplicação do ultrassom causaram alterações significativas no tamanho das gotas e na estabilidade de emulsões contendo concentrado proteico de soro de leite e gomas guar, locusta ou xantana com reduzido teor de lipídeos: a aplicação de maior nível de energia pelo ultrassom durante a emulsificação resultou em menor tamanho de gotas e menor viscosidade, porém em maior estabilidade (KALTSA et al. 2013). Por outro lado, a homogeneização a alta pressão é mais utilizada para produzir emulsões alimentícias, proporcionando emulsões finas com boa textura e maior estabilidade (DESRUMAUX; MARCAND, 2002).

Com base nas considerações acima, este projeto teve como objetivo avaliar a viscosidade e a viscoelasticidade de sistemas com baixo teor de lipídeos preparados a partir da interação eletrostática de proteínas e polissacarídeos com cargas opostas em diferentes proporções submetidos ou não ao tratamento ultrassônico. Também foi avaliada a aplicação de ultrassom e homogeneizador a alta pressão de duplo estágio na etapa de emulsificação,

buscando a obtenção de emulsões com gotas de tamanho reduzido. Esse estudo permitiu um melhor conhecimento desses sistemas para sua estabilização e possível desenvolvimento de substitutos ou minimizadores de gordura nos alimentos, além de explorar as características dos cremes obtidos e suas diferentes texturas em função dos biopolímeros empregados, da razão lipídeos:biopolímeros possibilitando distintas aplicações.

2- **OBJETIVOS**

Este projeto tem como objetivo geral avaliar as propriedades de escoamento e os parâmetros viscoelásticos de emulsões do tipo óleo em água (O/W) estabilizadas pela interação eletrostática de proteínas (concentrado proteico de soro de leite, WPC, ou isolado proteico de soja, SPI) e polissacarídeos (pectina ou alginato), submetidas ao tratamento ultrassônico ou alta pressão, buscando a obtenção de sistemas com diferentes características de textura.

2.1- **Objetivos específicos**

1. Avaliar a interação entre os diferentes pares de proteína-polissacarídeo (WPC/Pectina, WPC/Alginato, SPI/Pectina e SPI/Alginato) em função do pH e da razão proteína:polissacarídeo, com e sem a aplicação de ultrassom, buscando identificar as microestruturas formadas por meio de microscopia ótica, medidas de potencial zeta, turbidimetria, reologia e FT-IR.

2. Estudar o comportamento reológico de emulsões do tipo O/W (óleo/ água) preparadas com as diferentes combinações de biopolímeros em função do teor de óleo adicionado.

3. Estudar o comportamento reológico de emulsões do tipo O/W preparadas com as diferentes combinações de proteína-polissacarídeo quando submetidas a diferentes rampas de aquecimento/resfriamento.

4. Investigar os efeitos da aplicação de ultrassom sobre as propriedades físico-químicas das emulsões, através de medidas de reologia, distribuição de tamanho de partículas, estabilidade e microscopia.

5. Avaliar os efeitos da homogeneização a alta pressão em emulsões do tipo O/W, estabilizadas pela interação eletrostática entre diferentes proteínas (WPC e SPI) com alginato de sódio no pH 3,5 e proporção 1:1, sobre a estabilidade e o tamanho de gotas em função do teor de óleo adicionado (15, 20 e 25 %).

6. Investigar os efeitos da homogeneização a alta pressão sobre as propriedades físico-químicas das emulsões dos sistemas WPC/Alginato e SPI/Alginato 1:1, através de análises de seu comportamento reológico e de sua morfologia.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- EMULSÕES

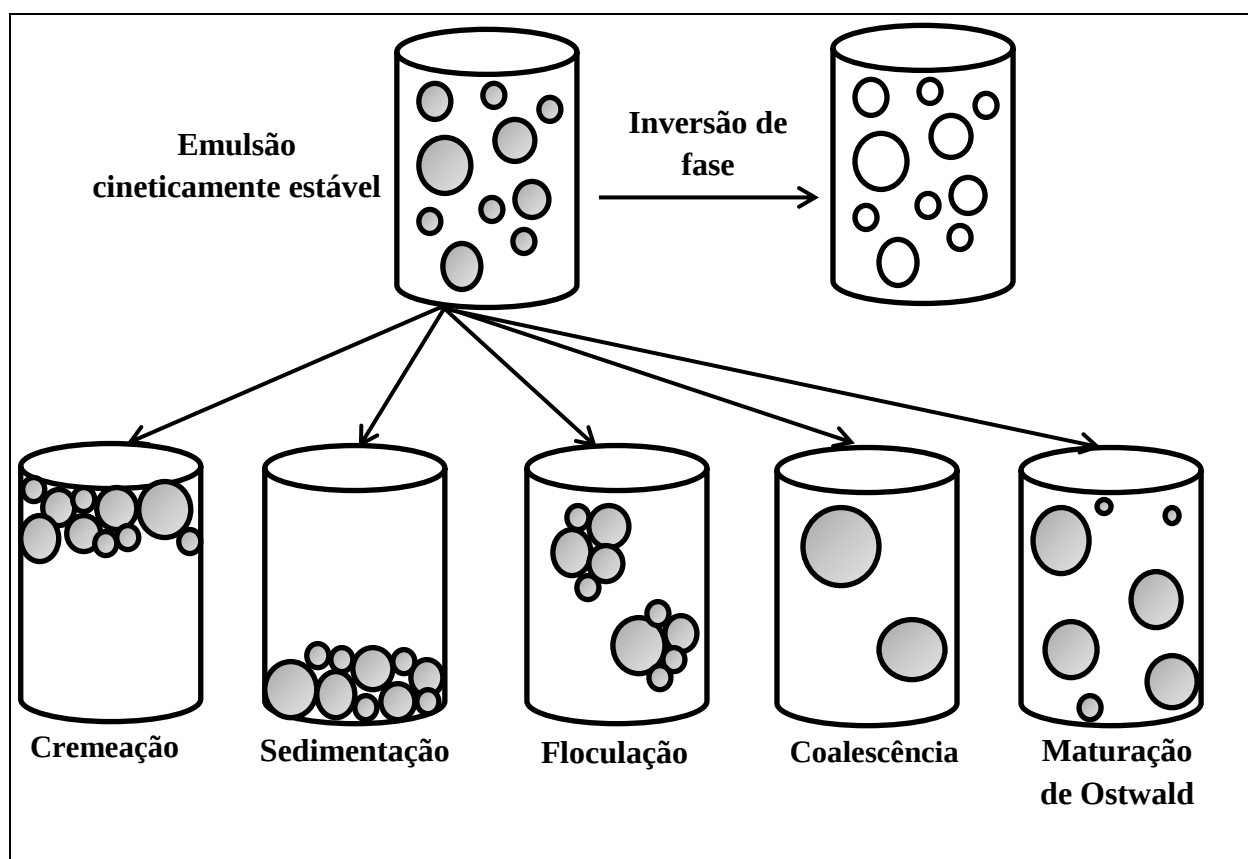
Uma emulsão é composta por dois líquidos imiscíveis (usualmente óleo e água), com um dos líquidos disperso no outro na forma de pequenas gotas esféricas. A substância ou solução que compõe as gotas é chamada de fase dispersa, enquanto o meio dispersante é chamado de fase contínua. As emulsões podem ser classificadas de acordo com a distribuição relativa das diferentes fases. Um sistema formado por gotas de óleo dispersas em uma fase contínua aquosa é chamado emulsão óleo em água (O/A), como é o caso do leite, maionese, sopas e molhos. Já um sistema formado por gotas de água dispersas em uma fase oleosa é chamado emulsão água em óleo (A/O), tendo como exemplos a margarina e a manteiga (McCLEMENTS, 2005a).

Todas as emulsões são termodinamicamente instáveis e tendem a se desfazer com o tempo, resultando em duas fases líquidas separadas. Particularmente emulsões alimentícias podem se tornar instáveis devido diversos mecanismos físico-químicos de desestabilização (DICKINSON, 1992; FRIBERG, LARSSON, SJOBLÖM, 2004; McCLEMENTS, 2005a), incluindo cremação gravitacional, sedimentação, floculação, coalescência e maturação de Ostwald (DICKINSON, 1992) (Figura 3.1). A floculação é um processo no qual as gotas emulsificadas se associam em flocos sem a destruição das gotas individuais. Quando as paredes das gotas são destruídas e existe a formação de gotas maiores, trata-se do processo conhecido como coalescência. A cremação ocorre quando a fase dispersa é menos densa do que a fase contínua, porém não existe coalescência. Já na sedimentação, as gotas são mais densas do que o meio contínuo (HILL, 1996). A maturação de Ostwald é o processo que ocorre a partir da diferença de solubilidade e / ou potencial químico entre partículas pequenas e grandes, gotículas maiores crescem à custa de gotículas menores devido ao transporte de massa de material da fase dispersa através da fase contínua (MEINDERS; VAN VLIET; 2004; SOLANS et al., 2005; McCLEMENTS, 2007; KOUNIARTS; SPINELLI; MANSUR, 2010). A inversão de fase é quando uma emulsão óleo em água muda para uma emulsão água em óleo ou vice-versa. É importante notar que estes vários mecanismos de instabilidade físico-química estão muitas vezes relacionados, uma vez que, por exemplo, o aumento do tamanho de partículas devido à floculação, coalescência ou maturação de Ostwald geralmente levará a uma menor estabilidade das gotículas de encontro à separação

gravitacional, resultando finalmente em cremação ou sedimentação (McCLEMENTS, 2007).

Por se tratarem de sistemas termodinamicamente instáveis, informações sobre a estabilidade cinética das emulsões são importantes para o desenvolvimento de produtos que apresentem propriedades desejáveis por um período de tempo suficientemente longo (DICKINSON, 1992). Assim, emulsões estáveis por períodos consideráveis de tempo (semanas a anos) precisam ter a adição de substâncias que atuem como emulsificantes e/ou estabilizantes e, em muitos casos, a aplicação de forças mecânicas (processo de homogeneização) para promover a diminuição do tamanho de gotas (McCLEMENTS, 2005a).

Figura 3.1. Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/W. Adaptado de McCLEMENTS, 2007.



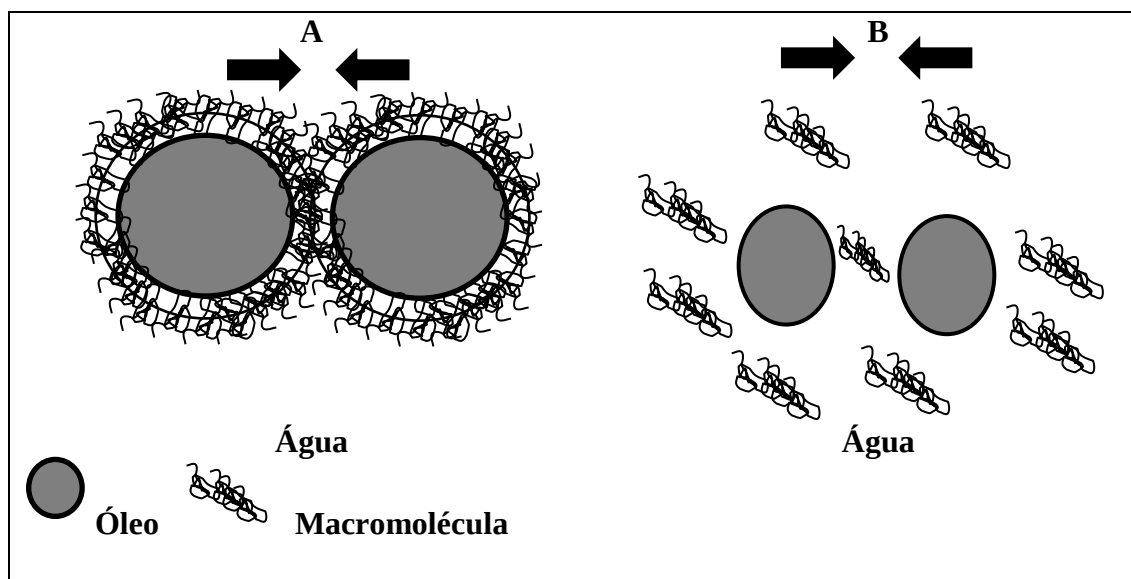
Emulsificantes são moléculas com atividade de superfície que se adsorvem na superfície das gotas dispersas, formadas durante o processo de homogeneização (Figura 3.2). Uma vez presentes na superfície da gota, tais moléculas atuam reduzindo a tensão interfacial e formando uma membrana protetora em sua superfície, prevenindo a agregação das gotas

(McCLEMENTS, 2005a). Existem duas grandes classes de emulsificantes usadas no processamento de alimentos: surfactantes de baixa massa molar (monoglicerídeos, polissorbatos, lecitina, etc.) e emulsificantes macromoleculares (usualmente proteínas, principalmente do leite e do ovo) (DICKINSON, 2003). Emulsificantes de baixa massa molar são bastante utilizados no preparo de emulsões devido a sua atividade superficial. Entretanto, muitas dessas moléculas podem causar malefícios à saúde dos consumidores, podendo ser utilizadas apenas em níveis limitados (poucos miligramas por quilograma corporal por dia) ou são restritas para determinados alimentos. Apenas poucos emulsificantes, tais como lecitina ou mono e diglicerídeos, são geralmente reconhecidos como seguros (“Generally Recognized As Safe” – GRAS) e podem ser utilizados sem qualquer limitação (GARTI; LESER, 2001). Neste contexto, as proteínas surgem como alternativa, já que o seu uso como aditivo alimentício ou como ingrediente em alimentos é permitido sem restrições (PERRECHIL, 2008).

As proteínas são adsorvidas nas gotas de óleo formadas no processo de homogeneização, atuando de duas maneiras: (1) reduzindo a tensão interfacial, e (2) formando membranas protetoras ao redor das gotas (Figura 3.2A). Essas camadas proteicas levam à repulsão entre as gotas devido a uma combinação de interações eletrostáticas e impedimentos estéricos, além de aumentar a resistência à ruptura devido a sua alta viscoelasticidade (McCLEMENTS, 2005a). O fato das proteínas apresentarem algumas dessas propriedades depende do balanço adequado entre tamanho, carga, hidrofobicidade da superfície e flexibilidade molecular (TURGEON et al., 1992).

Já os estabilizantes, tem papel diferente na prevenção de quebra de emulsões dos emulsificantes, por não apresentarem atividade superficial (Figura 3.2B), como é o caso da maior parte dos polissacarídeos. São componentes que conferem estabilidade às emulsões por longo período de tempo (DICKINSON, 1992), sendo representados pelos polissacarídeos, compostos de alta massa molar, como amidos e gomas. A principal ação dos estabilizantes é através de dois possíveis mecanismos: (1) via modificação da viscosidade ou (2) gelificação da fase contínua aquosa (Figura 3.2 B) (DICKINSON, 2003).

Figura 3.2. Ilustração esquemática de gotas de óleo em água estabilizadas por (A) moléculas anfífilas adsorvidas na interface óleo-água (ex. proteínas) e (B) macromoléculas não adsorvidas atuando na modificação da viscosidade da fase contínua (ex. polissacarídeos). Adaptado de GARTI E LESER, 2001



Entretanto, a presença de proteínas e polissacarídeos na fase aquosa das emulsões O/A pode influenciar a estabilidade dos sistemas através de uma variedade de mecanismos (DICKINSON, 2003), por exemplo, a floculação por depleção. Nesse caso, a presença de biopolímeros não adsorvidos na fase aquosa das emulsões causa um aumento nas forças atrativas entre as gotas devido a um efeito osmótico associado com a exclusão dos biopolímeros da estreita região entre as gotas (WALSTRA, 2003; McCLEMENTS, 2000). Essa força se torna maior com o aumento da concentração dos biopolímeros, até eventualmente se tornar maior do que as forças repulsivas e causar então a floculação (PERRECHIL, 2008).

3.2-BIOPOLÍMEROS COMUMENTE APLICADOS COMO EMULSIFICANTES E ESTABILIZANTES

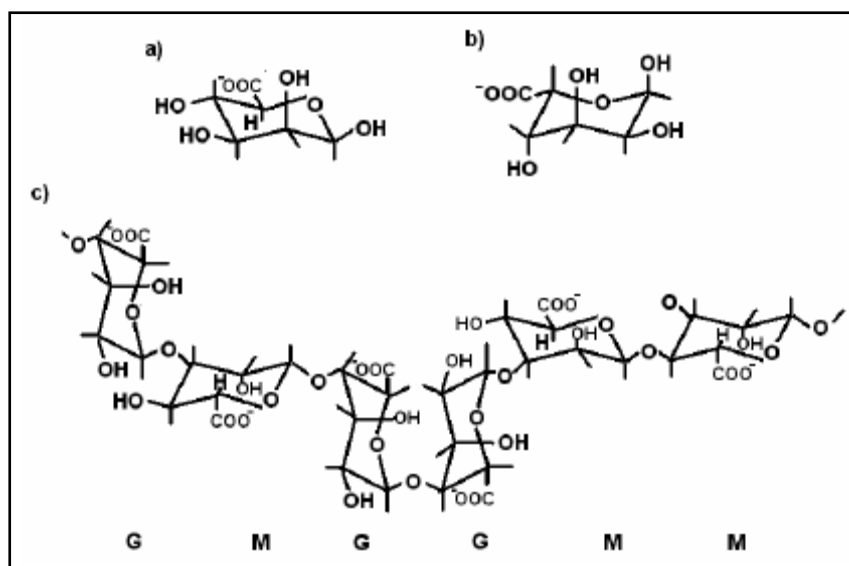
3.2.1- Alginato de sódio

Os alginatos são sais de ácido algínico que ocorrem naturalmente na parede celular das algas marrons (*Phaeophyceae*), como uma mistura de cálcio, magnésio, potássio e sais de sódio, bem como em mucilagens extracelulares segregadas por certas espécies de bactérias (MORRIS, 1998; ANDRADE; ROJAS, 2012). A função de alginato em algas vivas acredita-se estar relacionada a: i) estrutura da parede celular e coesão do tecido; ii) força e

flexibilidade do caule; iii) seletividade de cátions e iv) proteção contra dessecação. O uso comercial do alginato é, basicamente, devido a essas mesmas propriedades (TURBIANI, 2007).

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear, consiste em ligações α (1-4) e é composto por resíduos dos ácidos poli β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G) em proporções e ocorrência sequencial diferentes (STOKKE et al., 2000; DRAGET, SKJÅK-BRÆK, STOKKE, 2006; FERNÁNDEZ FARRÉS, NORTON, 2014) (Figura 3.3). A proporção e o tamanho desses seguimentos variam com a espécie, e interferem nas propriedades e funções dos biopolímeros (TURBIANI, 2007).

Figura 3.3: Estrutura química do alginato de sódio. **a)** ácido β -D-manurônico; **b)** α -L-gulurônico e **c)** alginato.



Fonte: GAVA, 2008.

Além disso, o alginato é um polieletrólito carregado negativamente acima do pH correspondente ao seu pK_a (pH 3,38 – 3,65) e, em baixos valores de pH a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida (SIMSEK-EGE et al., 2003). A distribuição de cargas negativas ao longo da estrutura do alginato em solução aquosa é resultado do arranjo sequencial dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008). Consequentemente, alginatos tendem a ser negativamente carregados por uma faixa extensa de valores de pH (PONGSAWATMANIT; HARNSILAWAT; McCLEMENTS, 2006).

Suas propriedades gelificantes são provenientes de ligações cooperativas de cátions bivalentes com blocos de ácidos gulurônicos. Os íons sódio dos ácidos gulurônicos são

substituídos por cátions bivalentes, usualmente Ca^{2+} , criando junções entre as cadeias e promovendo a formação de uma rede tridimensional, geralmente descrita pelo modelo caixa de ovos (GOMBOTZ; WEE, 1998; BLANDINO; MACIAS; CANTERO, 1999; BAJPAI; TANKHIWALE, 2006; YOO et al., 2006; SILVA et al., 2006; MUKAI-CORREA, 2008).

Características desejáveis como a ação gelificante e espessante, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxidez tornam o alginato de sódio um material interessante para inúmeras aplicações.

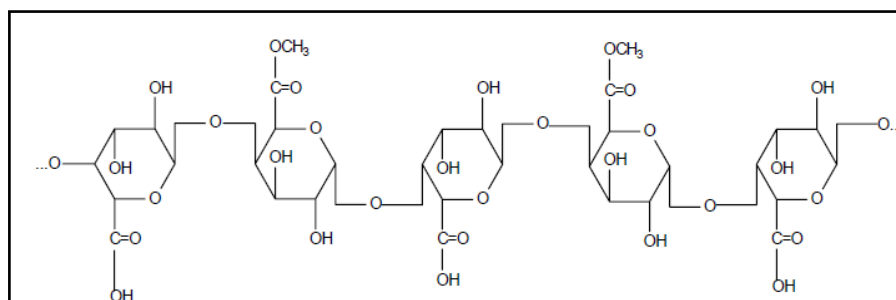
Os alginatos podem ser utilizados como modificadores de viscosidade na fase aquosa para a estabilidade das nanoemulsões, reduzindo o movimento de gotículas, porque são capazes de interagir com cadeias de tensoativos dispostas ao redor das gotículas de óleo, causando impedimentos estéricos e / ou repulsões eletrostáticas entre interfaces das gotículas evitando fenômenos de desestabilização tais como coalescência de gotículas ou separação gravitacional. Na indústria de alimentos, alginato de sódio é extensamente utilizado como estabilizante, espessante ou agente gelificante em produtos como molhos, sopas e bebidas (SALVIA-TRUJILLO et al., 2014; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015; ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017).

Proteínas globulares interagiram com alginato de sódio em soluções aquosas formando complexos solúveis ou insolúveis. Nas emulsões, esses complexos podem produzir sistemas instáveis com cremação e floculação de gotículas, que dependem fortemente do pH da solução, da concentração de alginato de sódio e da sonicação (SOSA-HERRERA et al., 2012).

3.2.2- Pectina

Pectinas consistem de complexos de polissacarídeos estruturais presentes em vários tecidos vegetais, as quais fazem parte de uma variada classe de substâncias denominadas de pécticas. São polissacarídeos aniônicos que consistem de uma cadeia principal de ácido galacturônico parcialmente metil-esterificado, com ramificações de arabinose, galactose e xilose (Figura 3.4), sendo comumente empregados como estabilizantes em bebidas a base de proteínas (COELHO, 2008; LAM; PAULSEN; CORREDIG, 2008).

Dependendo de sua origem, alguns grupos hidroxílicos podem estar acetilados nas posições dois e três, o que pode inferir em sua capacidade de formar géis (BOBBIO, 1989; CHEFTEL; CHEFTEL, 1976; TURQUOIS et al., 1999).

Figura 3.4. Estrutura geral da pectina.

Fonte: BOBBIO, 1989.

A pectina é considerada um coloide por excelência e, em função de seu caráter hidrofílico, devido à presença de grupos polares, apresenta a propriedade de envolver grande quantidade de água, produzindo uma solução viscosa. Em função dessa capacidade, a pectina é amplamente utilizada como espessante, texturizante, agente emulsificante ou estabilizante na produção de geleias, doces de frutas, produtos de confeitaria, sucos de frutas e outros produtos alimentares (BOWERS, 1992). Juntamente com celulose e hemicelulose, a pectina representa uma grande parte da ingestão de fibras alimentares humanas (JARVIS, 2011).

Pectinas usualmente são classificadas em pectinas de baixo e alto teor de metoxilação, sendo que o grau de metoxilação é a porcentagem de resíduos de ácidos galacturônicos que são metil-esterificados (DZIEZAK, 1988). A proporção de metoxilação, ou de grupos carboxílicos esterificados tem um importante papel na capacidade da pectina para formar géis e são tomadas como um parâmetro indicativo para as propriedades físicas e funcionais das pectinas (WONG, 1995). O grau de metoxilação de 50% é o parâmetro de referência: aquelas que são inferiores a este conteúdo, são classificadas como pectinas de baixo teor de metoxilação (LMP), e as que estão acima deste conteúdo, são consideradas pectinas de alto teor de metoxilação (HMP) (TURQUOIS et al., 1999).

Na prática, as pectinas HMP apresentam graus de metoxilação entre 55 e 75%. Essas pectinas caracterizam-se por necessitarem de um teor mínimo de açúcar e de meio ácido (pH 3,2 a 3,8), para a formação de gel, o qual é produzido por aquecimento de média a altas temperaturas antes do resfriamento. O grau de metoxilação das pectinas HMP determina o seu nível de gelificação, sendo mais forte em graus mais elevados de metoxilação (BELITZ; GROSCHE, 1988; CRISTENSEN, 1986). Ao contrário, a LMP não requer a presença de açúcares ou baixos pH's para formar géis. A gelificação da LMP é induzida pela presença de íons Ca^{2+} e é baseada no mecanismo "caixa de ovo", no qual as seções livres de éster das cadeias de pectina são mantidas unidas por interações entre grupos carboxílicos de pectina e íons de cálcio (KUHN; PICONE; CUNHA, 2012).

Comercialmente, as pectinas são extraídas de polpas de maçã e cascas de citros com ácido mineral quente diluído em pH em torno de 2, resultando em um alto grau de metoxilação (DM > 55%). Para aplicações industriais, as pectinas extraídas de polpas de maçã ou cascas de citros podem ser desesterificadas quimicamente ou enzimaticamente, dando origem a LMP (ANDRADE; ROJAS, 2012).

3.2.3- Concentrado proteico de soro de leite (WPC)

O soro de leite é um coproduto da fabricação de queijo e caseína que consiste em proteínas globulares, lactose, sais e gordura, sendo uma fonte significativa de ingredientes funcionais à base de proteínas que podem ser usados em produtos alimentares tradicionais ou inovadores. Concentrados (WPC) ou isolados (WPI) proteicos de soro de leite são ingredientes importantes devido às suas propriedades funcionais desejáveis: solubilidade em água, aumento de viscosidade, gelificação, emulsificação, aeração, melhoria da cor, textura e *flavor*, além do aumento do valor nutricional de formulações (KREŠIĆ et al. 2008).

O WPC é definido como um produto lácteo obtido comercialmente por ultrafiltração, diafiltração e evaporação térmica (*spray drying*), que pode conter de 25 a 80 % de proteína, enquanto o WPI, deve apresentar um conteúdo maior que 90 % de proteína (FOEGEDING et al., 2002; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; CONSIDINE et al., 2011).

As principais frações proteicas do soro incluem a β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactalbumina (α -La) e a albumina bovina sérica (BSA), presentes em concentrações em torno de 3,7; 0,6; e 0,3 g/L, respectivamente, no soro do leite bovino. Essas três frações constituem cerca de 70 % das proteínas do soro e são responsáveis pelas propriedades funcionais do WPC e WPI. Outras proteínas estão presentes em concentrações mais baixas: imunoglobulinas (Ig), lisozima, lipase, lactoferrina e xantina oxidase (ARZENI et al. 2012; DE WIT, 1998; MORR; HA, 1993).

As propriedades físico-químicas do WPC estão diretamente relacionadas à β -Lg e à α -La, por serem as proteínas em maior quantidade no WPC. À temperatura ambiente e em pH fisiológico, apresentam-se na forma de dímeros e pequenos oligômeros, dissociando-se em monômeros com o aumento da temperatura (HOFFMANN; VAN MIL, 1997; NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011).

Proteínas de soro são carregadas positivamente abaixo do seu ponto isoelétrico (pI) e carregadas negativamente para valores de pH acima do seu pI. A β -lactoglobulina apresenta pI entre 4,7 a 5,1, enquanto a α -lactalbumina varia de 4,2 a 4,6 (FOX; KELLY,

2003; COOPER et al., 2005; SANTIPANICHWONG et al., 2008; JONES; McCLEMENTS, 2010a).

As proteínas do soro de leite são altamente solúveis, especialmente quando comparadas ao caseinato de sódio e à proteína de soja, sendo essa solubilidade uma importante propriedade funcional em produtos fluidos e semifluidos. A desnaturação e pequena perda de solubilidade ocorrem quando são submetidas a temperaturas superiores a 60 °C e pH na faixa de 4,6 a 6,0 (UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL, 1997). A temperatura crítica para a desnaturação da β -Lg é de 90 °C e para a α -La é de 80 °C, tornando-se completamente desdobradas após a desnaturação (DE WIT, 2009). A desnaturação aumenta a reatividade entre proteínas, facilitando a ligação com o cálcio, além de interações hidrofóbicas. A reatividade depende da concentração proteica, temperatura, tempo de desnaturação, pH e força iônica (PURWANTI et al., 2011).

Em condições específicas, as proteínas de soro formam géis não reversíveis, os quais aprisionam grandes quantidades de água e compostos não proteicos, originando excelentes propriedades funcionais que auxiliam na formação de produtos com teor reduzido de gordura. As proteínas do soro funcionam ainda como emulsificantes, estabilizando emulsões pela criação de uma camada na interface água-lipídeo, reduzindo a tensão interfacial e prevenindo a coalescência da fase dispersa. A estabilidade de emulsões à base de proteína de soro de leite pode ser aumentada pela adição de polissacarídeos ou por aquecimento a fim de induzir a gelificação de proteínas (PINHEIRO; PENNA, 2004).

Géis de proteínas do soro podem ser formados pela adição de sais, ação enzimática, mudanças no pH ou por aquecimento. Os géis formados por aquecimento são denominados de “termicamente induzidos”. As características da rede proteica do gel irão depender da intensidade dos diferentes tipos de interações entre as proteínas, bem como de suas características (hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, composição aminoacídica, grupos funcionais disponíveis). Por sua vez, essas características serão profundamente influenciadas pelas condições empregadas durante o processo de gelificação (temperatura, pressão, etc) e das características do meio (concentração de proteína, pH e força iônica do sistema) (TOTOSAUS et al., 2002).

3.2.4- Isolado proteico de soja (SPI)

A soja tem sido o principal material usado para produção industrial de concentrados e isolados proteicos, o que se deve, principalmente, a seu alto teor de proteínas e ao bom

desempenho tecnológico dos produtos, além de representar uma alternativa de origem vegetal às proteínas de origem láctica (TOMOSKOZI et al., 2001; MANION; CORREDIG, 2006). O método de obtenção de isolado proteico de soja comumente utilizado inicia-se a partir de uma extração aquosa em pH variando de neutro a levemente alcalino (pH 7-10), visando a separação e remoção da fração insolúvel (polissacarídeos insolúveis e proteína residual) através de centrifugação. O extrato obtido é acidificado para pH 4,5, valor correspondente ao ponto isoeletrico, resultando na precipitação das proteínas, que são separadas por decantação mecânica, lavado e neutralizado, seguido por desidratação (LIU, 1999).

O isolado proteico de soja (SPI) contém pelo menos 90 % de proteínas, sendo virtualmente livre de lipídeos e carboidratos. Dentre as proteínas, as principais componentes são as frações β -conglucina (7S) e glicina (11S) que representam 40 % e 30 % do total de proteínas, respectivamente. Tanto a β -conglucina quanto a glicina possuem ação emulsificante e são capazes de estabilizar emulsões formando uma camada adsorvida na interface óleo/água, sendo mais efetivas em valores de pH distante de seu ponto isoeletrico, que ocorre em torno de 4 (SINGH; MOHAMED, 2007; LAM; PAULSEN; CORREDIG, 2008).

As proteínas podem ser classificadas em relação ao seu coeficiente de solubilidade e sedimentação. Quanto à solubilidade, as proteínas de soja estão divididas em albuminas (solúveis em água) e globulinas (solúveis em solução salina), que se apresentam em maior proporção. De acordo com o coeficiente de sedimentação S (unidade de Svedburg) utilizado para caracterizar a forma da proteína com base em parâmetros hidrodinâmicos, as proteínas da soja consistem em quatro frações designadas como 2, 7, 11 e 15S (LIU, 1999).

A funcionalidade da estrutura da glicina e sua solubilidade são alteradas pelo pH e pela força iônica (LAKEMON et al., 2000). As proteínas da soja revelam uma elevada solubilidade em condições alcalinas (pH >7), que diminui com a acidificação até um pH próximo do ponto isoeletrico (pH $\approx$ 4.5) (RENKEMA; GRUPPEN, VAN VLIET, 2002).

De acordo com Yasumatsu et al. (1972), a solubilidade da maioria das proteínas diminui com o aumento da concentração destas, assim como com a aplicação de forças mais intensas ou centrifugação mais longa. A precipitação das proteínas pelo calor causa desnaturação irreversível na maioria dos casos, e isso resulta na diminuição da solubilidade e, conseqüentemente, muitas propriedades funcionais são destruídas ou prejudicadas por tratamentos com calor.

As principais aplicações do isolado de proteína de soja na indústria de alimentos incluem produtos de padaria e confeitaria, produtos de carne processados, produtos lácteos e fórmulas infantis (SINGH et al., 2008). Porém, ainda são escassos os estudos visando à aplicação do isolado proteico como matriz em produtos microencapsulados, apesar do SPI ser uma fonte renovável e econômica, além da sua capacidade emulsificante, formadora de filmes e características nutricionais benéficas (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE; 2006; ORTIZ et al., 2009).

É importante notar que o uso da proteína de soja como ingrediente depende, principalmente, da sua estrutura e características físico-químicas. De todas estas propriedades, a solubilidade é considerada a mais importante devido à grande influência na gelificação, formação de espuma, emulsificação e capacidade de absorção de água, sendo o principal fator que afeta a aplicação e uso de uma proteína (VOJDANI, 1996). As globulinas de soja têm solubilidade mínima em valores de pH entre 3,75 e 5,25, enquanto que a máxima é observado em pH entre 1,5 e 2,5 e acima pH 6,3 (PEARSON, 1983).

A solubilidade das proteínas em soluções aquosas depende do pH. Para a maioria das proteínas a menor solubilidade se consegue no pI, onde elas possuem carga líquida igual a zero e interação mínima com a água, ocorrendo agregação e precipitação. Nesse ponto é observado que a repulsão eletrostática e hidratação iônica são mínimas, enquanto para valores de pH maiores ou menores que o pI, a proteína apresenta cargas elétricas negativas e positivas, respectivamente, e as moléculas de água podem interagir com estas cargas, contribuindo para a solubilização (DAMODARAN; PARAF, 1997).

Na proteína nativa, a maioria dos grupos polares e apolares não está disponível devido a ligações internas resultantes das forças de van der Waals, intermoleculares e pontes de hidrogênio. A dispersão e o desdobramento da proteína podem ser feitos por hidrólise ou aumento de pH, sendo que acima do pH 10 há um desdobramento da estrutura da proteína que expõe os grupos funcionais (KUMAR et al., 2002). O tratamento até esse pH aumenta a solubilidade da proteína devido à dissociação da estrutura quaternária 11S e 7S (KINSELA, 1979). O SPI contém muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, sendo fisicamente impossível alcançar uma conformação que os esconda da água em um meio aquoso. Dessa forma, com esses grupos apolares expostos ela tende a formar dímeros entre as moléculas vizinhas em solução (DAMODARAN, 2010), viabilizando, por exemplo, a formação de filmes e o aumento de suas propriedades elásticas (sistema mais maleável) (CHO et al., 2007).

3.3- INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS

Uma grande variedade de ingredientes e produtos alimentícios é composta de proteínas e polissacarídeos, contribuindo para a estrutura do sistema através da atividade espessante, gelificante, estabilizante ou interfacial. As propriedades funcionais dos polímeros individuais são relativamente bem caracterizadas no nível molecular, mas, por outro lado, o papel das interações proteínas: polissacarídeos em relação à sua funcionalidade em sistemas multifásicos complexos, como dispersões, emulsões ou géis alimentícios, ainda vem sendo objeto de estudos (RENARD; LEFEBVRE; BOUÉ, 1998; TELIS, 2012).

Misturas de proteínas e polissacarídeos que, em determinadas condições, resultam em separação de fases, são interessantes para a criação de novas estruturas porque a adição de polissacarídeos, mesmo em baixas concentrações, pode criar grandes diferenças na estrutura e nas propriedades reológicas, permitindo grandes mudanças na consistência ou textura somente com pequenos efeitos em outras propriedades organolépticas (RENARD; VAN DE VELDE; VISSCHERS, 2006).

As proteínas têm características anfifílicas e são capazes de adsorver fortemente na interface óleo-água ou água-óleo, sendo comumente usadas na indústria alimentícia como emulsionantes (McCLEMENTS, 1999a; PHILLIPS; WILLIAMS, 2001;). A quantidade adsorvida e a conformação adotada na interface óleo-água vão depender muito da composição de aminoácidos da proteína desde que a adsorção ocorra por meio de grupos hidrofóbicos presentes dentro de sua estrutura. Uma vez adsorvida, as moléculas podem desdobrar-se a fim de maximizar o número de grupos hidrofóbicos que estejam em contato com a superfície, permitindo que os grupos hidrofílicos possam se rearranjar e se projetar para fora da superfície para a fase aquosa. A interação, por vezes, pode ocorrer entre as moléculas adjacentes de proteína adsorvida através de interação hidrofóbica ou formação de ligação dissulfeto, levando à formação de uma camada viscoelástica na interface óleo-água (WOODWARD et al., 2010).

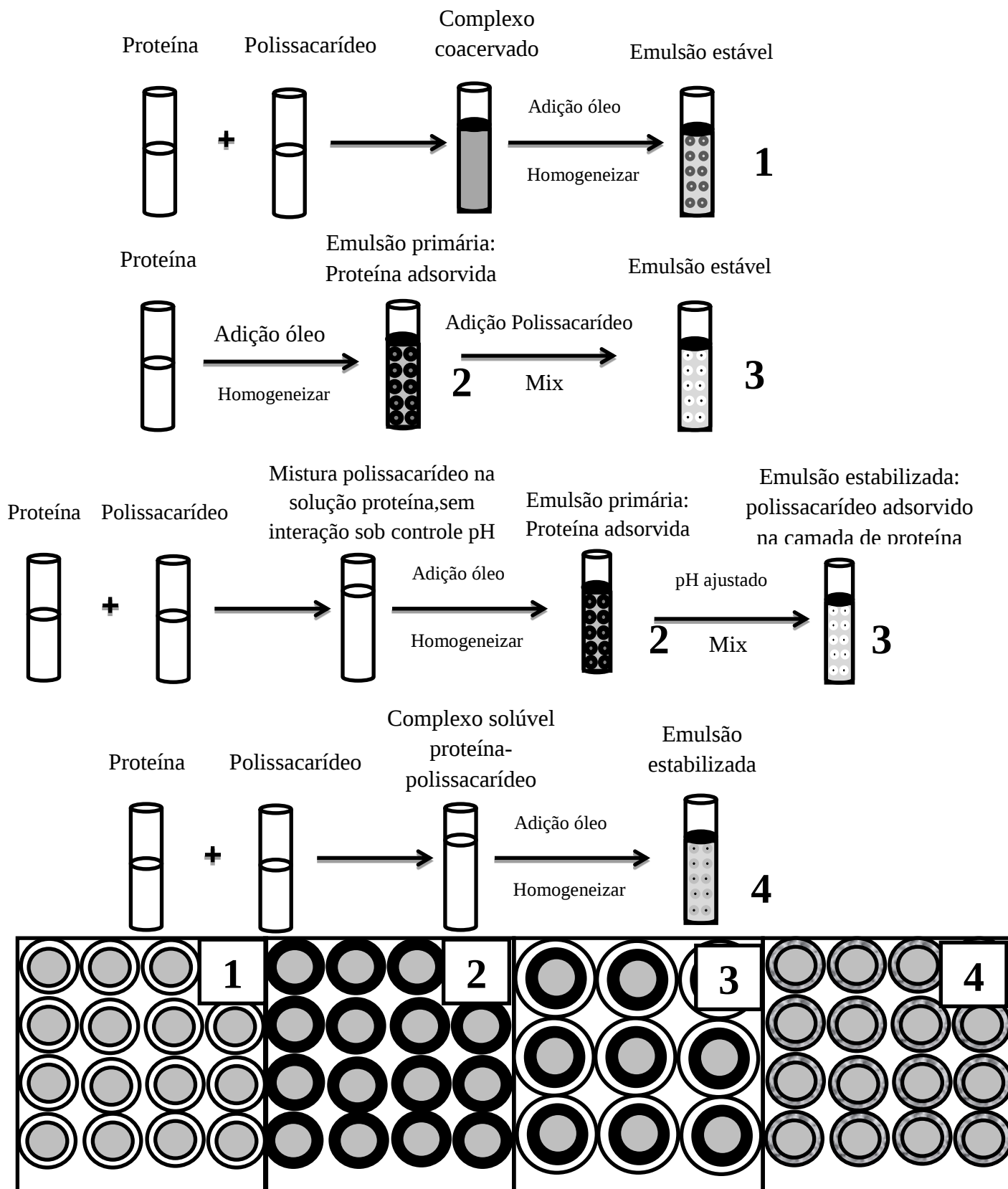
As moléculas de proteína adsorvida são capazes de estabilizar emulsões, impedindo a agregação e coalescência de gotas através de forças de repulsão eletrostática e/ou impedimentos estéricos (McCLEMENTS, 1999a; McCLEMENTS 1999b PHILLIPS; WILLIAMS, 2001; DICKINSON, 2009). No entanto, elas têm limitações como no seu ponto isoelétrico, nas quais as moléculas de proteína têm uma carga líquida zero e, a menos que a espessura da camada adsorvida seja suficientemente grande, a agregação das gotículas ocorrerá (EVANS; RATCLIFFE; WILLIAMS, 2013).

Para evitar a agregação de gotículas ou outros eventos de desestabilização, podem ser adicionados polissacarídeos para estabelecer uma interação associativa com a camada de proteína estabilizadora após a formação da emulsão (DICKINSON, 2003). Há um grande interesse em identificar alternativas de polissacarídeos capazes de complexação espontânea com proteínas e um material que recebeu atenção significativa nos últimos anos é a pectina, em particular a pectina de beterraba (WILLIAMS et al., 2005; FUNAMI et al., 2007; CHEE; WILLIAMS, 2008; CHEE et al.; 2008).

As emulsões estabilizadas por complexos eletrostáticos proteína:polissacarídeo podem ser formadas de diferentes modos. A Figura 3.5 apresenta um esquema de vários métodos adotados para formar emulsões estáveis que usam complexos de proteína:polissacarídeo (EVANS; RATCLIFFE; WILLIAMS, 2013). Tradicionalmente, as emulsões são preparadas utilizando coacervados pré-misturados (Figura 3.5 (1)). Os complexos são formados entre os polissacarídeos aniônicos e proteínas a valores de pH abaixo do seu ponto isoelétrico, em que apresentam uma carga positiva líquida. Uma abordagem, relatada pela primeira vez por Bungenberg de Jong; Kruyt (1929) é a utilização de coacervados proteína:polissacarídeo, como emulsionantes (WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004), embora este procedimento tenha evoluído para o uso de complexos eletrostáticos solúveis Figura 3.5 (4)) (JOURDAIN et al., 2008; MAHENDRAN et al.; 2008).

A segunda abordagem é formar uma emulsão utilizando uma proteína como emulsionante (Figura 3.5 (2)) e, em seguida, adicionar o polissacarídeo, que adsorve sobre a camada de proteína para formar uma bicamada (Figura 3.5 (3)) (LITTOZ; McCLEMENTS, 2008). Uma ligeira variação para este procedimento consiste em adicionar a proteína e polissacarídeo na emulsão ao mesmo tempo, mas a um pH em que não existe qualquer interação (BUNGENBERG DE JONG; KRUYT, 1929). Uma vez que a proteína foi adsorvida em gotas de óleo, o pH pode ser ajustado e o polissacarídeo irá adsorver na camada de proteína formando a bicamada.

Figura 3.5: Representação esquemática de quatro rotas diferentes para a preparação de emulsões estabilizadas por complexos eletrostáticos de proteína:polissacarídeo. Gotinha de óleo interna é protegida por adsorção de (1) coacervado complexo, (2) camada de proteína, (3) camada de proteína com uma camada exterior de polissacarídeo (bicamada) ou (4) complexo solúvel. Adaptado de Evans et al., 2013.



Em muitas misturas de biopolímeros, a contribuição entrópica é frequentemente maior que a contribuição entálpica, de modo que a regra é geralmente a separação de fases. A mistura de proteínas e polissacarídeos em solução aquosa pode resultar em diversos tipos de estruturas, dependendo do tipo de interação existente entre eles. As interações podem ser associativas ou segregativas (Figura 3.6), resultando em três possíveis situações (DOUBLIER et al., 2000):

i) miscibilidade: o sistema permanece homogêneo, não existindo separação de fases. Neste caso, os diferentes biopolímeros agem como se fossem hidrocoloides do mesmo tipo. De acordo com a segunda lei da termodinâmica, a mistura de um ou mais componentes com um solvente é possível se a variação da energia de Gibbs da mistura (ΔG_{mist}), dada pela Equação (1) é negativa. Assim, a mistura de biopolímeros é estável quando a entropia da mistura é elevada, já que a energia de Gibbs é negativamente favorecida (SCHMITT et al., 1998). Este tipo de situação geralmente ocorre em soluções diluídas.

$$\Delta G_{mist} = \Delta H_{mist} - T\Delta S_{mist} \quad (3.1)$$

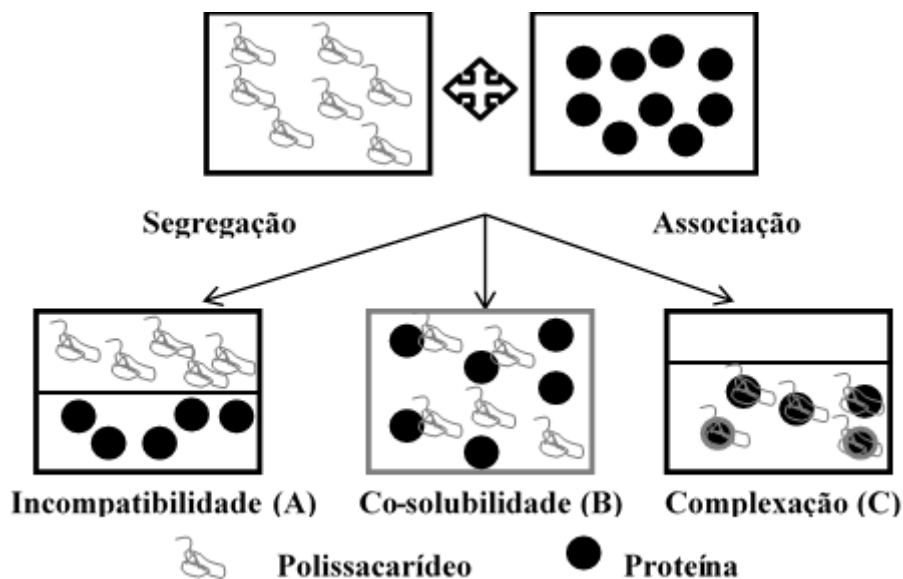
onde ΔH_{mist} e ΔS_{mist} são a entalpia e a entropia da mistura, respectivamente, e T é a temperatura absoluta (K).

ii) incompatibilidade: as interações entre as moléculas dos diferentes biopolímeros serão do tipo repulsivo, favorecendo as interações entre cada biopolímero e o solvente e levando à formação de duas fases, sendo cada uma delas mais rica em determinado biopolímero. Esse mecanismo geralmente ocorre com o aumento na concentração dos biopolímeros ou a agregação de um deles, pois as moléculas tendem a um estado mais organizado na solução, influenciando negativamente a entropia da mistura e levando a valores positivos de energia livre da mistura (PERRECHIL, 2008). A incompatibilidade termodinâmica pode ocorrer para qualquer sistema proteína-polissacarídeo-água, dependendo das condições do sistema, como a concentração de biopolímeros, pH e força iônica (BRYANT; McCLEMENTS, 2000; LANEUVILLE; PAQUIN; TURGEON, 2000; SPAGNUOLO et al., 2005; PERRECHIL, 2008). O efeito dessas condições pode variar com os biopolímeros presentes no sistema (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997).

iii) coacervação complexa é o tipo de interação conhecida como separação de fases associativa e ocorre quando os dois biopolímeros apresentam cargas opostas, o que favorece as interações atrativas entre suas moléculas. Isto leva à complexação entre os polímeros, a qual pode levar ou à formação de complexos solúveis ou a uma separação de fases

associativa. O último caso é caracterizado por duas fases coexistentes, uma delas rica em solvente, com uma baixa concentração de biopolímeros e uma fase rica em biopolímeros chamado coacervado (DOUBLIER et al., 2000). O processo de coacervação é governado pela contribuição entálpica à energia de Gibbs da mistura (DE KRUIF; TUINIER, 2001; PERRECHIL, 2008).

Figura 3.6: Mistura de biopolímeros e vias de interação. Adaptado de DE KRUIF; TUINIER, 2001.



De modo geral, a miscibilidade ocorre em baixas concentrações de polímero, enquanto a incompatibilidade ou a coacervação são observadas em altas concentrações. Existem poucos casos – por exemplo, misturas de albumina de soro e pectina (SEMENOVA et al., 1991) – em que uma genuína e completa miscibilidade é observada em dispersões concentradas de dois biopolímeros. A maior parte dos casos exibe algum tipo de complexação solúvel, coacervação complexa ou co-precipitação amorfa, dependendo da estrutura dos biopolímeros envolvidos e das condições da solução (pH, força iônica, etc.) (DICKINSON, 2003).

Em muitos casos, a separação de fases induz a certa morfologia de solução que pode ser considerada como uma mistura macroscopicamente homogênea, exibindo propriedades reológicas interessantes, em particular, essas misturas são usadas como substitutos de gorduras. Essas fases separadas, mas soluções macroscopicamente uniformes também são chamadas de “emulsões água em água” e não contêm nenhum tipo de surfactante. Estes sistemas podem ser estáveis por horas ou dias e podem ser caracterizados como soluções homogêneas em relação ao seu comportamento com baixa deformação e fluxo. No entanto,

a microestrutura de tais sistemas é dependente do tempo e é afetada por cisalhamento aplicado (CAPRON; COSTEAUX; DJABOUROV, 2001).

A separação de fases em misturas de proteínas e polissacarídeos pode levar à formação de estruturas esféricas na fase dispersa. Seu tamanho pode variar, mas comumente estão entre 2 a 20 μm . Formações de inclusões esféricas sugerem a existência de um nível significativo de energia na interface líquido-líquido desses sistemas (RENARD; VAN DE VELDE; VISSCHERS, 2006). Norton e Frith (2001) observaram que, em misturas de gelatina e maltodextrina, a separação de fases frequentemente leva ao aprisionamento de gotas no interior de outras gotas.

Alguns hidrocolóides alimentícios atingem funcionalidade interfacial em emulsões, não apenas por serem adsorvidos diretamente na interface óleo-água durante a emulsificação, mas por estabelecerem uma interação associativa com a camada estabilizante de proteínas após a formação da emulsão (DICKINSON, 2003). Moschakis; Murray e Dickinson (2005) estudaram a microestrutura de emulsões viscoelásticas estabilizadas por caseinato de sódio e goma xantana e concluíram que o efeito da goma xantana sobre a estabilização da emulsão se deu pelo aumento da viscosidade da fase aquosa, imobilizando as micelas e prevenindo a coalescência e não pela ocorrência de interações entre moléculas de goma e proteína.

Nori et al. (2011) demonstraram ser possível microencapsular extrato de própolis pelo processo de coacervação complexa usando o par SPI:pectina como material de parede. De acordo com Lam et al. (2007) a pectina de alta metoxilação apresentou melhor efeito estabilizante através da formação de complexos com o SPI do que a pectina de baixa metoxilação.

Jaramillo; Roberts e Coupland (2011) observaram que, em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico do SPI, a adição de pectina aumentou a solubilidade da proteína, evitando sua agregação através da interação eletrostática, devido às redes de ligações de hidrogênio favorecidas pela pectina. No mesmo trabalho, verificou-se que os complexos proteína:polissacarídeo formados foram capazes de suportar o tratamento térmico, apesar de algumas modificações em suas propriedades.

De acordo com Schmitt e Turgeon (2011), a formação de complexos por interação eletrostática é afetada por vários parâmetros, principalmente pH, força iônica, razão proteína:polissacarídeo e concentração total de biopolímeros. Também são importantes a massa molar dos polímeros e suas flexibilidade e densidade de cargas, a intensidade de

agitação, a pressão e a temperatura. Interações eletrostáticas ocorrem entre biopolímeros carregados com cargas opostas que interagem entre si. A carga elétrica de um cátion (quitosana ou proteínas do soro do leite) ou ânion (alginato, pectina ou carragena) depende do pH da solução em relação aos valores de pKa ou pI dos grupos ionizáveis (JONES; McCLEMENTS, 2011).

A separação de fases associativa entre proteínas e polissacarídeos tem importância em sistemas biológicos, como na organização de células vivas, interação de DNA com proteínas de transcrição, ligação da heparina, ácido hialurônico e sulfato de condroitina com proteínas (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004) e afeta as propriedades de produtos alimentícios como no caso de leites acidificados, quando ocorre a formação de complexos entre a pectina e a caseína (WEINBRECK et al., 2003). Como processo, se aplica a processamento de alimentos (HOSSEINI et al., 2013; KAZMIERSKI; WICKER; CORREDIG, 2003; HUANG et al., 2012), microencapsulação de ingredientes ativos ou cosméticos, e produção de substitutos de gordura (CASAROTTI; JORGE, 2010; FIORAMONTI et al., 2015; MOHAMMADI et al., 2016), estabilidade de emulsões (CHO; McCLEMENTS, 2009; KALTSA et al., 2013) e filmes (SHIH; CARUSO, 2001).

Assim como as proteínas do leite, as proteínas da soja apresentam funcionalidade limitada em condições ácidas, isto é, em pH próximo ao seu ponto isoelétrico, mas a adição de polissacarídeos como pectina de alta metoxilação ou alginato de sódio pode melhorar sua estabilidade por meio de interações eletrostáticas. Polissacarídeos solúveis extraídos da soja mostraram-se capazes de aumentar a estabilidade de emulsões O/W preparadas com SPI em pH ácido (TRAN; ROUSSEAU, 2013). O uso de homogeneização a alta pressão foi capaz de produzir emulsões nanométricas utilizando esse mesmo par proteína:polissacarídeo (YIN et al. 2012).

3.3.1- Fatores que influenciam a separação de fases

Muitos fatores físicos, químicos, processos de homogeneização e condições de processo influenciam a separação de fases na coacervação complexa e na estabilidade das emulsões, entre elas: pH, força iônica, temperatura, agitação, pressão, tempo, biopolímeros, tipo polissacarídeo. Há um forte interesse da indústria alimentícia no uso de diferentes processos e condições físicas e químicas para a melhoria dos biopolímeros, da interação eletrostática entre proteína e polissacarídeos e do seu uso na estabilização de emulsões. As tabelas 3.1 e 3.2 apresentam um resumo das publicações na área nos últimos anos.

Tabela 3.1: Estudos avaliando o efeito de diferentes processos de homogeneização e fatores nas características dos biopolímeros e na obtenção de complexos por biopolímeros aplicados em diferentes processos alimentares.

Componentes	Ultrassom de alta intensidade (US)	Alta Pressão	Variáveis	Conclusões	Referências
WPC, SPI e proteína branca de ovo (EW)	20 kHz, 4.27 W; 20 % amplitude	-	pH, agitação, tempo	US causou impacto nas propriedades funcionais das proteínas.	Arzeni et al. 2012
b-lactoglobulina (β -lg) e Alginato de sódio	24 kHz, 200 W, amplitude 50 e 100 %	-	Temperatura, tempo, amplitude	US teve efeito na interação entre os biopolímeros.	Hosseini et al. 2013
β -lg, pectina HMP e pectina modificada	-	-	Proporção de biopolímeros, pH, temperatura	Diferentes pectinas ocasionaram diferentes interações com proteínas.	Kazmierski; Wicker; Corredig, 2003
β -lg, pectina HMP e LMP	-	-	Proporção de biopolímeros, pH, temperatura	Tipo de pectina e temperatura influenciaram na interação com proteínas.	Girard; Turgeon; Gauthier, 2002
WPI	20 kHz, 20 % amplitude	-	Temperatura, concentração WPI	US gerou obtenção de pequenas partículas de WPI tratadas com US.	Gordon; Pilosof, 2010
β -lg, alginato de sódio	-	-	Proporção de biopolímeros, pH	Interação entre os biopolímeros gerou a obtenção de complexos solúveis ou insolúveis.	Harnsilawat; Pongsawatma-nit; McClements, 2006a
SPI	20kHz, 0-600 W, 15 e 30min	-	Potencia, tempo, duração do pulso	US reduziu as interações e aumentou a solubilidade do SPI.	Hu et al., 2013
SPI (7S e 11S)	20 kHz, 400 W		tempo	US teve maior efeito na fração 7S na propriedade emulsificante e redução de partículas.	Hu et al., 2015

SPI, quitosana	-	-	pH, temperatura, força iônica, Proporção de biopolímeros	Máxima complexação do biopolímeros no pH 6-6,5, 25°C.	Huang et al., 2012
SPI, SPC	20 kHz	-	frequência	Alteração na textura dos sistemas tratados com US.	Jambrak et al., 2009
SPI, pectina	-	-	Proporção de biopolímeros, pH, temperatura	Aumento da solubilidade com tratamento térmico e utilização da pectina.	Jaramillo; Roberts; Coupland, 2011
β -lg, pectina HMP e LMP	-	-	pH, temperatura, carga	Formação de complexos por aquecimento com diferentes polissacarídeos.	Jones et al., 2010
β -lg, pectina HMP e LMP, carragena	-	-	pH, temperatura, tipo de polissacarídeo	Menores partículas apresentaram maior área de recobrimento, reduzindo a agregação	Jones; Decker; McClements, 2010
WPC, WPI	20 kHz, 15 min, 43-48 W/cm ²	500 MPa	-	Variação das propriedades reológicas e termofísicas em diferentes homogeneizadores devido à composição proteica.	Kresic et al. 2008
SPI, pectina HMP e LMP	-	21 MPa, 2 passes	Concentração de SPI	Pectinas HMP associaram-se mais facilmente com proteínas no pH 3,8.	Lam et al. 2007
Caseína	35 ou 135 kHz, 200 W	-	Frequência	Maior eficiência com US sonoquímico. Redução da turbidez das soluções e diâmetro das micelas.	Madadlou et al., 2009

Pectina, SPI, extrato própolis	-	-	pH, concentração	Possível encapsular extrato de própolis com SPI e pectina por coacervação.	Nori et al., 2011
SPI, alginato de sódio	-	-	Proporção de biopolímeros	Adição excessiva de alginato gerou separação de fases.	Pan et al., 2015
Alginato de sódio, κ- carragena, WPC,	-	-	Concentração de polissacarídeos,	Interação entre os biopolímeros teve efeito na interface ar-água e na formação de espuma.	Perez et al., 2009a
Proteína isolada de canola, goma arábica	8000 rpm. 5 min	-	Proporção de biopolímeros, pH	A proporção de biopolímeros e pH influenciou fortemente a coacervação.	Stone; Teymurova; Nickerson, 2014

Tabela 3.2: Estudos sobre a interação entre biopolímeros aplicados na estabilização de emulsões avaliando o efeito de diferentes processos de homogeneização e fatores.

Componentes	Ultrassom de alta intensidade (US)	Alta Pressão	Variáveis	Conclusões	Referências
Óleo de girasol, Hidroxipropilmetil-celulose (HPMC),	20 kHz, 20 % amplitude	-	Peso molecular, concentração, tempo de agitação, proporção de óleo: HPMC	O US induziu a formação de aglomerados de HPMC mas não modificou os parâmetros e temperatura de gel.	Camino; Perez; Pilosof, 2009
Óleo de milho, β-lg e pectina	-	3000/300 psi, 5 passes, dois estágios	Concentração de gotículas, pectina, pH	O modelo teórico simples pode ser utilizado para prever a estabilidade das emulsões.	Cho; McClements, 2009
Óleo de canola WPI, grânulos de amido	-	2200 psi, 1 passe, dois estágios	Conteúdo de óleo, tipo de emulsificante	Aumento da tensão inicial com todos emulsificantes. Coalescência e separação de fases	Chung; Degner; McClements, 2012

Óleo de canola, Goma de alfarroba (LBG), tween 80	-	5000 psi, 4 passes, dois estágios	Concentração LBG	Cremeação e separação de fases em concentrações intermediárias LBG.	Chung; Degner; McClements, 2013
Óleo de soja, WPI, lactoferrina, poliglicerol Poliricinoleato	-	41,4 MPa, três passes	-	Aumento das propriedades reológicas das emulsões com elevação de T° e interação	Iqbal et al., 2013
Óleo de oliva, WPC, gomas xantana, alfarroba e guar	20 kHz	-	Um estágio, dois estágios, amplitude, tempo, Tipo do polissacarídeo	Variação nas condições US resultou em mudanças no tamanho da gota de óleo e na estabilidade das emulsões.	Kaltsa et al., 2013
Óleo de linhaça, WPI	-	20-100 MPa, 1-7 ciclos, dois estágios	Pressão, ciclos	Aumento de ciclos formou agregados aumentando a viscosidade das emulsões e o aumento de pressão gerou oxidação lipídica devido aumento de T°.	Kuhn; Cunha, 2012
Óleo, WPI, proteína de soja (7S,11S)	-	-	Tipo e concentração de proteína, temperatura,	Temperatura, ordem de adição, tipo e concentração das proteínas modulou as propriedades físico- químicas das emulsões.	Manion; Corredig, 2006
β-Ig ou lactoferrina Gotas de lipídeos revestidas	-	5400 psi/ 600 psi, 4 passes, dois estágios	Proporção de duas emulsões, pH, força iônica	Variáveis influenciaram na força do gel e o tratamento térmico aumentou a força do gel devido desnaturação proteica e atração das gotas.	Mao; McClements, 2012
Óleo de soja, caseinato de sódio, κ- carragena	-	30 MPa / 5 MPa, dois estágios	pH, concentração	Emulsões estáveis em maior concentração de κ- carragena nos pHs 7,0 e 3,5.	Perrechil; Cunha, 2013

Óleo de milho, β -lg ou lactoferrina, gotas de lipídeos revestidas	-	82 MPa, 5 passes, dois estágios,	pH, força iônica	Emulsões com gotículas revestidas por proteínas tiveram boa estabilidade ao pH, sal e processamento térmico. Podem ser digeridas usando um modelo de digestão in vitro.	Schmelz et al., 2011
Óleo de milho, β -lg, pectina		3000 psi/300 psi, 5 passes, dois estágios	Concentração de pectina, razões polímeros-partículas, pH	Influência da proporção e pH nas emulsões. A presença de pectina teve pouco impacto na microestrutura ou na taxa de digestão de lipídeos.	Simo et al., 2012
Óleo de linhaça, goma arábica	-	-	Temperatura do ar de entrada, conteúdo sólido total e concentração de óleo	Maior conteúdo sólido e menor concentração de óleo levou a maior eficiência de encapsulamento e menor oxidação lipídica.	Tonon; Grosso; Hubinger, 2011
Óleo de soja, SPI, polissacarídeos solúveis de soja (SSPS)	-	40 MPa, 4 passes	pH, força iônica, concentração SSPS	Tanto a dispersão como a estabilidade da emulsão dependeram muito do pH, da força iônica e da concentração de SSPS.	Tran; Rosseau, 2013
Óleo de soja, proteína e polissacarídeo de soja	-	850 bar, 3min	Proporção proteína: polissacarídeo, pH, tempo de armazenamento, aquecimento	As emulsões apresentaram estabilidade a longo do tempo com a fixação do polissacarídeo.	Yin et al., 2012
Óleo de linhaça, alginato de sódio, WPI	20 kHz, 75 % amplitude, 150s	-	Concentração de alginato, pH	pH influenciou na interação e estabilização das emulsões. Aumento de alginato diminuiu agregação das gotas.	Fioramonti et al., 2015

Óleo de milho, β -lg, alginato, carragena e goma arábica		4500 psi/400 psi, 3 passes, dois estágios	pH, temperatura, proporção de polissacarídeo	Emulsões foram estáveis quando a concentração de polissacarídeo foi suficiente para saturar as gotículas revestidas com proteína.	Harnsilawat; Pongsawatmanit, McClements, 2006b
Óleo de girassol, caseinato de sódio, alginato de sódio, cloreto de cálcio	-	-	Concentração de polissacarídeos, sistema aquoso e emulsões	Comportamento Newtoniano, porém, a adição de cloreto de cálcio induziu o comportamento pseudoplástico e estabilizou as emulsões	Sosa-Herrera et al., 2012
Óleo extra virgem, WPI, Tween 20, pectina	-	200 bar, 8 min, 1 passe	Proporção WPI:Tween	Adição de pectina como segunda camada em maiores concentrações aumentou a estabilidade das emulsões devido a maior viscosidade.	Kaltsa et al., 2014
Óleo de soja, WPI, pectina HMP	-	200/50 bar, dois estágios	pH, proporção de biopolímeros	A pectina teve efeito estabilizante nas emulsões com proteínas, tanto abaixo quanto acima do pI da proteína, desde que sua precipitação eletrostática fosse evitada.	Neyrinck et al., 2007
Óleo de soja, caseína, LBG	-	10-60 MPa, dois estágios	Homogeneização a alta pressão, pH, Concentração goma de alfarroba	Todos mecanismos foram eficientes para retardar a separação de fases das emulsões. O uso de caseinato de sódio foi essencial para estabilizar as emulsões, promovendo interações repulsivas eletrostáticas entre gotículas.	Perrechil; Cunha, 2010

Óleo de peixe, β - conglucina, pectina HMP	-	500/3000 psi, 3 passes	alto cisalhamento, homogeneiza- ção, deposição camada por camada, complexo 7S- HMP	Emulsões estáveis com menor tamanho de gotícula foram produzidas por alto cisalhamento seguido por homogeneização (500 ou 3000 psi). Distribuição mais difusa de 7S na camada adsorvida das gotículas de emulsões produzidas pelo complexo 7S-HMP.	Xiang; Lyu, Narsimhan; 2016
--	---	------------------------------	---	--	-----------------------------------

3.3.1.1- pH

O pH influencia o grau de ionização dos resíduos de aminoácidos das proteínas, os grupos amino e o carboxílico (SINGH; BURGESS, 1989; BURGESS, 1990). Considerando que complexação entre proteínas e polissacarídeos geralmente resulta de interações eletrostáticas entre macromoléculas carregadas com cargas opostas, o pH do meio aquoso é manipulado para atingir a concentração máxima de cargas opostas. Existe um aumento na auto associação das moléculas de proteína à medida que o pH se aproxima do pI da proteína, porque a diminuição do pH resulta em uma diminuição gradual das forças repulsivas eletrostáticas entre as moléculas de proteínas (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 1999).

Geralmente, espera-se que haja um aumento na incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos à medida que o pH se aproxima do pI (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 1999). Em pH abaixo do ponto isoelétrico, as moléculas de proteína têm uma carga total positiva, isto é, elas se comportam como polications. Os polissacarídeos aniônicos que contêm grupos carboxílicos, por sua vez, atuam como poliânions e, na presença de proteínas, são capazes de formar complexos eletrostáticos com pH variando de 2 a 5. Estes complexos são geralmente reversíveis quando o pH é aumentado acima do pI da proteína. As proteínas oligoméricas também podem formar complexos em pH's acima do pI da proteína, de acordo com as diferentes cargas de suas subunidades (GALASKA et al., 1999; PRATA, 2006).

Na caracterização de interações de β -lactoglobulina-alginato de sódio em soluções aquosas, o pH mostrou que a β -Lg interagiu com alginato de sódio formando complexos solúveis ou insolúveis dependendo do pH da solução. Quando os biopolímeros tiveram

cargas opostas, complexos insolúveis foram formados devido à forte interação eletrostática e complexos solúveis foram formados a um pH onde a proteína tinha uma pequena carga líquida (pH 5,0), mas o alginato de sódio foi carregado negativamente (HARNASILAWAT; PONGSAWATMANIT; McCLEMENTS, 2006a). Comportamento semelhante foi relatado por outros autores mostrando a importância do pH nas interações entre biopolímeros (KAZMIERSKI.; WICKER; CORREDIG, 2003), nas propriedades físico-químicas (SCHMELZ, et al., 2011; SESSLER; WEISS; VODOVOTZ, 2013) e na estabilização de emulsões (SIMO et al., 2012).

3.3.1.2- Força iônica

A auto-associação das moléculas de proteína também aumenta na presença de altas concentrações de sal (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 1999). A influência da adição de sal na compatibilidade dos sistemas pode ser explicada através dos efeitos de “salting in” e “salting out”. Em baixas concentrações de sal (ou baixa força iônica), os íons dos sais interagem com as cargas das proteínas, resultando em um aumento da solubilidade das mesmas (“salting in”), pois as forças repulsivas (eletrostáticas) são suficientemente fortes para superar as componentes atrativas (das interações van der Waals e hidrofóbicas). Entretanto, quando são adicionadas maiores concentrações de sal, existe uma diminuição da solubilidade proteica (“salting out”) devido a uma competição entre a proteína e os íons de sal pelas moléculas de água, fazendo com que a água se torne um solvente pobre para as proteínas, o que resulta em auto associação das mesmas, pois se a atração eletrostática está enfraquecida as interações repulsivas sozinhas não são suficientemente fortes para evitar que as gotículas entrem em proximidade (SCHMELZ, et al., 2011; CHEFTEL et al., 1996). Normalmente, ocorre um aumento na incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos, à medida que a força iônica aumenta (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 1999). No entanto, quando os biopolímeros estão em pH ideal para interação, há formação de complexos, sendo que esses complexos geralmente são reversíveis quando a força iônica excede 0,2 mol/L e 0,5 mol/L (GALAZKA et al., 1999; PRATA, 2006).

3.3.1.3- Razão proteína: polissacarídeo

Em relação à concentração dos biopolímeros no meio, o principal fator que determina o limite de concentração para a separação de fases é o volume de exclusão. É considerado

que o volume de uma solução ocupada por uma macromolécula não está acessível para outras macromoléculas. Desta forma, existe um aumento da limitação espacial quando ocorre a transição de uma solução diluída para uma solução semi-diluída. Isso ocorre porque nas soluções diluídas, as macromoléculas individuais não estão em contato umas com as outras, enquanto que nas soluções semi-diluídas, as moléculas interagem e competem pelo mesmo espaço (TOLSTOGUZOV, 1999).

Assim, a separação de fases geralmente ocorre quando a concentração total de biopolímeros excede certo valor crítico que corresponde ao regime de soluções semi-diluídas (PERRECHIL, 2008).

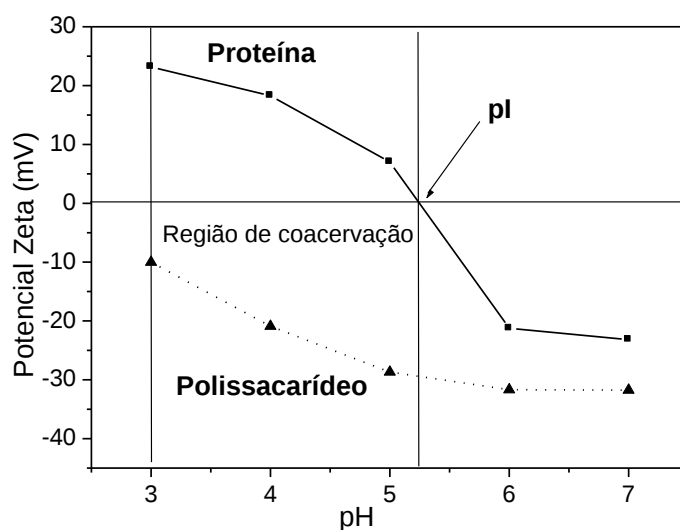
A conformação, a carga global dos reagentes e a flexibilidade do biopolímero influenciam a estequiometria dos complexos eletrostáticos proteínas-polissacarídeos e suas propriedades dependem da proteína da proporção em massa proteína:polissacarídeo (TOLSTOGUZOV, 2003; JONES; McCLEMENTS, 2011; EVANS; RATCLIFFE; WILLIAMS, 2013). Devido a limitações topológicas, proteínas globulares e cadeias de polissacarídeos aniônicos rígidos não conseguem contato entre todos seus grupos carregados. Ao contrário, estruturas de proteínas desdobradas (caseína, gelatina e algumas globulinas desnaturadas em meio ácido) tendem a fazer o máximo contato com polissacarídeos de cargas opostas. No entanto, proteínas com uma estrutura desdobrada usualmente formam complexos insolúveis eletricamente neutros, onde as cargas dos componentes são mutuamente neutralizadas. Em outras palavras, a quantidade de complexos neutros e insolúveis formados entre uma proteína desdobrada e um polissacarídeo aniônico é conduzida por neutralização de cargas opostas. Isso significa que a estequiometria dos complexos depende do valor do pH do sistema e da proporção entre os reagentes macromoleculares, porém independe da quantidade inicial de reagentes macromoleculares. Assim, quando o pH diminui, os complexos insolúveis são enriquecidos com polissacarídeos aniônicos. Depois da precipitação de complexos insolúveis de uma composição constante correspondente a certo pH, o excesso de um biopolímero permanece em solução (TOLSTOGUZOV, 2003).

Jones e McClements, (2011) avaliaram a influência desses parâmetros na obtenção e nas propriedades dos complexos em diferentes proporções de biopolímeros e concluiu que, em baixa proporção de massa de proteína:polissacarídeos, os complexos eram estáveis à agregação. Já em alta proporção de massa, houve auto associação de proteínas e neutralização de carga dos complexos devido ao conteúdo proteico. A estabilidade das

emulsões multicamadas preparadas com WPI e alginato de sódio para encapsular óleo de linhaça foi dependente da concentração de alginato de sódio e o grau de floculação diminuiu quando a concentração inicial de polissacarídeos aumentou (FIORAMONTI, et al., 2015).

A Figura 3.7 mostra um complexo insolúvel enriquecido em polissacarídeo quando o pH é reduzido abaixo do pI da proteína. Isto ocorre devido a um aumento na carga total da proteína e uma diminuição na do polissacarídeo. Uma proporção equivalente entre os reagentes macromoleculares corresponde ao máximo rendimento de complexos eletricamente neutros e os complexos insolúveis podem ser formados em soluções diluídas (menor que 0,01%) de reagentes macromoleculares. A proporção entre os biopolímeros influencia a carga e as propriedades dos complexos obtidos, mas ela tem mais influência sobre a solubilidade dos complexos (PRATA, 2006).

Figura 3.7: Distribuição de cargas dos biopolímeros e região de cargas opostas indica região de coacervação



3.3.1.4- Tipo do polissacarídeo

Jones e McClements (2011) relatam que polissacarídeos de diferentes fontes têm diferentes características moleculares, como peso molecular, conformação, hidrofobicidade e densidade de carga. São esperadas que essas diferenças nas características moleculares influenciem o modo que as moléculas de polissacarídeo interagem com as moléculas de proteínas globulares. Os mesmos autores realizaram experimentos com diferentes tipos de polissacarídeos catiônicos e aniônicos em combinação com β -lactoglobulina. Para todos os tipos de polissacarídeos aniônicos a turbidez dos complexos aumentou quando o pH foi reduzido a aproximadamente 5, embora tenham ocorrido diferenças consideráveis no perfil

turbidez-pH, dependendo do tipo de polissacarídeo. A pectina com alto teor de metoxilação apresentou um aumento significativo da turbidez em menor pH do que a xantana, a carragena e a pectina de baixa metoxilação, o que foi atribuído à baixa densidade de carga de HMP. Baseado nesses resultados, os autores consideraram que o tipo de polissacarídeo tem um maior impacto na complexação eletrostática, o que seria esperado levando-se em consideração as diferenças conhecidas em suas características elétricas.

Einhorn-Stoll et al. (2005) investigaram a reação do isolado de proteína de soro e caseinato de sódio com pectinas de alta ou baixa metoxilação. Os conjugados foram preparados em diferentes proporções de mistura de proteína:polissacarídeo. Eles observaram que o fator que afetou a estabilidade das emulsões foi a proteína escolhida e não o grau de metoxilação da pectina. A atividade emulsificante da proteína de soro de leite melhorou a emulsão e sua estabilidade após a conjugação com a pectina. Mas, o desempenho de caseinato de sódio foi mais pobre após a conjugação. Possivelmente, isso ocorreu porque a proteína de soro de leite tem uma estrutura globular tornando-se mais aberta em pH 7, permitindo que a reação ocorra, ao contrário do caseinato de sódio (EVANS; RATCLIFFE; WILLIAMS, 2013).

Frações de proteína de soja (7S e 11S) apresentaram diferenças nas propriedades emulsionantes e como elas interagem com o isolado proteico soro presente na fase aquosa (PINHEIRO; PENNA, 2004). A interação entre β -Lg, LMP e HMP mostrou que os grupos carboxílicos permitem uma maior complexação da proteína com pectina de baixa metoxilação do que com pectina de alta de metoxilação (GIRARD; TURGEON; GAUTHIER, 2002).

3.3.1.5- Parâmetros físicos do processo

Vários estudos têm reportado o efeito de fatores físicos como velocidade de agitação, pressão e temperatura no comportamento da coacervação e estabilização de emulsões (LAMPRECHT; SCHÄFER.; LEHR, 2001; GIRARD; TURGEON; GAUTHIER, 2002; HOSSEINI et al., 2013; FIORAMONTI et al., 2015).

i) Temperatura: Emulsões preparadas com WPI e frações proteicas de soja (7S e 11S) mostraram agregação após aquecimento e variação na distribuição do tamanho das gotículas (MANION; CORREDIG, 2006), bem como o aumento da temperatura de secagem resultou em maior oxidação lipídica na microencapsulação do óleo de linhaça por spray drying (TONON; GROSSO; HUBINGER, 2011), sendo que a desnaturação proteica ocorreu após

o tratamento térmico da emulsão, formando filmes interfaciais óleo-água de complexos de proteína de soja:polissacarídeo de soja (YIN et al., 2012). Para complexos o aumento da temperatura, juntamente com o conteúdo total de polímeros, possuía um efeito sinérgico na separação de fases (KELLY et al., 1994). Ela favorece as interações hidrofóbicas e covalentes e sua redução (baixas temperaturas) favorece as pontes de hidrogênio (STAINSBY, 1980). As interações hidrofóbicas são aumentadas pela exposição dos grupos reativos pela desnaturação térmica das proteínas globulares e as mudanças na conformação da estrutura do polissacarídeo. A redução da temperatura também influencia a interação dos biopolímeros, pois diminui a agitação térmica (SCHMITT et al., 1998). Complexos isolado proteico de soja:pectina (SPI:PEC) foram mais solúveis após o tratamento térmico em torno de pI (pH 4 e 5), mas em pH 3 o tratamento térmico reduziu a solubilidade dos complexos SPI: PEC indicando que a estrutura foi modificada pela temperatura (JARAMILLO; ROBERTS; COUPLAND, 2011).

ii) Agitação e Pressão: A aplicação de uma pressão hidrostática facilita a formação dos complexos e emulsões. De fato, o tratamento conduz à desnaturação parcial das proteínas e permite a exposição de grupos reativos, inicialmente escondidos na molécula (DICKINSON; PAWLOWSKI, 1997). No caso de altas pressões dinâmicas, elas reduzem o tamanho dos complexos por ação das forças de turbulência, cavitação e cisalhamento (LE HÉNAFF, 1996). Emulsões preparadas com WPI e homogeneizadas em altas pressões apresentaram boa estabilidade e a aplicação a 20 MPa mostrou uma distribuição monomodal das partículas, mas um aumento na pressão para 80 MPa e um maior número de passagens levou a uma distribuição bimodal, indicando a coalescência de gotículas (KUHN; CUNHA, 2012). Kaltsa et al. (2013) avaliaram dois métodos de sonicação em emulsões: único estágio e dois estágios, o método com dois estágios foi capaz de diminuir ainda mais o diâmetro médio das gotículas em todas as formulações, produzindo assim gotículas menores. A duração do cisalhamento também influencia o tamanho do complexo e das gotículas. Em maiores tempos de tratamento, há mais chances de colisões e maior quantidade de complexos atingirem pequenos tamanhos (SCHMITT et al., 1998) e pequenas gotículas coacervadas (PRATA, 2006).

3.4- REOLOGIA DE EMULSÕES E MISTURAS DE BIOPOLÍMEROS

A morfologia, propriedades superficiais, e volumes de fase de uma mistura líquida de duas fases são conhecidos por influenciar as propriedades de fluxo de diversas maneiras. Claramente, o mesmo deve acontecer em soluções mistas de biopolímeros; a questão é que para valores muito baixos de tensões interfaciais em tais sistemas, vemos efeitos mensuráveis, e existem fatores especiais associados com o comportamento de tais materiais. A maioria dos estudos reológicos realizados tem de buscar dados para destacar as semelhanças entre os comportamentos de soluções mistas de biopolímeros e misturas de polímeros ou sistemas de emulsão. No entanto, é de se esperar que haja aspectos do comportamento de soluções mistas de biopolímeros (um sistema de três componentes), e as emulsões ou misturas de polímeros (ambos os sistemas de dois componentes) que serão distintos. Provavelmente a maioria das diferenças surgiria de interações entre o fluxo aplicado e o comportamento de fase da mistura, que espera ser diferente para dois e três componentes do sistema. É conhecido que a aplicação de fluxos ou aceleração pode ter efeito no comportamento de fase da solução mista de biopolímeros, mas como esta interação afeta a reologia tem recebido pouca atenção e merece estudo mais aprofundado (FRITH, 2010).

O conhecimento das propriedades reológicas em emulsões é muito importante por diversos motivos. A eficiência de ruptura das gotas em um homogeneizador e a vida de prateleira de emulsões alimentícias, por exemplo, dependem da viscosidade dos componentes individuais. Além disso, informações sobre a reologia de emulsões são utilizadas pelos engenheiros de alimentos para o dimensionamento de operações que dependam do modo como o produto escoar como, por exemplo, escoamento através de uma tubulação, agitação, passagem através de um trocador de calor e embalagem em recipientes (MCKENNA; LYNNG, 2003). Muitos dos atributos sensoriais também estão diretamente relacionados com as propriedades reológicas como, por exemplo, cremosidade, espalhabilidade e dureza. Finalmente, as medidas reológicas são frequentemente utilizadas como uma ferramenta analítica para fornecer informações fundamentais sobre a organização estrutural e interações entre os componentes em emulsões (McCLEMENTS, 2005a).

Emulsões alimentícias são materiais estruturalmente complexos que podem exibir diferentes comportamentos reológicos, variando desde fluidos de baixa viscosidade (leite), géis viscoelásticos (iogurtes), até sólidos bastante duros (manteiga sob refrigeração). Entretanto, apesar da diversidade de comportamentos reológicos exibidos pelas emulsões alimentícias, é possível caracterizar seu comportamento reológico a partir de poucos

modelos simples: sólidos, líquidos e plásticos (RAO, 1999). Assim, sistemas muito complexos podem então ser descritos pela combinação de dois ou mais desses modelos simples (McCLEMENTS, 2005a).

Muitas emulsões alimentícias, entretanto, não são nem líquidos puros e nem sólidos puros, apresentando propriedades reológicas que são parcialmente elásticas e parcialmente viscosas (WALSTRA, 2003).

A escolha da taxa de deformação a ser utilizada no cálculo da viscosidade aparente é de fundamental importância, considerando que ela representa os processos que ocorrem na formulação de emulsões alimentícias, como agitação, escoamento através de tubulação, cremação de uma gota individual de emulsão, ou mastigação de um alimento (Tabela 3.3) (McCLEMENTS, 2005a). Os ensaios oscilatórios em cisalhamento são particularmente úteis para caracterizar a conformação macromolecular e interações intermoleculares em solução (SANTANA, 2009).

Torrezan (2007) avaliou os efeitos do processamento a alta pressão por métodos dinâmicos e isostáticos nas propriedades funcionais da proteína de soja e suas misturas com polissacarídeos. Avaliando as propriedades reológicas observou que nos experimentos realizados com o equipamento a alta pressão isostática o módulo de dissipação (G'') foi o componente dominante, exibindo portanto, um comportamento predominantemente viscoso.

Tabela 3.3: Taxas de deformação típicas observadas em alguns processos relevantes em alimentos

Processo	Taxa de deformação (s^{-1})
Agitação	10^1 a 10^3
Bombeamento	10^0 a 10^3
Spray drying	10^3 a 10^5
Fricção	10^2 a 10^4
Mastigação	10^1 a 10^2
Sedimentação	10^{-6} a 10^{-4}

Fonte: BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; STEFFE, 1996.

A avaliação das propriedades reológicas na interface ar-água de filmes formados pela interação de SPI e pectina de alta metoxilação mostrou que a adição da pectina aumentou o módulo de elasticidade interfacial em relação aos filmes formados apenas pelo SPI, efeito que foi atribuído à formação de complexos proteína-polissacarídeo (Piazza et al., 2009).

Mao e McClements (2012) induziram a heteroagregação de partículas pela mistura de uma emulsão O/W estabilizada pela β -lactoglobulina com uma segunda emulsão O/W

estabilizada por lactoferrina em pH 7, isto é, na condição em que tais proteínas possuem cargas opostas. O tamanho das partículas e a reologia do sistema foram afetados pela razão entre partículas carregadas positiva e negativamente, pelo pH, força iônica e temperatura do meio.

Weinbreck et al. (2004) estudaram as propriedades reológicas de coacervados de proteína de soro de leite/goma arábica em função do pH e observaram que o pH desempenha um papel importante na viscosidade da fase coacervada. Uma viscosidade máxima foi encontrada em pH 4,0, que é o pH no qual as interações eletrostáticas entre a proteína e o polissacarídeo foram mais fortes.

Simo et al. (2012) avaliou o comportamento reológico de dispersões coloidais de misturas de proteínas cobertas por gotas lipídicas e moléculas de pectina variando o pH e a concentração de polímeros. Em pH 4,0 houve atração das moléculas de pectina na superfície da proteína e um aumento na viscosidade e formação de gel foi observado. Em pH 7,0 as moléculas de pectina não foram atraídas, mas, ainda ocorreu um aumento na viscosidade da emulsão e um gel resistente em concentração crítica de pectina.

Marfil (2014) avaliou misturas de gelatina e alginato de sódio em diferentes proporções e pH's para obter um possível sistema de microencapsulação de óleo de palma por coacervação complexa. Observou que a viscosidade dos coacervados diminuiu com o aumento da taxa de deformação, caracterizando um comportamento pseudoplástico. De acordo com De Kruif, Weinbreck e Vries (2004), a fase coacervada é uma fase líquida com uma estrutura dinâmica, reversível com a deformação e, a partir de um ponto de vista reológico, se comporta como uma dispersão de partículas viscosas do que como uma solução de polímero viscoelástico concentrado. Além disso, uma maior viscosidade foi observada nos pH's 3,0 e 3,5 para algumas proporções indicando que essas condições corresponderam a um alto grau de complexação entre os biopolímeros avaliados, ou seja, maior intensidade na formação de coacervados (MARFIL, 2014).

3.5- EFEITOS DO ULTRASSOM E DA ALTA PRESSÃO NA MICROESTRUTURA DE SISTEMAS COMPLEXOS

As principais vantagens observadas nas emulsões obtidas pela aplicação de ultrassom são a boa estabilidade com a pouca adição de surfactantes e o pequeno tamanho das partículas em suspensão, além de apresentarem uma distribuição bastante estreita de tamanhos de gotas.

Para esse tipo de aplicação, a frequência é um fator importante: apenas o ultrassom de alta intensidade e baixa frequência (16 – 100 kHz) é capaz de produzir emulsões (CHANDRAPALA et al., 2012; LERTSUTTHIWONG et al., 2008; MONGENOT; CHARRIER; CHALIER, 2000).

O efeito do ultrassom é relacionado à ocorrência de agitação, aquecimento, tensões de cisalhamento e turbulência, mas os maiores efeitos em meios líquidos são atribuídos ao fenômeno de cavitação, o qual resulta da criação, crescimento e colapso de microbolhas de gases dissolvidos no líquido devido à compressão e expansão das moléculas do meio. As altas pressão e temperatura atingidas nas vizinhanças dos pontos de cavitação são a base para fenômenos decorrentes da aplicação do ultrassom. O rápido colapso das bolhas produz forças de cisalhamento grandes o suficiente para romper ligações covalentes em materiais poliméricos que estejam dissolvidos no meio (ARZENI et al., 2012; PINGRET; FABIANO-TIXIER; CHEMAT, 2013).

Camino, Pérez e Pilosof (2009) estudaram as alterações moleculares e funcionais da hidroxi-propil-metil-celulose (HPMC) decorrentes da aplicação de ultrassom de alta intensidade e concluíram que houve a formação de agregados transientes dependentes da concentração. Por outro lado, não houve alteração da funcionalidade do biopolímero em emulsões O/W e nem de suas propriedades de formação de gel. Foram observadas mudanças de viscosidade em dispersões de HPMC de alta massa molar, indicando alterações estruturais o que não foi observado para HPMC de baixa massa molar.

Os efeitos da aplicação de ultrassom de alta intensidade sobre a funcionalidade de diferentes proteínas, incluindo WPC, SPI e clara de ovo, foram avaliados por Arzeni et al. (2012) que observaram modificações em propriedades funcionais como gelificação, viscosidade e solubilidade decorrentes de modificações moleculares, principalmente o aumento da hidrofobicidade e variações no tamanho das partículas, mas tais alterações dependem da natureza da proteína e do seu grau de desnaturação e agregação.

Gordon e Pilosof (2010) aplicaram ultrassom de alta intensidade em dispersões de proteínas de soro de leite para controlar o tamanho das partículas e obter micropartículas e observaram que em temperatura ambiente o tamanho das partículas atingiu 0,2 µm, enquanto na temperatura de gel do soro o tamanho das partículas ficou entre 0,1 e 10 µm; na temperatura de desnaturação da proteína diferentes efeitos foram observados, de acordo com a concentração das dispersões de proteína.

Hosseini et al. (2013) estudaram as interações entre β -lactoglobulina e alginato de sódio, sendo este último submetido ou não à aplicação de ultrassom. Verificou-se que o ultrassom causou despolimerização do polissacarídeo, dependendo da amplitude, tempo e temperatura da sonicação. As propriedades das partículas formadas por interação eletrostática foram afetadas pela sonicação e pela concentração de alginato.

Estudos mostram algumas alterações nos parâmetros de qualidade dos produtos alimentícios tratados por ultrassom como mudança de cor, diminuição no teor de açúcar e modificação de menores componentes, por exemplo, a degradação de flavonoides como antocianinas e de ácido ascórbico (PINGRET; FABIANO-TIXIER; CHEMAT, 2013).

Mudanças na viscosidade e formação de estruturas insaturadas foram observadas após sonicação de casca de milho solúvel em água os autores sugerem que essas mudanças nas propriedades moleculares são devido a recombinação dos radicais livres formados nos componentes aromáticos e no sacarídeo induzida por sonicação dos polissacarídeos (EBRINGEROVÁ, HROMÁDKOVÁ, 1997). Mudanças na viscosidade também foram observadas em *mousse* de chocolate preparados por tratamento com ultrassom (PINGRET et al., 2011).

O procedimento de emulsificação usando o ultrassom é uma das primeiras técnicas da indústria de alimentos. A cavitação das bolhas nos dois líquidos imiscíveis resulta em uma eficiente mistura das duas fases, gerando emulsões mais estáveis quando comparados com técnicas convencionais (MASON; PANIWNKY; LORIMER, 1996). Além dessa vantagem, apresenta a possibilidade da redução do tamanho dos glóbulos de gordura com distribuição homogênea em tempo reduzido.

Vários métodos de homogeneização e emulsificação são avaliados no processamento de alimentos. No entanto, com o aumento da demanda na inovação dos produtos dessa linha, o ultrassom tem sido altamente aplicado para estes propósitos, com bons resultados (PINGRET; FABIANO-TIXIER; CHEMAT, 2013). Maionese tratada por ultrassom mostrou excelente cor, resultando em pequenos tamanhos de gotículas quando comparado com as técnicas convencionais (PATIST; BATES, 2008).

Em contrapartida, a homogeneização a alta pressão tem sido amplamente utilizada, principalmente para produzir emulsões alimentícias, proporcionando melhor estabilidade (DESRUMAUX; MARCAND, 2002). Nesse processo, a combinação de intenso cisalhamento, cavitação e condições de escoamento turbulento conduzem ao rompimento das gotículas de gordura (McCLEMENTS, 2005a). A diminuição no tamanho médio das

gotículas de gordura reduz a velocidade de formação de creme e aumenta a estabilidade da emulsão (DESRUMAUX; MARCAND, 2002).

Uma comparação do diâmetro médio de gotas versus potência aplicada usando diferentes equipamentos emulsionantes mostrou que o menor diâmetro de gotas foi obtido com homogeneizadores de alta pressão (TADROS, 2009).

Kuhn e Cunha (2012) avaliaram a estabilidade de emulsões provenientes do isolado proteico de soro e óleo de linhaça preparadas por homogeneização em diferentes pressões e com diferentes números de passagens (1-7) e observaram que, independentemente do número de passagens, todas as emulsões mostraram boa estabilidade, sem sinais de separação de fases. Além disso, as imagens de microscopia ótica mostraram que o aumento da pressão de homogeneização e do número de passagens ocasionou a diminuição do tamanho das gotas. No entanto, em altas pressões, o aumento no número de passagens pareceu promover a coalescência.

O tratamento a alta pressão também tem sido utilizado para avaliar o efeito nas propriedades estruturais e de agregação do isolado proteico de soja. Em nível de pressão inferior (por exemplo, 200 MPa) resultou na formação de agregado insolúvel de SPI, enquanto o tratamento em maior nível de pressão (por exemplo, 600 MPa) conduziu a transformação de agregado insolúvel para solúvel (TANG; MA, 2009).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- MATERIAIS

Os biopolímeros utilizados foram pectina de alta metoxilação (70 %) (PEC), alginato de sódio (ALG) (Dupont™ Danisco® Brasil Ltda.), isolado proteico de soja (SPI) com 91 % de proteínas (SUPRO® 780, Tovani Benzaquen Ingredientes) e concentrado proteico de soro (WPC) com 76 % de proteínas (Alibra Ingredientes®). Para o preparo das emulsões foi utilizado óleo de soja comercial (Liza®). O ajuste de pH para análises de turbidimetria e potencial zeta foi realizado com solução de ácido clorídrico 1N e hidróxido de sódio 1N e medido com auxílio de um pHmetro digital (TECNAL / Tec-3MP).

A solução tampão de McIlvaine (Fosfato dissódico – ácido cítrico) foi preparada segundo Morita e Assumpção (2007) e utilizada para preparo das soluções estoque dos biopolímeros.

4.2- MÉTODOS

4.2.1- Determinação da umidade

O conteúdo de umidade dos biopolímeros foi obtido pelo método da AOAC (2005) e a determinação foi feita em triplicata. A umidade foi determinada indiretamente, por subtração do conteúdo de umidade em base seca.

4.2.2 Preparo das soluções estoque

Soluções estoque de proteína (WPC) e polissacarídeos (PEC e ALG) ambas na concentração de 2 % (0,02 kg / kg) foram preparadas em solução tampão de McIlvaine em pH $3,50 \pm 0,05$, mantidas em agitação por 3 horas e deixada em repouso por 12 horas a 25° C para garantir completa hidratação.

A solução estoque de SPI foi preparada em duas etapas: na primeira etapa a proteína foi solubilizada em uma terça parte de água destilada do peso da solução total, em pH = 11,0 ajustado com NaOH (1 N); após solubilização, a massa total da solução foi completada e ajustada com tampão McIlvaine no pH $3,5 \pm 0,05$. Todas as soluções foram adicionadas de azida de sódio (0,03 %) para prevenir o crescimento microbiano (Fluxograma em APÊNDICE A).

Por constatar em testes iniciais que não houve separação de fases no pH 3,5 a 25°C com a pectina de alta metoxilação, foi testado o preparo das soluções WPC e PEC no pH 4,0 em diferentes temperaturas e com a pectina de baixa metoxilação afim de averiguar os

distintos comportamentos e o que poderia ser melhor para estabilização de emulsões. Após avaliação, foi dada continuidade com o pH 3,5 a 25 °C.

4.2.3 Preparo das suspensões (complexos sem óleo)

Sistemas mistos foram obtidos pela mistura de massa apropriada das soluções estoque de proteína e polissacarídeo, com uma quantidade de biopolímeros total fixada em 2,0 % (p/p), de modo a resultar nas concentrações desejadas de cada biopolímero. As misturas de proteína:polissacarídeo (WPC:PEC; WPC:ALG; SPI:PEC e SPI:ALG) nas proporções 1:1; 2:1; 3:1; 4:1 e 5:1, com e sem aplicação de ultrassom foram preparadas em triplicata e transferidas para tubos de ensaio. Todas as amostras permaneceram em repouso por no mínimo 24 horas para que ocorresse a interação entre os biopolímeros (Fluxograma em APÊNDICE B). Para as amostras sonicadas, as soluções estoques foram levadas em ultrassom (Sonic Ruptor 4000, Omni International, EUA) a uma frequência de 20 kHz por 5 minutos de forma contínua com potência de 320 W. Para evitar o superaquecimento das amostras durante a sonicação foi utilizado um mecanismo de resfriamento por circulação de água em camisa de vidro, mantendo as amostras em temperatura ambiente.

4.2.4 Preparo das emulsões

Após avaliação da interação das diferentes proporções dos biopolímeros (complexos) (item 4.2.3), devido à diferença de interações observadas, as proporções 1:1 e 4:1 de todos os pares foram selecionadas para o preparo das emulsões, de forma que na proporção 1:1 houve interação sem forte separação de fases e na proporção 4:1 houve interação com acentuada separação de fases. As soluções estoque utilizadas no preparo das emulsões não foram levadas ao ultrassom ou ao homogeneizador a alta pressão.

Emulsões óleo em água (O/W) foram preparadas conforme Kaltsa et al., (2013) com algumas modificações, nas proporções proteína:polissacarídeo 1:1 e 4:1 com quantidade de biopolímero total fixada em 2,0 % (p/p) na solução aquosa. Diferentes teores de óleo foram utilizados entre a pectina e o alginato, pois em testes iniciais das emulsões foi constatado que nos sistemas com alginato o aumento de volume da fase dispersa (óleo) ocasionou redução na fase contínua (água), gerando menores índices de cremeação e maior tendência à estabilidade. Dessa forma, óleo de soja (5, 10 e 15 % para sistemas com pectina e 15, 20 e 25 % de óleo para sistemas com alginato em relação à massa total da emulsão) foi disperso na solução de proteína com agitador ultra turrax (T-25, IKA, Alemanha) por 4 minutos a

15000 rpm. Em seguida, a quantidade desejada de solução de polissacarídeo foi misturada à emulsão, a qual foi agitada por mais 4 min na mesma velocidade. As emulsões foram então levadas ao ultrassom na frequência de 20 kHz por 1 minuto de forma contínua, com potência de 120 W, a sonda foi imersa 1 cm abaixo da superfície da emulsão. Para evitar o superaquecimento foi feito conforme item 4.2.3.

Emulsões dos sistemas WPC:ALG e SPI:ALG na proporção 1:1 com 15, 20 e 25 % de óleo de soja apresentaram forte tendência à estabilidade. Por este motivo, a fim de avaliar o efeito de diferentes processos de homogeneização na estabilização, após preparo no ultraturrax, essas emulsões também foram avaliadas com homogeneizador a alta pressão de duplo estágio com 400 bar no primeiro estágio e 40 bar no segundo estágio.

Finalmente, as emulsões foram transferidas para tubos de ensaio e mantidas em repouso por 48 horas (Fluxograma em APÊNDICE C).

4.2.5- Determinação do potencial zeta

Soluções puras dos biopolímeros a 0,2 % (0,002 kg/kg) foram investigadas em relação à carga de superfície conforme Marfil (2014). Um volume de 30 mL de cada biopolímero foi transferido para béqueres e o pH foi ajustado na faixa de pH 3 a 7 ($\pm 0,05$) com HCl 1N e NaOH 1N, a 25°C, utilizando um Zeta Plus Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Soluções foram preparadas com e sem a aplicação de ultrassom, conforme item 4.2.3, totalizando 40 amostras. As leituras foram feitas em triplicata.

4.2.6- Turbidimetria

A formação de complexos proteína:polissacarídeo e das soluções puras foi investigada por análise de turbidez em pH $3,5 \pm 0,05$ em função da proporção proteína:polissacarídeo (1:1; 2:1; 3:1; 4:1 e 5:1), com e sem aplicação de ultrassom, com quantidade de polímero total fixada em 0,05 %, sendo o pH ajustado com NaOH 1N ou HCl 1N. As medidas foram feitas em espectrofotômetro (SP-22, Biospectro, Brasil) em 590 nm (ANTONOV, ZUBOVA, 2001; PRATA, 2006; MARFIL, 2014), usando água deionizada como referência. A leitura de absorbância foi feita imediatamente após o ajuste do pH, de modo a evitar o efeito de possível precipitação dos complexos formados. As leituras foram feitas em triplicata.

4.2.7- Avaliação visual

Foram preparados sistemas mistos (complexos sem óleo) e emulsões dos diferentes pares e proporções de biopolímeros em tubos de ensaio conforme descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.4. Fotos de todos os tubos de ensaio foram registradas para posterior avaliação. As fotos dos complexos, foram obtidas após 24 horas de repouso, enquanto no caso das emulsões o registro fotográfico foi feito após 48 horas.

4.2.8- Propriedades reológicas

Ensaio reológico em cisalhamento constante e em cisalhamento oscilatório dos complexos (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e 5:1) e emulsões (1:1 e 4:1) dos quatro pares foram realizados em um reômetro rotacional AR-2000EX (TA Instruments, Delaware, USA), utilizando geometria do tipo placas paralelas ranhuradas (40 mm) de acordo com Albano, Franco e Telis (2014). Para os complexos utilizou-se gap de 300 μm (WPC:PEC e SPI:PEC) e 500 μm (WPC:ALG e SPI:ALG), segundo as características das amostras, e gap de 400 μm (WPC:PEC e SPI:PEC) e 500 μm (WPC:ALG e SPI:ALG) para as emulsões, conforme análise preliminar do tamanho das partículas dispersas. Amostras foram inseridas no reômetro com auxílio de uma pipeta Pasteur. O sistema ficou em equilíbrio por 2 minutos para a amostra atingir a temperatura de medição (25 °C). Após o equilíbrio, as medições reológicas foram iniciadas. Posteriormente, a média das medidas obtidas no reômetro foi calculada.

4.2.8.1- Cisalhamento estacionário

O comportamento reológico dos complexos e das emulsões foi avaliado obtendo-se curvas de tensão cisalhamento $\times$ taxa de deformação ou viscosidade aparente $\times$ taxa de deformação, a partir de duas rampas, sendo a primeira rampa descendente (100 a 0,1 s⁻¹) e a segunda rampa ascendente (0,1 a 100 s⁻¹) a 25 °C. Em seguida, foram ajustados diferentes modelos reológicos (Bingham, Herschey Bulkley, Newton, Sisko e Lei da Potência) e determinou-se por meio da correlação do coeficiente de determinação ($> R^2$) os modelos com melhores parâmetros, os quais puderam ser correlacionados em função da composição de cada sistema. Sendo:

WPC:PEC: Modelo de Newton às curvas de escoamento (Equação 4.1) dos complexos e das emulsões sonicadas em todas as proporções;

SPI:PEC: Lei da Potência às curvas de escoamento (Equação 4.2) dos complexos; Modelo de Newton às curvas de escoamento (Equação 4.1) das emulsões sonicadas na proporção 1:1; modelo de Sisko às curvas de viscosidade aparente (Equação 4.3) das emulsões sonicadas na proporção 4:1.

WPC:ALG: Lei da Potência às curvas de escoamento (Equação 4.2) dos complexos; modelo de Sisko às curvas de viscosidade aparente (Equação 4.3) das emulsões sonicadas em todas as proporções; Lei da Potência nas curvas de viscosidade aparente (Equação 4.4) das emulsões 1:1 submetidas a alta pressão.

SPI:ALG: Lei da Potência às curvas de escoamento (Equação 4.2) dos complexos e Lei da Potência às curvas de viscosidade aparente (Equação 4.4) das emulsões sonicadas em todas proporções.

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (4.1)$$

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (4.2)$$

$$\eta_{ap} = \eta_{\infty} + K \dot{\gamma}^n \quad (4.3)$$

$$\eta_{ap} = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad (4.4)$$

onde: τ (Pa) é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) a taxa de deformação, μ (Pa.s) a viscosidade constante de proporcionalidade para um fluido newtoniano, K é o índice de consistência (Pa.s), n o índice de comportamento, η_{ap} a viscosidade aparente (Pa.s) e η_{∞} a viscosidade infinita (Pa.s).

Rampas de aquecimento-resfriamento das emulsões em suas maiores proporções de óleo, sendo dos pares WPC:PEC, SPI:PEC em 1:1 e 4:1 com 15 % de óleo e WPC:ALG 1:1 com 25 % de óleo foram obtidas com taxa de deformação de $50 s^{-1}$ (meio da faixa avaliada) com três rampas, na seguinte ordem: de 25 a 72°C, de 72 a 5° C e de 5 a 25° C com taxa de aquecimento 2 °C/min, com 30 segundos de repouso entre cada rampa.

4.2.8.2- Cisalhamento oscilatório

As propriedades viscoelásticas dos complexos e das emulsões foi avaliada por uma varredura em deformação crescente (1^{-5} a 100) para verificação da região de viscoelasticidade linear (RVL), mantendo-se a frequência de oscilação constante em 1 rad/s a 25 °C.

Para os complexos, todas as subseqüentes varreduras de frequência foram realizadas em uma série ascendente de 0,1 a 100 rad/s mantendo-se a deformação máxima encontrada

para cada par ainda na faixa de viscoelasticidade linear: WPC:ALG em 1,6 % (0,016) e SPI:ALG em 0,04% (0,004), ambos nas proporções 3:1, 4:1 e 5:1. Para as demais proporções (1:1 e 2:1) e pares WPC:PEC e SPI:PEC teste de RVL também foram realizados porém, não foi encontrada tal região o que impediu a realização dos ensaios oscilatórios, por apresentarem comportamento puramente viscoso (ideal) ou forte tendência à tal comportamento e por isso não foi observado comportamento viscoelástico.

Para as emulsões, as subseqüentes varreduras de frequência foram realizadas em uma série ascendente de 0,1 a 100 rad/s, mantendo-se a deformação máxima encontrada para cada par na faixa de viscoelasticidade linear, conforme abaixo:

Emulsões sonicadas: WPC:ALG (4:1) em 0,4 % (0,004), SPI:ALG (1:1 e 4:1) em 1 % (0,01).

Emulsões a alta pressão: SPI: ALG 1:1 0,2 % (0,002)

Para os demais pares (WPC:PEC, SPI:PEC e WPC:ALG 1:1) a região de viscoelasticidade linear também foi avaliada em 0,1 rad/s porém, também não foi possível realizar ensaios oscilatórios, apresentando o mesmo comportamento dos complexos, o que fez com que as rampas de aquecimento para esses sistemas fossem realizadas no cisalhamento estacionário, conforme descrito no item 4.2.8.1.

Rampas de aquecimento-resfriamento dos pares WPC:ALG (4:1) e SPI:ALG (1:1 e 4:1) com 25 % de óleo foram obtidas nas deformações citadas acima, em 1 rad/s com três rampas, sendo: de 25 a 72°C, de 72 a 5°C e de 5 a 25° C com taxa de aquecimento 2°C/min, com 30 segundos de repouso em cada rampa.

4.2.9 Espectros de infravermelho (FTIR- ATR)

A análise de FTIR foi realizada em amostras liofilizadas (Liotop – L101 por aproximadamente 96 horas) dos materiais puros (WPC, SPI, alginato e pectina) e para os complexos nas proporções proteína:polissacarídeo 1:1 e 4:1 com e sem aplicação do ultrassom . Espectros foram obtidos no intervalo de 4000-650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 scans utilizando um espectrômetro Perkin-Elmer FTIR (Spectrum One) ligado a um atenuador de reflectância total (FTIR-ATR), com o auxílio do Origin Pro 8.0 para avaliação dos dados.

4.2.10- Microscopia

4.2.10.1- Microscopia ótica

Uma alíquota do complexo ou da emulsão foi colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula. A microestrutura dos complexos e das emulsões foi avaliada em microscópio ótico (Olympus CX31) com câmara de vídeo acoplada (Olympus, SC30) para captura e digitalização das imagens, com lente de aumento 10x (barra 50µm) para os complexos e lente 40x (barra 20µm) para as emulsões.

4.2.10.2- Microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal de varredura a laser foi realizada para as emulsões conforme Lamprecht, Schäfer e Lehr (2000) com algumas modificações, usando-se os corantes fluorescentes FITC (isotiocianato de fluoresceína) para as proteínas e Rodamina B para os polissacarídeos. Os corantes foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfoxido) na proporção de 1 mg/mL, foi adicionado na quantidade de 40 µl para cada 2,0g de biopolímero em solução. As emulsões foram preparadas conforme item 4.2.4, diferindo somente a adição dos corantes nas soluções estoque. As observações foram feitas em um microscópio Confocal de Varredura Laser (ZEISS LSM 710) com aumento de 40X e as imagens foram analisadas em software Zen 2010. O laser foi ajustado para o modo de fluorescência verde/vermelho, que produziu dois comprimentos de onda de excitação, 488/543 nm, respectivamente. Imagens fluorescentes verdes e vermelhas foram obtidas a partir de dois canais separados e posteriormente foram superpostas.

4.2.11- Distribuição de tamanho de gotas (DTG)

O tamanho médio e a distribuição do tamanho das gotas das emulsões foi determinado por difração a laser (Laser Scattering Spectrometer Mastersizer 2000S, Malvern Instruments Ltd., U.K.). Para efeito de dispersão das gotas, as emulsões SPI:PEC e WPC:PEC foram diluídas em água deionizada, enquanto as emulsões WPC:ALG e SPI:ALG foram diluídas em Tween 20 a 2 %. Ambas, foram agitadas em 1750 rpm para assegurar a homogeneização das amostras.

4.2.12- Estabilidade das emulsões

Um determinado volume de amostra foi transferido para tubos de ensaios transparentes, armazenados em temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C por 48 horas.

Após esse período foi avaliado se houve separação de fases e, em caso positivo, foi feita a medida da altura das fases com auxílio de um paquímetro.

Quando ocorre a separação de fases (cremeação), existe a formação de uma fase superior, denominada “camada de creme” e uma fase inferior transparente ou turva denominada “soro” (SIMO et al., 2012). O índice de cremeação (*IC*), indicativo da estabilidade da emulsão, foi determinado conforme Perrechil e Cunha (2013) a partir da altura do soro (*H*) após o tempo de estocagem e da altura inicial da emulsão no tubo (*H₀*), conforme a Equação 4.5:

$$IC(\%) = 100 \left[\frac{H}{H_0} \right] \quad (4.5)$$

4.2.13 Composição química das emulsões

A composição química das emulsões instáveis foi investigada para a fase soro e para a fase creme, onde foi determinado o conteúdo de proteínas pelo método de Kjeldahl, umidade pelo método gravimétrico (AOAC, 2005), lipídeos por Bligh e Dyer (1959), sendo que o teor de carboidratos foi obtido por diferença.

4.2.14 Análise estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para efeito de comparação dos componentes das emulsões nos diferentes teores de óleo e testes de Tukey para determinar o efeito significativo ($p \leq 0,05$).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DOS BIOPOLÍMEROS PUROS

5.1.1- Umidade e especificações físico químicas

Os biopolímeros apresentaram a seguinte umidade em base seca (U.B.S.) no qual foram considerados para o preparo das soluções e as seguintes especificações químicas (Tabela 5.1) de acordo com os fornecedores:

Tabela 5.1: Umidade em base seca (u.b.s.) e especificações físico químicas dos biopolímeros.

Biopolímeros	U.B.S. (%)	Carboidratos (g)	Proteínas (g)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Fibras (g)
Pectina HMP-70%	8,16 ± 0,05	30	-	Max. 1	-	60
Alginato de sódio	11,55 ± 0,06	-	-	18-27	-	67
SPI	5,48 ± 0,08	-	91	-	-	-
WPC	4,79 ± 0,01	6,9	76	Max. 4,5	Max. 7	-

5.1.2- Potencial zeta

O pH do meio é capaz de determinar a densidade de carga elétrica de compostos anfóteros e pode até induzir transições estruturais de proteínas e polissacarídeos (TURGEON et al., 2007). Dessa forma a determinação do comportamento eletrostático das soluções de biopolímeros é importante para identificar as condições experimentais onde a formação de complexos eletrostáticos entre diferentes tipos de materiais possa ser otimizada (COSTA, 2014).

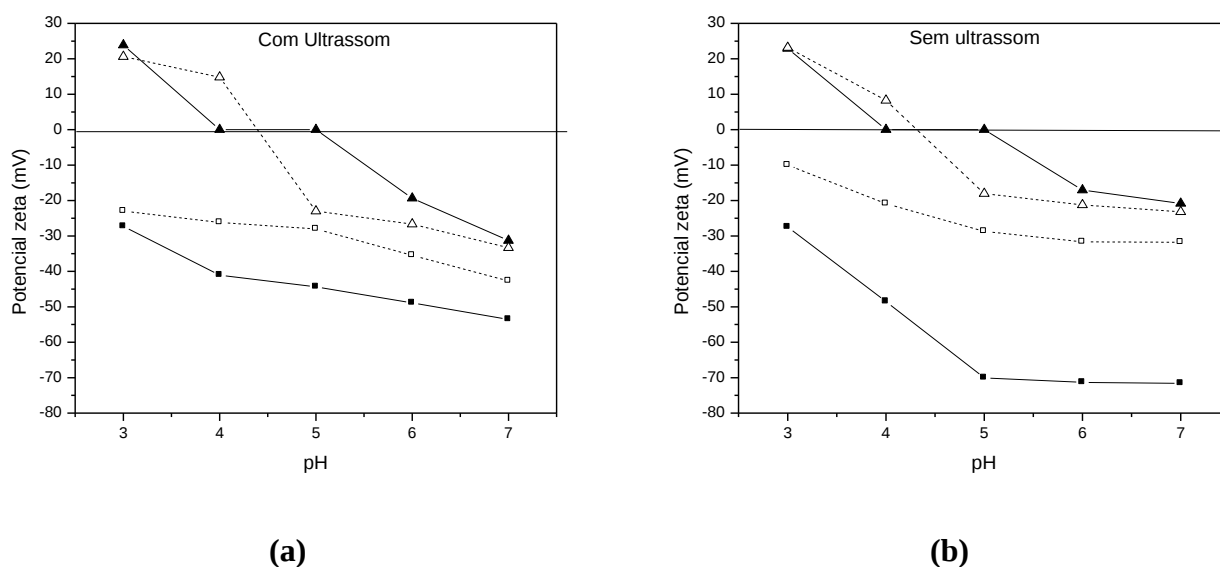
Os biopolímeros apresentaram o mesmo comportamento com e sem aplicação de ultrassom (Figura 5.1) indicando que o ultrassom não apresentou influência significativa na intensidade das cargas.

A PEC e o ALG apresentaram valores negativos em toda faixa de pH (3-7), tendo sua eletronegatividade aumentada com a elevação do pH, característica de polissacarídeos aniônicos. A pectina esteve na faixa de cargas de -10,02 mV a -31,75 mV sem ultrassom e -22,99 mV a -42,71 mV com ultrassom. Souza et al. (2012) avaliaram o potencial zeta das soluções puras de pectina de baixa metoxilação na faixa de pH 3 a 7 e encontraram valores negativos em toda a faixa de pH estudada, tendo sua eletronegatividade aumentada com a elevação do pH variando de -21 mV (pH 3) a -50,3 mV (pH 7). A carga líquida negativa da

pectina é consequência dos grupamentos carboxila não protonados (COO^-) para soluções com pH acima de seu pK_a , sendo que o pK_a da pectina é de aproximadamente 2,9 (RALET et al., 2001).

O alginato esteve na faixa de -27,49 mV à -71,61 mV sem ultrassom e -27,29 mV a -53,54 mV com ultrassom, analisados nos pH's 3 e 7, respectivamente. Harnsilawat; Pongsawatmanit; McClements (2006a) encontraram valores parecidos para o alginato de sódio e constataram que a magnitude da carga negativa foi menor em pH 2-4. Isto pode ser atribuído ao fato de que os grupos carboxílicos aniônicos ($-\text{COO}^-$) nos grupos de ácido manurônico e gulurônico protonaram parcialmente ($-\text{COOH}$) em menores pH's devido à proximidade do pK_a do alginato ~3,5 (DRAGET, 2000).

Figura 5.1: Valores de potencial zeta para soluções puras dos biopolímeros ALG (■), PEC (□), SPI (▲) e WPC (Δ) com aplicação de ultrassom (a) e sem aplicação de ultrassom (b) em diferentes valores de pH.



As cargas do SPI foram positivas em pH 3,0 (22,91 mV sem ultrassom e 23,88 mV com ultrassom) e negativas nos pHs 6,0 (-17,06 mV sem ultrassom e -19,24 mV com ultrassom) e 7,0 (-20,82 mV sem ultrassom e -31,27 mV com ultrassom). Porém, nos pH's 4 e 5 valores de potencial zeta não foram mensuráveis, pois as proteínas precipitaram e dessa forma, seu potencial zeta foi considerado aproximadamente 0 mV (TRAN; ROUSSEAU, 2013; CHEN; SOUCIE, 1986), devido à proximidade do ponto isoelétrico. Segundo Costa (2014) esse comportamento pode ser justificado, pelo fato de que em pH inferior ao pI os grupamentos amina das proteínas estão carregados positivamente ($-\text{NH}_3^+$), enquanto os grupos carboxilas estão neutros ($-\text{COOH}$). Na faixa de pH acima do pI da proteína, a carga

tende a ficar negativa, pois os grupamentos carboxila encontram-se carregados negativamente ($-\text{COO}^-$) e parte dos grupos amina tornam-se neutros ($-\text{NH}_2^+$), porém perto do ponto isoelétrico (pH's 4 e 5), as partículas de proteína têm uma carga líquida menor e começam a agregar, presumivelmente devido à atração hidrofóbica, na ausência de forças eletrostáticas repulsivas (JARAMILLO et al., 2011). Sendo assim, há um equilíbrio e a carga elétrica das proteínas torna-se zero, diminuindo a solubilidade proteica (FENNEMA, 1996). Dados similares também foram relatados por Freitas, Albano e Telis (2017), Jaramillo et al. (2011) e Lam et al. (2007) para SPI, cujo pI encontrado foi aproximadamente pH 4,6; 4,4 e 4,5, respectivamente, valores semelhantes do pI encontrado neste trabalho (4,5).

O potencial zeta de WPC sem ultrassom variou de 23,18 mV (pH 3), 8,26 mV (pH 4) a -23,18 mV (pH 7), e com ultrassom 20,61 mV (pH 3), 14,82 mV (pH 4) a -33,34 mV (pH 7), valores coerentes com os encontrados por Nogueira (2013) e Souza et al. (2012). O ponto isoelétrico foi encontrado no pH 4,5, resultado muito próximo aos pontos isoelétricos reportados na literatura para as proteínas do soro do leite, que variam de 4,5 a 5,2 (JONES; McCLEMENTS et al. 2010b; LY et al., 2008; NOGUEIRA, 2013; SOUZA et al., 2012; WALKENSTROM; HERMANSSON, 1997).

Em função do perfil apresentado pelos biopolímeros, uma faixa restrita de interação entre pH 3,0 e 4,0 foi identificada. Dessa forma, adotou-se o pH de 3,5 para as análises subsequentes, visando que o objetivo era trabalhar em um pH que os biopolímeros apresentassem maior intensidade de cargas opostas para ocasionar maior interação entre eles.

5.1.2 Espectros de infravermelho (FTIR -ATR)

Foram analisados inicialmente os grupamentos químicos dos biopolímeros puros com e sem aplicação de ultrassom, em seguida suas interações nas proporções 1:1 e 4:1, selecionadas para o preparo das emulsões.

Ao analisar o WPC puro, diferentes grupos químicos foram encontrados (Figura 5.2a): a banda 3285 cm^{-1} é referente ao estiramento do grupo N-H, em 2932 cm^{-1} indica o estiramento C-H (grupo saturado CH_2 e CH_3), em 1632 cm^{-1} caracteriza o estiramento C=O (amida I) e finalmente, em 1536 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O (amida II). Chen et al. (2012) determinaram espectros FTIR de isolado proteico de soro (WPI), os quais revelaram a presença de grupos funcionais característicos em 1645, 1535, 1456 e 1043 cm^{-1} correspondendo respectivamente ao estiramento C=O e N-H, C-H e C-N, basicamente os mesmos grupos químicos encontrados no concentrado proteico de soro (WPC). Lee et al.

(2009) avaliaram a região do grupo amida I para determinar mudanças estruturais na estrutura secundária da proteína adsorvida na interface da emulsão, e o grupo amida esteve na banda de 1700 a 1600 cm^{-1} .

Os espectros de infravermelho do SPI apresentaram diferentes estiramentos, permitindo caracterizar os grupamentos químicos presentes. Conforme a Figura 5.3a, as bandas por volta de 3300 cm^{-1} referem-se ao estiramento do grupo N-H (aminas), em 2950 cm^{-1} caracteriza o estiramento C-H (grupo saturado CH_2 e CH_3), aproximadamente em 1630 cm^{-1} há o estiramento C=O (amida I) e em 1530 cm^{-1} estiramento C=O (amida II). Estruturas semelhantes foram encontradas por Wang et al. (2013) e Schmidt; Giacomelli e Soldi, (2005). Picos semelhantes de SPI característicos das amidas I e II também foram reportados por Yang et al. (2015) e Krimm e Bandekar (1986).

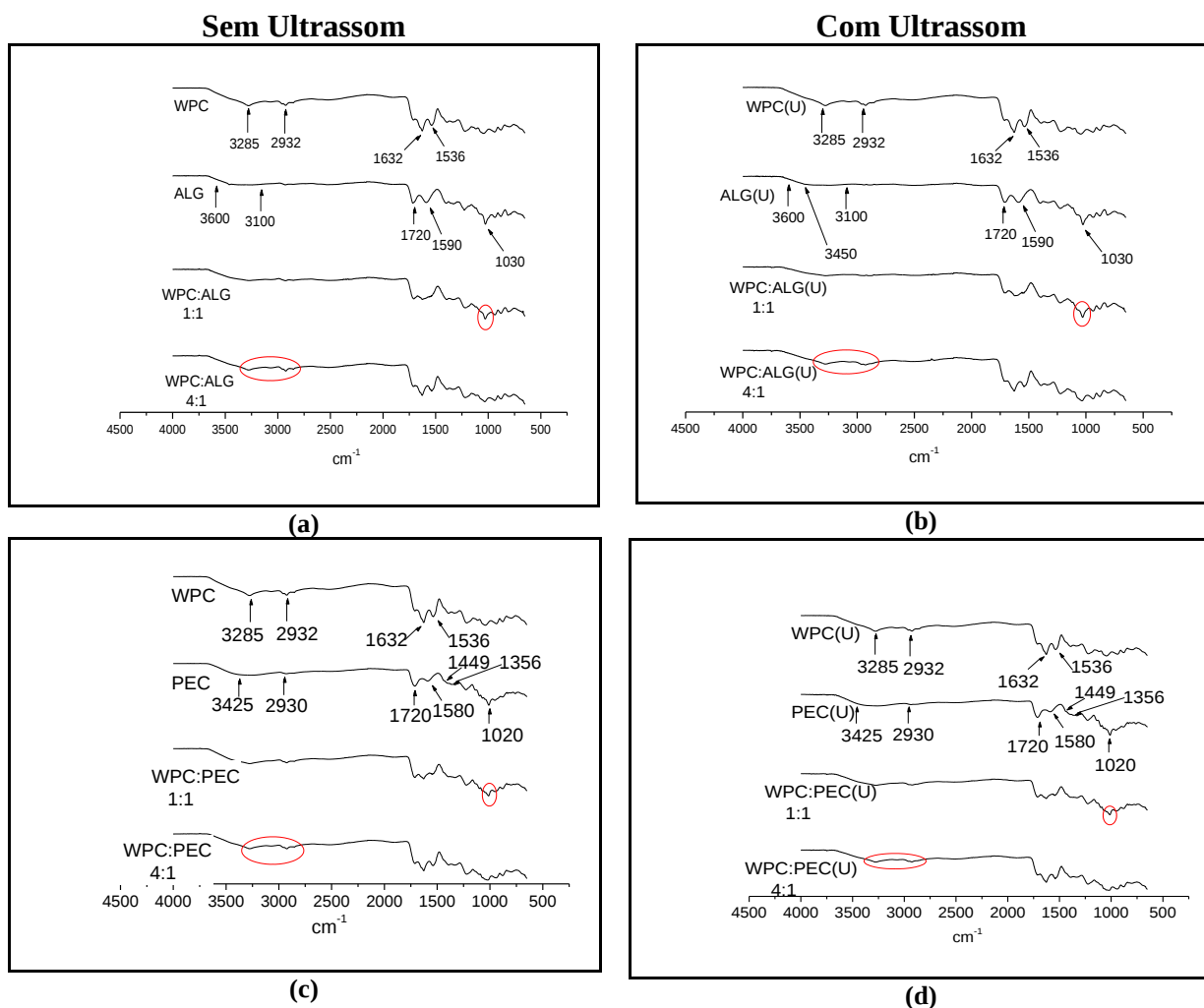
Para a pectina pura (Figuras 5.2c e 5.3c), os grupamentos químicos presentes na banda de 3425 cm^{-1} a 2930 cm^{-1} são referentes aos grupos hidroxilas (O-H), em 1720 cm^{-1} e em 1580 cm^{-1} há o estiramento C=O de ácido carboxílico I e o estiramento C=O de ácido carboxílico II, respectivamente, e em 1020 cm^{-1} a estrutura do sacarídeo (estiramento C-O-C do grupo éter). Fellah et al. (2009), ao avaliarem o grau de metilesterificação da pectina encontraram praticamente os mesmos grupos químicos. Estudos anteriores sobre pectinas têm sugerido que o grupo esterificado CH_3 apresenta bandas na faixa de 1350-1450 cm^{-1} , uma de 1380 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico da CH_3 e um em cerca de 1440 cm^{-1} correspondente ao estiramento assimétrico (SYNYTSYA et al. 2003). Dessa forma, os mesmos estiramentos foram encontrados nas bandas 1449 cm^{-1} para o estiramento assimétrico e em 1356 cm^{-1} para o estiramento simétrico.

Para o ALG (Figuras 5.2a e 5.3a) a banda de 3600 a 3100 cm^{-1} ocorre o estiramento O-H, sendo proeminente em 3450. Além disso, em 1720 cm^{-1} e em 1590 cm^{-1} há o estiramento C=O de ácido carboxílico I e o estiramento C=O de ácido carboxílico II, respectivamente. Em 1030 cm^{-1} encontra-se o estiramento C-O-C do grupo éter (estrutura do sacarídeo). Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Abd El-Gaffar et al., (2012). Grupamentos semelhantes foram encontrados na investigação das interações e movimentos de moléculas de alginato em processos de secagem (XIAO; GU; TAN, 2014).

As amostras WPC:PEC, SPI:PEC, WPC:ALG, SPI:ALG na proporção 1:1 sem ultrassom (Figuras 5.2a, 5.2c, 5.3a, 5.3c), e com ultrassom (Figuras 5.2b, 5.2d, 5.3b, 5.3d) apresentaram espectros intermediários aos dois biopolímeros puros, com uma banda larga

das proteínas e a banda do grupo éter dos polissacarídeos sendo mais proeminente. Na proporção proteína:polissacarídeo 4:1 observa-se o aparecimento das bandas características da proteína, com o grupo éter menos acentuado em comparação aos sistemas 1:1, indicando que há excesso de cargas da proteína (região do espectro marcado por um círculo vermelho nas figuras 5.2 e 5.3). Polissacarídeos como pectina têm grupo carboxílico livre que confere carga negativa para estas moléculas, enquanto que proteínas, como o WPC, têm carga positiva em pH ácido devido à presença de grupos amino. Na interação eletrostática, os grupos carboxila dos polissacarídeos interagem com os grupamentos amino das proteínas para formar complexos que contêm amina (SARAVANAN; RAO, 2012). Essas interações complexas que causam uma larga gama de absorções vibracionais dos grupos químicos correspondentes estão relacionadas com uma quantidade maior ou menor do componente utilizado na formulação (COMUNIAN et al.,2013).

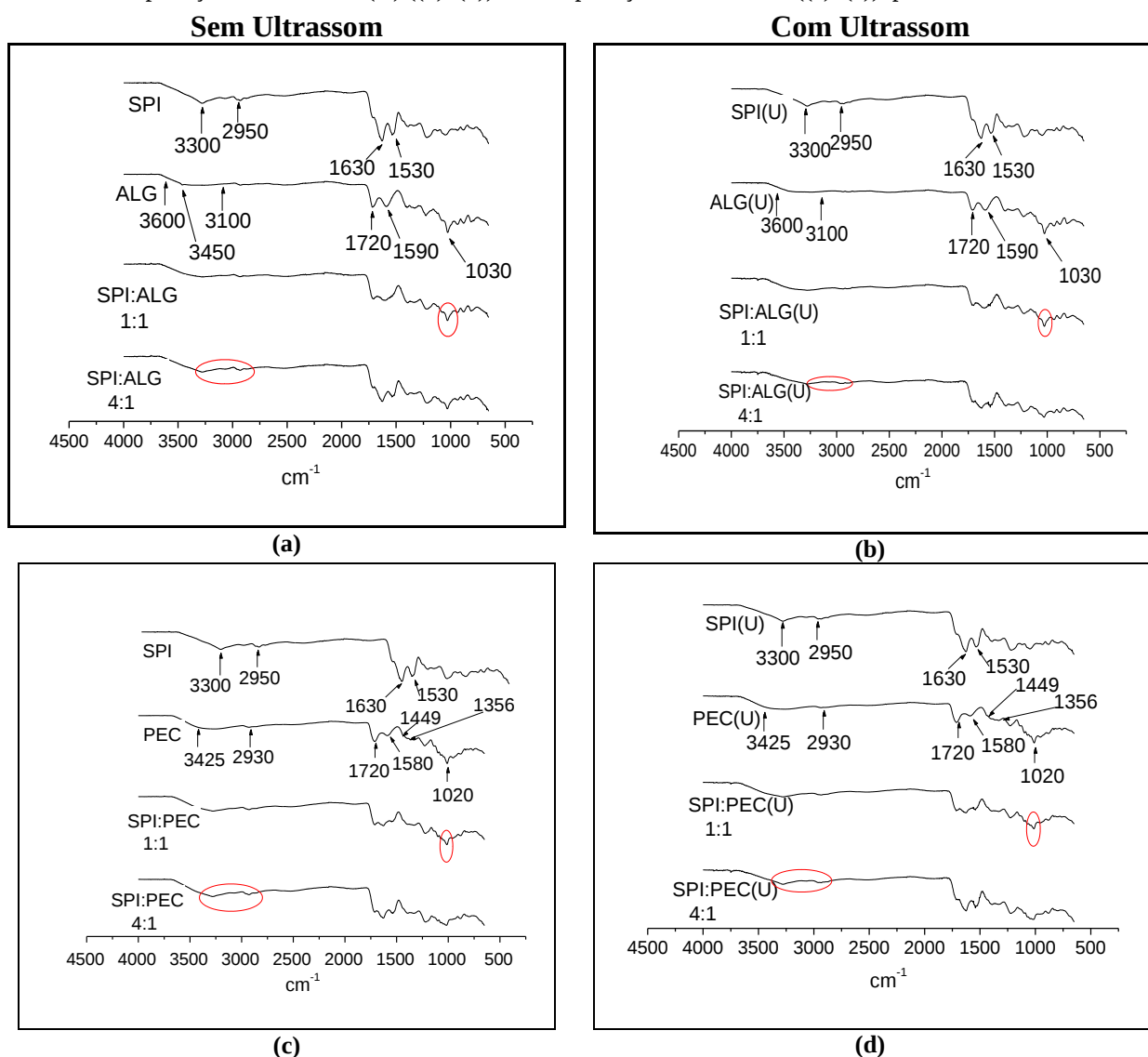
Figura 5.2: Espectros FTIR dos biopolímeros puros (WPC, ALG e PEC) e de suas interações nas proporções 1:1 e 4:1 com aplicação de ultrassom (U) ((b), (d)) e sem aplicação de ultrassom ((a), (c)) pH 3,5 a 25°C.



Diante disso, o FTIR permitiu caracterizar as proteínas e os polissacarídeos e identificar os grupamentos químicos presentes que poderiam ocasionar a interação.

Já para as amostras sonicadas, as bandas de proteína foram ligeiramente menos acentuadas na proporção 4:1, indicando que a aplicação do ultrassom aparentemente não alterou o espectro infravermelho, pois os grupos funcionais permaneceram os mesmos e não houve mudanças estruturais relevantes nos biopolímeros puros e nos complexos. Comunian et al. (2013) determinaram os espectros FTIR de gelatina e goma arábica puros e de seus complexos tratados por diferentes métodos e concluíram que os espectros mostraram que as amostras foram semelhantes, independente do tratamento, com as únicas diferenças observadas na intensidade dos picos.

Figura 5.3: Espectros FTIR dos biopolímeros puros (SPI, ALG e PEC) e de suas interações nas proporções 1:1 e 4:1 com aplicação de ultrassom (U) ((b), (d)) e sem aplicação de ultrassom ((a), (c)), pH 3,5 a 25°C.



Assim, a técnica de FTIR que é um método simples, não destrutivo, rápido e com alta sensibilidade (KYOMUGASHO et al., 2015) foi fundamental para identificar os grupamentos químicos presentes na pectina, alginato, SPI e WPC de forma precisa e mostrou que não houve efeito significativo da aplicação do ultrassom nos grupamentos químicos, grupamentos estes que poderiam favorecer a complexação dentre eles. Avaliar a força dessas interações é importante para a caracterização dos constituintes iônicos, e consequentemente para desenvolver uma compreensão da interação entre os componentes (AUSTIN SUTHANTHIRARAJ; KUMAR; JOSEPH PAUL, 2009).

5.2 SISTEMAS WPC-PECTINA

5.2.1 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS WPC-PECTINA

5.2.1.1 Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica

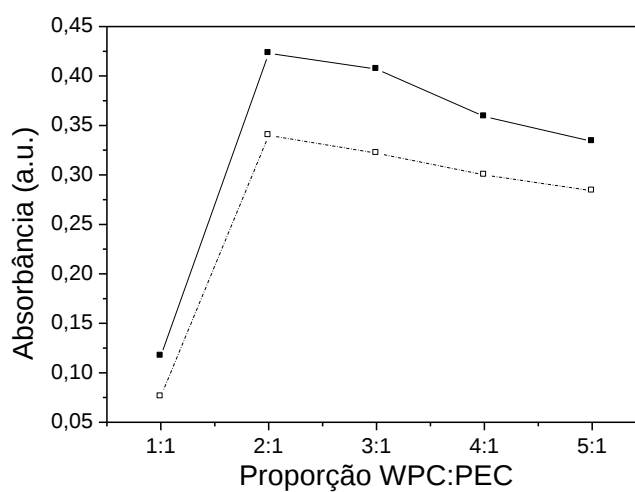
O WPC apresentou valores de absorvância de 0,047 a.u. e 0,09 a.u., enquanto a pectina apresentou 0,003 a.u. e 0,008 a.u., ambos com e sem aplicação de ultrassom, respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados por Freitas, Albano e Telis (2017) na avaliação da absorvância de pectina de alta metoxilação em uma ampla faixa de pH (3-7).

Constatou-se que as amostras com diferentes proporções WPC:PEC apresentaram o mesmo comportamento (Figura 5.4a), porém amostras sem aplicação de ultrassom apresentaram maior absorvância em relação às tratadas com ultrassom, indicando que a sonicação ocasionou a redução do tamanho dos complexos formados, gerando melhor homogeneização e, consequentemente, uma solução menos turva (APÊNDICE D). Madadlou et al. (2009) observaram que o tratamento ultrassônico (35 e 135 kHz) resultou na diminuição da turbidez e diâmetro das partículas de caseína em qualquer valor de pH entre 6,35-11,4. Martini; Potter; Walsh (2010) investigaram o efeito do ultrassom em proteínas de soro e encontraram uma diminuição de aproximadamente 90 % na turbidez quando ultrassom foi aplicado.

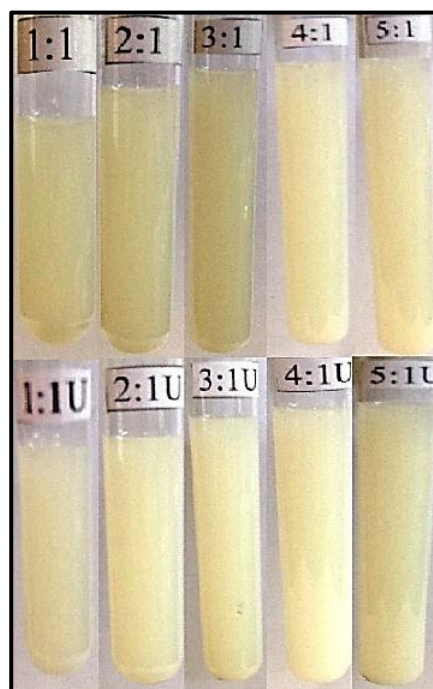
As Figuras 5.4a e 5.4b apresentam o efeito da proporção proteína:polissacarídeo (WPC:PEC) com e sem aplicação de ultrassom. Os dados obtidos (Figura 5.4a) indicaram um drástico aumento de absorvância quando a proporção WPC:PEC passou de 1:1 para 2:1, indicando que o aumento da proporção de proteína provocou maior atração eletrostática entre os biopolímeros e ocasionou maior complexação. Porém, um aumento na proporção

de proteína (WPC:PEC de 3: 1, 4: 1 e 5:1) mostrou uma tendência à estabilização nos valores de absorbância. Em maiores relações proteína:polissacarídeo as amostras são menos turvas sem sedimentação, indicando que as dispersões coloidais contêm pequenos complexos com maior estabilidade (HOSSEINI et al, 2013).

Figura 5.4: Efeito da proporção WPC:PEC com aplicação de ultrassom (U) (□) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) (APÊNDICE D) e imagens dos sistemas após 48h de repouso (b).



(a)



(b)

Os resultados indicaram que o ultrassom favoreceu a estabilidade da dispersão devido à redução dos tamanhos dos complexos e não afetou o potencial de interação entre os biopolímeros comprovado na microscopia ótica (Figura 5.5).

No pH 3,5, o aumento da concentração de proteína propiciou um equilíbrio de cargas entre os biopolímeros já ionizados, com a formação de coacervados estáveis como resultado da interação de cargas opostas. Jones; Decker; McClements (2010) avaliaram a estabilidade das partículas de biopolímeros dos complexos de β -lactoglobulina (β -Lg) com pectina de alta e baixa metoxilação e observaram um aumento da turbidez ao diminuir o pH das soluções, indicando um grande número de complexos formados com alta estabilidade.

Além disso, esses sistemas não apresentaram separação de fases (Figura 5.4b), indicando a miscibilidade dos biopolímeros, a qual ocorre mais comumente em soluções diluídas com baixa concentração de macromoléculas. Existem poucos casos – por exemplo, misturas de albumina de soro e pectina (SEMENOVA et al., 1991) em que uma genuína e completa miscibilidade em dispersões não diluídas de dois biopolímeros foi observada (DICKINSON, 2003).

Por outro lado, a alta turbidez das misturas indica maior formação de partículas maiores e forte interação entre os polieletrólitos, porém não ocorre separação de fases macroscópica (THIES, 1995). Nas amostras sonicadas foi observado um sistema menos turvo, indicando maior homogeneidade e menor tamanho dos complexos. Essas características podem ser altamente favoráveis para a obtenção de emulsões estabilizadas pela interação eletrostática entre biopolímeros de cargas opostas com diminuição de gotículas ocasionadas pelo ultrassom.

Como não ocorreu separação de fases visível para averiguar o material e as condições de trabalho, foram realizados ensaios no pH 4,0 para o par WPC:PEC e obteve-se o mesmo resultado. Também foi testada a pectina de baixa metoxilação em diferentes temperaturas, com o intuito de comparar se haveria separação de fases (APÊNDICE E). Neste caso, a separação de fases foi visível indicando a forte influência do grau de metoxilação da pectina na interação com proteínas e sua aplicação em alimentos. Lam et al. (2007) avaliaram a estabilização de pectinas de alto e baixo teor de metoxilação em baixos valores de pH e constataram que em $\text{pH} > 3,5$, sua distribuição de carga na cadeia determina sua funcionalidade como um ingrediente de alimentos. Tem sido relatado que complexos entre β -lactoglobulina e pectinas em baixo pH são formados, e são fortemente influenciados pelo

grau de metoxilação da pectina, pelo pH e força iônica da mistura (KAZMIERSKI; WICKER; CORREDING, 2003; WANG; QVIST, 2000).

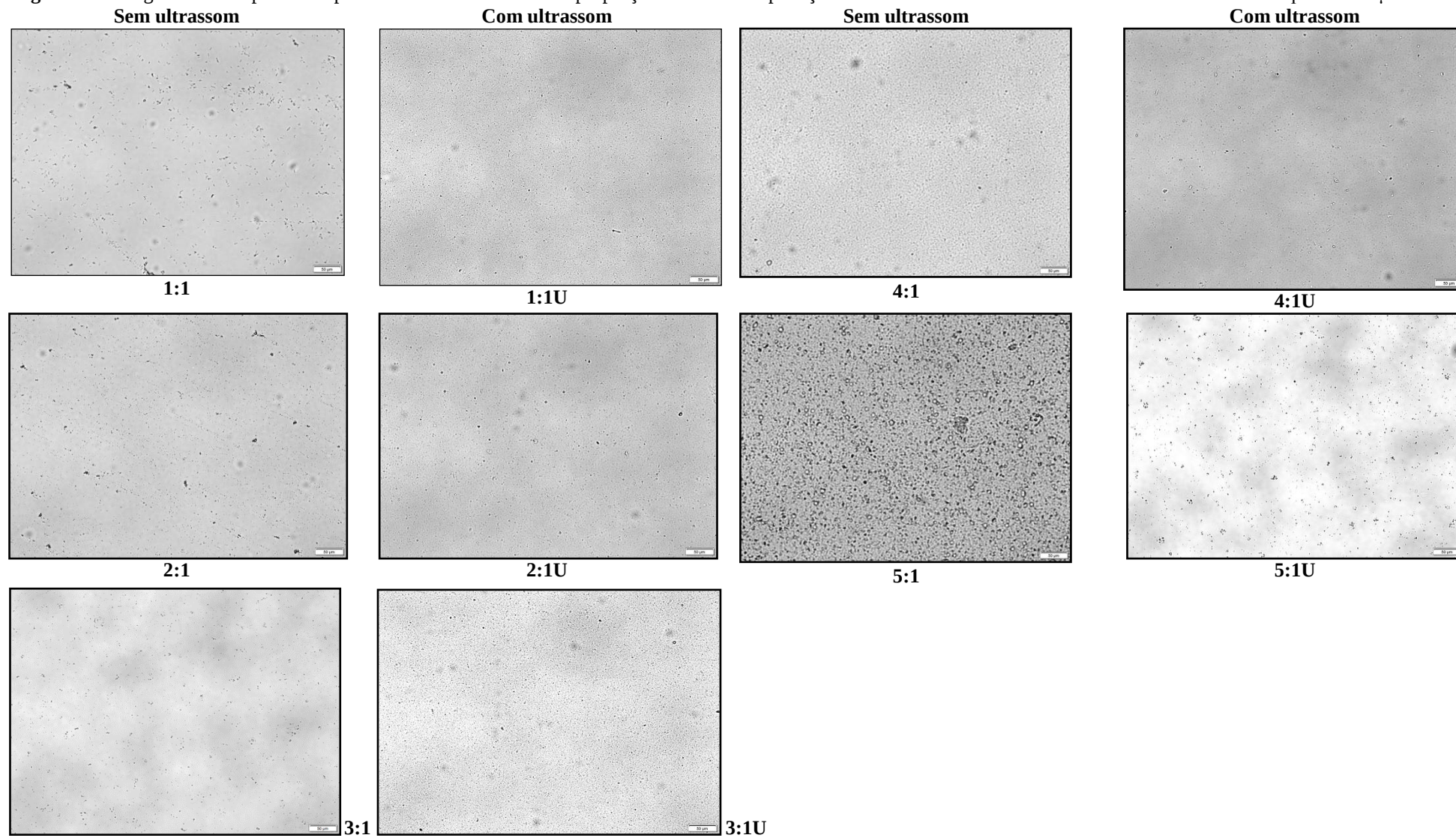
Esses diferentes comportamentos da pectina submetida ou não ao tratamento térmico permitem sua maior utilização na área alimentícia sobretudo em produtos lácteos acidificados, tais como iogurtes, nos quais a pectina desempenha um papel importante no processo de estabilização da caseína de leite evitando a floculação e agregação, garantindo as características originais desejáveis dos produtos durante a sua validade (SEJERSEN et al., 2006; CAMILO, 2007), além de melhorar as propriedades funcionais, como a solubilidade, emulsificação, gelificação e formação de espuma melhorando a aplicabilidade do WPC na indústria de alimentos (MISHRA; MANN; JOSHI, 2001).

Assim, por conveniência e possível maior estabilização de emulsões deu-se continuidade aos experimentos com a pectina de alta metoxilação no pH 3,5 a 25 °C.

As imagens por microscopia ótica (Figura 5.5) desses complexos, mostraram que o sistema WPC:PEC apresentou pequenos complexos solúveis dispersos que aumentaram ligeiramente com o aumento da proporção de WPC na solução. Freitas; Albano; Telis (2017) avaliaram o efeito da proporção de proteína de soja com pectina de alta metoxilação em pH 3,0 e 3,5 e observaram, por turbidimetria e microscopia ótica, que complexos formados em pH 3,5 foram menores, porém mais solúveis e estáveis, o que torna apropriada sua utilização para sistemas alimentares.

Apesar dos complexos solúveis obtidos sem aplicação de ultrassom serem pequenos, a aplicação de ultrassom reduziu ainda mais o seu tamanho. Depois da sonicação, muitas pequenas partículas de WPC são formadas como um resultado de rompimento das grandes partículas e sua superfície adquire um aspecto liso (GORDON; PILOSOFF, 2010). Esta observação explica a baixa viscosidade observada e sua diminuição com a aplicação de ultrassom, que é discutida durante a avaliação do comportamento reológico (item 5.2.1.2).

Figura 5.5: Imagens dos complexos do par WPC:PEC nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes de 10x de aumento. Barra corresponde a 50µm.



5.2.1.2 Comportamento reológico – Cisalhamento estacionário

As suspensões de WPC-Pectina apresentaram comportamento newtoniano nas proporções avaliadas (Figura 5.6). O modelo de Newton apresentou um bom ajuste aos dados com alto índice de determinação ($R^2 > 0,98$) para todas as formulações e não houve variação de viscosidade (μ) entre a rampa descendente (rampa 1) e ascendente (rampa 2), indicando a ausência de tixotropia (Tabela 5.2). Piazza et al. (2009) avaliaram o comportamento reológico de soluções aquosas de proteína de soja e pectina de alto teor de metoxilação e também observaram comportamento newtoniano.

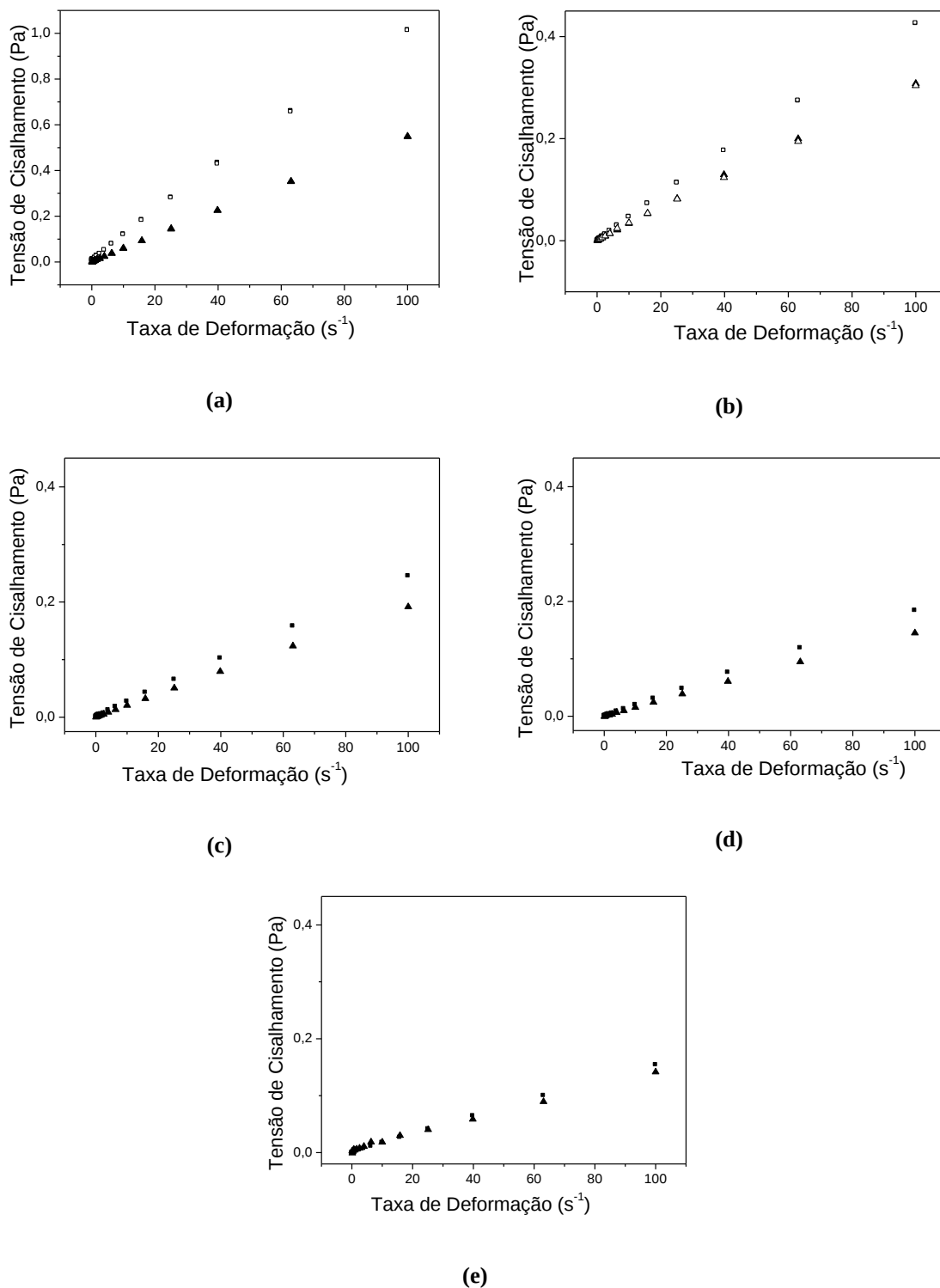
Os sistemas apresentaram baixos valores de viscosidade que foi reduzida com o aumento da proporção de proteína, independente da aplicação ou não de ultrassom, porém a aplicação de ultrassom potencializou a redução da viscosidade em comparação às amostras não sonicadas (Tabela 5.2, APÊNDICE F).

Tabela 5.2: Proporções entre os componentes do sistema misto (WPC, PEC e água) e valores de viscosidade (μ (Pa.s)) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções WPC:PEC sem e com aplicação de ultrassom.

WPC:PEC	Proporções entre os componentes		Sem aplicação de ultrassom		Com aplicação de ultrassom	
	WPC:H ₂ O	PEC:H ₂ O	Rampa 1 μ	Rampa 2 μ	Rampa 1 μ	Rampa 2 μ
1:1	1:98,0	1:98	0,0104	0,0103	0,0055	0,0055
2:1	1:73,5	1:147	0,0043	0,0043	0,0031	0,0031
3:1	1:65,3	1:196	0,0025	0,0025	0,0019	0,0019
4:1	1:61,3	1:245	0,0019	0,0018	0,0015	0,0014
5:1	1:58,8	1:294	0,0016	0,0015	0,0014	0,0014

A diminuição da viscosidade do sistema com o aumento de proteína é justificada pelo aumento da quantidade de água em relação à quantidade de pectina, que foi insuficiente para gelificar a fase aquosa contínua e aumentar ou manter a viscosidade da mistura, de acordo com a proporção PEC:H₂O indicada na Tabela 5.2. Perrechil e Cunha (2010) também constataram a influência da quantidade de água na viscosidade do creme de emulsões, pois ao avaliarem o comportamento reológico das fases creme (superior) e soro (inferior) de emulsões com caseinato de sódio e goma jataí e constataram que a fase creme apresentou menor viscosidade, e atribuíram este comportamento à composição química de fases separadas, pois a fase creme apresentou maior conteúdo de água.

Figura 5.6: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente (■, ▲) e ascendente (△, □) do par WPC:PEC.



Os complexos formados foram rompidos pela aplicação de ultrassom, reduzindo sua viscosidade. Mudanças na viscosidade também foram observadas em *mousse* de chocolate preparados por tratamento com ultrassom (PINGRET et al., 2011). Este efeito é semelhante

ao de homogeneização à alta pressão: ambos os processos reduzem o tamanho dos complexos por ação das forças de turbulência, cavitação e cisalhamento (LE HÉNAFF, 1996).

Diferentes resultados foram relatados quanto aos efeitos do ultrassom no comportamento reológico das suspensões de proteínas. Alguns pesquisadores relataram que a sonicação não causou alterações significativas na viscosidade da proteína do soro de leite (Kresic et al. 2008; Jambral et al., 2010), enquanto que Zisu et al. (2010) relataram uma forte correlação entre o decréscimo do tamanho da partícula de proteína com o decréscimo da viscosidade. O comportamento não-newtoniano foi observado em suspensões de proteína mais concentradas (10% p / p). Arzeni et al. (2012) avaliou o efeito de ultrassom em suspensões de WPC, isolado proteico de soja e ovo em pó, ao ajustar a Lei da Potência às respectivas curvas de fluxo, esses autores verificaram uma diminuição no índice de consistência após a sonicação das proteínas, sugerindo que a redução ocasionada no tamanho das partículas diminuiu a viscosidade aparente. Jambrak et al. (2009) descrevem um grande aumento no índice de consistência após tratamento com ultrassom em soluções concentradas (10% w/w) de isolado proteico de soja.

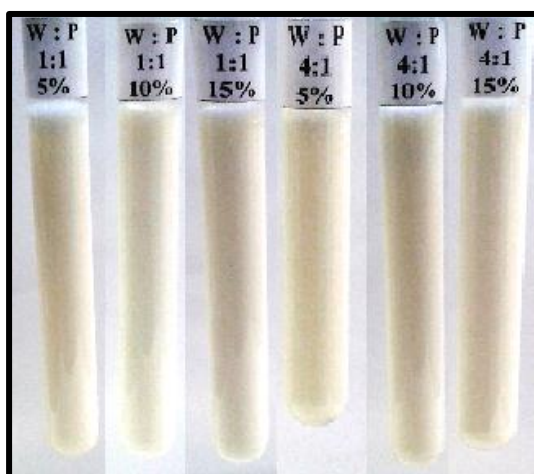
5.2.2 EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS WPC-PECTINA

5.2.2.1 Avaliação visual das emulsões

As emulsões se apresentaram claras e homogêneas, sem separação de fases macroscópica, independentemente das proporções de biopolímeros e teores de óleo utilizados (Figura 5.7), indicando tratar-se de um sistema estável em baixo conteúdo de óleo, o que é de grande interesse e relevância para a indústria em relação à aplicação e substituição de gordura, possibilitando o desenvolvimento de alimentos mais saudáveis e menos calóricos. Os resultados indicam que as condições de tratamento ultrassônico e as proporções de biopolímeros utilizadas foram adequadas para produzir sistemas estáveis, devido às cargas opostas permitindo a adsorção de proteínas na interface óleo / água, seguida pela estabilização promovida pela pectina que construiu uma rede tridimensional que aprisionou as gotículas formadas através da sonicação. O aumento da espessura da camada de polímero adsorvida e provável aumento no potencial zeta tenderão a estabilizar a emulsão por inibir a agregação das gotículas por meio de repulsões eletro-estéricas melhoradas (EVANS; RATCLIFFE; WILLIAMS, 2013).

A estabilidade desses sistemas pode ser discutida em função das proporções dos diferentes componentes presentes na formulação das emulsões (Tabela 5.3). Nos sistemas WPC:PEC 1:1, a proporção WPC:óleo é 1,6 menor em relação ao sistema WPC-PEC 4:1; em contrapartida as proporções PEC:óleo e PEC:H₂O são 2,5 vezes maiores. No caso de WPC:PEC 1:1 isso foi favorável, pois embora a quantidade de proteína disponível em relação ao óleo (WPC:óleo) tenha sido baixa para o recobrimento da interface óleo/água, a quantidade de pectina foi suficiente para compensar e estabilizar o sistema, devido à maior relação PEC:H₂O que favoreceu o aumento da viscosidade da fase contínua, estabilizando as emulsões. A pectina é utilizada principalmente como um agente estabilizante devido à sua capacidade de aumentar a viscosidade das soluções. No entanto, também pode ser usada como uma substância emulsionante porque exibe propriedades tensoativas. Em emulsões produzidas apenas com pectina, uma sobreposição dos efeitos de estabilização e emulsificação irá ocorrer (SCHMIDT et al. 2015).

Figura 5.7: Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (WPC:PEC) em diferentes teores de óleo (5, 10 e 15 %). Imagens após 48 horas de repouso.



Em contrapartida, nas emulsões 4:1 o inverso ocorreu, isto é, as quantidades de água (PEC:H₂O) e de óleo (PEC:óleo) em relação à quantidade de pectina foram altas, dificultando a formação de uma rede do polissacarídeo na fase contínua e reduzindo a estabilidade das gotículas de óleo, além de ocasionar a redução da viscosidade dos sistemas. Por outro lado, a ausência de separação de fases pode ser atribuída à maior disponibilidade de proteína em relação ao óleo (WPC:óleo), favorecendo o maior recobrimento da interface óleo/água e compensando a menor quantidade de pectina e principalmente a sonicação que promoveu maior homogeneização e redução nos tamanhos de gotículas, estabilizando as

emulsões. Além disso, o aumento do teor de óleo aumenta a fração volumétrica da fase dispersa e favorece as interações entre os polímeros na fase contínua, melhorando a estabilidade do sistema. Schmidt et al. (2015) concluíram que o teor de proteína e o grau de esterificação da pectina foram identificados como os principais parâmetros que influenciam características das emulsões, assim como a concentração de polissacarídeo utilizado influencia diretamente na obtenção de sistemas com separação de fases ou cineticamente estáveis (PERRECHIL; CUNHA, 2013; SIMO et al., 2010).

Tabela 5.3: Proporções entre os diferentes componentes (PEC, WPC, óleo e H₂O) das emulsões e valores de viscosidade (μ (Pa.s)) a 25 °C nas rampas descendente (1) e ascendente (2) com diferentes teores de óleo de soja nas proporções WPC:PEC 1:1 e 4:1.

WPC:PEC (1:1)					
Óleo (%)	WPC: Óleo	PEC:Óleo	PEC:H₂O	Rampa 1 μ	Rampa 2 μ
5	1:5,3	1:5,3	1:98	0,0096	0,0096
10	1:11,1	1:11,1	1:98	0,0116	0,0125
15	1:17,6	1:17,6	1:98	0,0179	0,0212
WPC:PEC (4:1)					
Óleo (%)	WPC:Óleo	PEC:Óleo	PEC:H₂O	Rampa 1 μ	Rampa 2 μ
5	1:3,3	1:13,2	1:245	0,0023	0,0023
10	1:6,9	1:27,8	1:245	0,0024	0,0024
15	1:11,0	1:44,1	1:245	0,0033	0,0034

5.2.2.2 Microscopias ótica e confocal de varredura a laser

A Figura 5.8 apresenta as micrografias óticas dos sistemas WPC:PEC 1:1 e 4:1 após dois dias de preparação. Os sistemas são descompactados com pequenas gotículas na fase contínua, característica de emulsões estáveis, o que também indica que a aplicação do ultrassom reduziu o tamanho das gotas. Como esperado, a população de gotas aumentou consideravelmente com o aumento do teor de óleo, mas com a permanência de pequenas gotículas. Segundo Kaltsa et al. (2013), a utilização de ultrassom pode gerar emulsões muito estáveis que requerem pouco surfactante, além de produzir emulsões com pequenos tamanhos de gotas. Todas as emulsões permaneceram estáveis após 7 dias da preparação.

As micrografias de laser confocal mostraram que as gotículas de óleo foram revestidas pela proteína (em verde) e recobertas e aprisionadas pela pectina (em vermelho) que formou uma rede na fase contínua (Figura 5.9), indicando que a proteína está presente na interface e

a pectina está (principalmente) presente na fase contínua, permitindo a estabilização do sistema. Nos sistemas WPC: PEC 4:1 (Figura 5.9b), houve uma maior quantidade de gotículas cobertas por proteína (em verde) e uma fase contínua menos densa (em vermelho), confirmando a discussão anterior (item 5.2.2.1) sobre os efeitos de diferentes razões entre os compostos em solução confirmando a formação de uma bicamada na interface O/W, o que permitiu a estabilização dos sistemas. Perrechil e Cunha (2013) avaliaram a microscopia confocal de emulsões e constataram que a proteína se manteve ao redor das gotículas de óleo, enquanto que o que esteve em excesso foi homogeneamente distribuído na fase contínua. Xiang; Lyu; Narsimhan, (2016) detectaram os sinais de fluorescência e confirmaram a presença de uma camada de proteína adsorvida nas gotículas das emulsões e, quando a pectina foi utilizada como a segunda camada, a fluorescência também foi detectada, indicando que há regiões cobertas por pectina de alta metoxilação.

Baseado nas micrografias, é possível concluir que a sonicação e a formação da bicamada entre WPC e pectina foi altamente eficiente para prevenir a floculação das gotas, proporcionando a estabilização das emulsões. Emulsões estabilizadas por bicamadas mostram uma pequena distribuição de tamanho de gotas, indicando que a camada adicional de pectina de alta metoxilação ajuda a prevenir a floculação das gotículas, possivelmente devido aos efeitos estéricos (XIANG; LYU; NARSIMHAN, 2016).

Figura 5.8: Imagens das emulsões do par WPC:PEC nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm

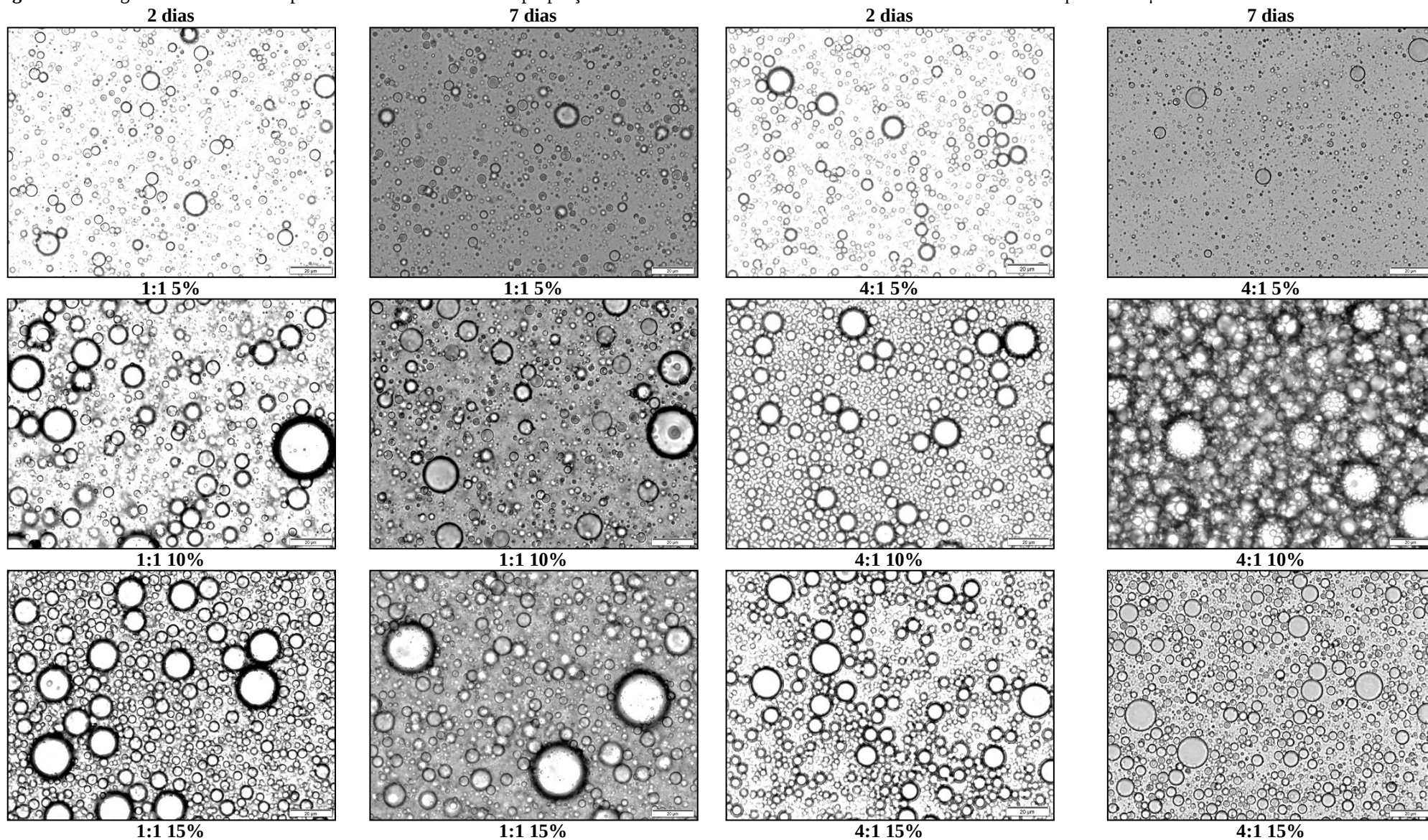
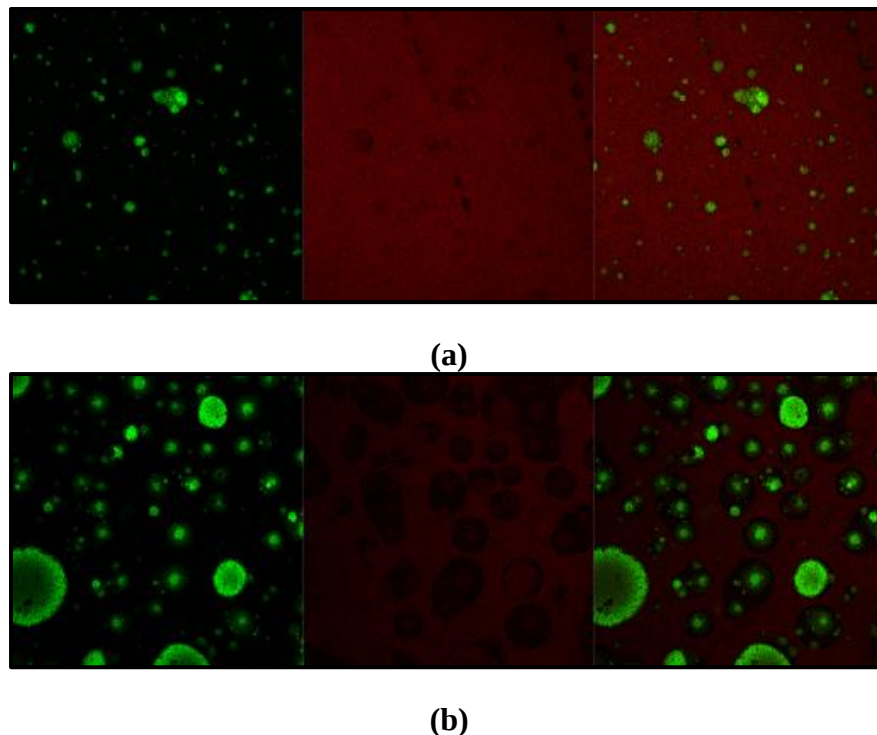


Figura 5.9: Micrografias confocais a laser de emulsões com 15% de óleo de soja nas proporções WPC: PEC 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: PEC corada usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: WPC corada usando FITC. As imagens foram obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 μm .



5.2.2.3 Comportamento reológico - Cisalhamento estacionário

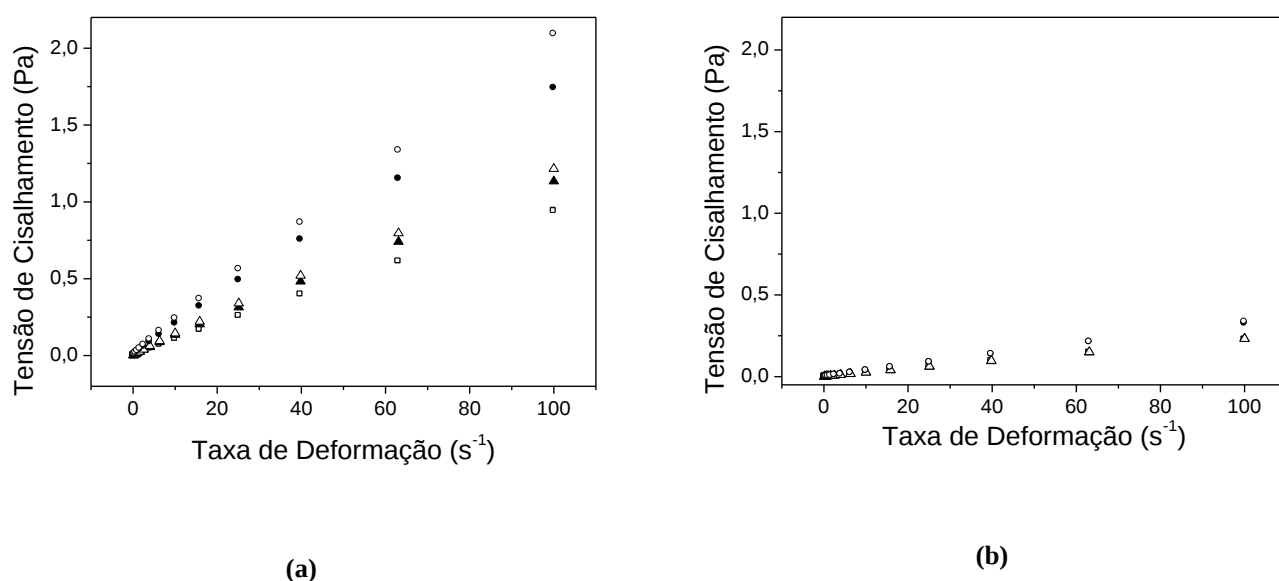
O ajuste do modelo reológico de Newton às curvas de escoamento apresentou altos coeficientes de determinação ($R^2=0,99$) com valores de viscosidade (μ) inferiores a 0,02 Pa.s e ausência de tixotropia (Tabela 5.3, APÊNDICE G).

Para as emulsões com proporção WPC:PEC 1:1, houve leve aumento da viscosidade com o aumento do teor de óleo (Tabela 5.3), que é explicado pela fração volumétrica crescente da fase dispersa em emulsão. No entanto, a viscosidade dos sistemas WPC:PEC 4:1 foi menor que a das amostras WPC:PEC 1:1 (Figura 5.10). Essa redução se justifica pela proporção entre os diferentes componentes presentes nas emulsões (Tabela 5.3), conforme discutido no item 5.2.2.1, uma vez que a menor proporção PEC:H₂O tornou as emulsões menos viscosas.

O comportamento newtoniano revela a estabilidade das emulsões frente ao cisalhamento, o que pode ser atribuído a um balanço adequado entre os biopolímeros estabilizantes, à distribuição do tamanho das gotas, à sua estrutura e ao seu ordenamento ao fluxo. Piazza et al. (2009), ao avaliarem a reologia interfacial de filmes formados com

proteínas de soja e pectina de alta metoxilação, constatarem um efeito estabilizador e estruturante da pectina, o qual foi atribuído à formação de agregados proteína-polissacarídeo na interface óleo/água.

Figura 5.10: Comportamento reológico das emulsões em 5 % (■,□), 10 % (▲,△) e 15 % (●,○) de óleo na proporção 1:1 (a) e 4:1 (b), curvas de escoamento descendente (símbolos fechados) e ascendente (símbolos abertos).



Esse tipo de comportamento pode ser atribuído a fatores como o processo de homogeneização e o tipo e concentração de polissacarídeos utilizados, neste caso a concentração de pectina e as condições de ultrassom impediram um maior aumento de viscosidade nas emulsões, mas foi suficiente para estabilizá-las. Perrechil e Cunha (2010) encontraram que emulsões preparadas com biopolímeros e homogeneizadas a altas pressões (10-60 MPa) foram estáveis, com comportamento newtoniano e baixa viscosidade, os autores atribuíram esse comportamento à homogeneização de alta pressão por reduzir o tamanho das gotículas, diminuir a cremação e, conseqüentemente, um aumento na estabilidade das emulsões. A emulsão com uma menor concentração de polissacarídeos (0,05% p / v) a pH 7 mostrou um comportamento próximo ao Newtoniano (PERRECHIL; CUNHA, 2013). Kaltsa et al. (2013) avaliara diferentes tratamentos ultrassônicos em emulsões e soluções de polissacarídeos e descobriram que alguns polissacarídeos apresentavam redução de viscosidade quando o tempo e intensidade de sonicação aumentavam, além disso, sua viscosidade foi reduzida e o comportamento newtoniano foi aprimorado.

É importante destacar a obtenção da estabilidade das emulsões com baixo teor de óleo para todas as amostras por meio da interação eletrostática entre a pectina de alta metoxilação com as proteínas de soro com aplicação de ultrassom.

5.2.2.4 Rampas de aquecimento-resfriamento

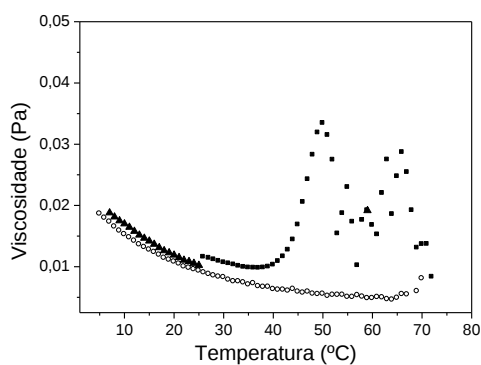
Rampas de aquecimento-resfriamento permitiram alterações no comportamento reológico das emulsões quando submetidas a temperaturas mais elevadas (72 °C), que pode ser correlacionada com o comportamento do biopolímero puro. Este efeito mostrou que o biopolímero presente em maior proporção na mistura teve um papel predominante no comportamento reológico das emulsões. Nas emulsões WPC:PEC 1:1 com 15 % de óleo (Figura 5.11a), a primeira rampa de aquecimento mostrou uma elevação na viscosidade em temperaturas acima de 40 °C, com picos proeminentes em 50 e 65 °C. Esse aumento da viscosidade provavelmente se deve à maior proporção e gelificação da pectina, a qual, quando avaliada pura (Figura 5.11c) também apresentou um aumento de viscosidade a 50 °C. Segundo Kuhn; Picone e Cunha (2012) o mecanismo de formação de gel para as pectinas depende diretamente do grau de esterificação, neste caso pectinas com alto teor de metoxilação, a agregação e formação do gel pode ser induzida em baixo pH e na presença de sólidos solúveis. Em baixos valores de pH (entre 3 e 4) a repulsão eletrostática entre as cadeias de pectina é reprimida, permitindo principalmente interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (KUNHN; PICONE; CUNHA, 2012).

Na segunda rampa (resfriamento), a viscosidade foi menor em maiores temperaturas, em comparação à primeira rampa (aquecimento), e aumentou com a diminuição da temperatura. Suspensões de pectina quando aquecidas em temperatura acima da temperatura de gelificação e então resfriada, irão gelificar porque as moléculas poliméricas se associam e formam zonas de junção à medida que elas colidem (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

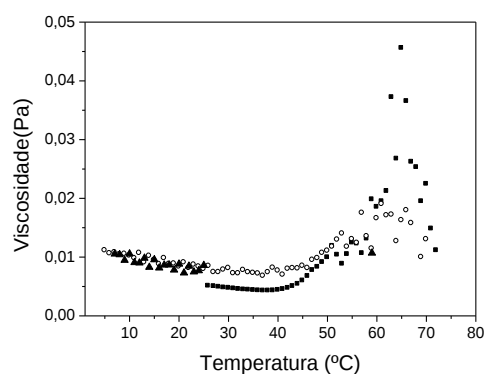
Finalmente, a terceira rampa mostrou que, ao retornar à temperatura ambiente, a emulsão praticamente se restabeleceu, apresentando valores intermediários de viscosidade em relação às duas primeiras rampas, onde basicamente adquiriu a característica inicial. Quando o pH de uma suspensão de pectina é ajustado a 2,8-3,5 na presença de determinada concentração de teor de sólidos solúveis, o resfriamento da suspensão dá origem a um gel, que mantém suas características, mesmo quando reaquecido a temperaturas próximas a 100°C. À medida que o pH da suspensão de pectina é reduzido, os grupos carboxílicos altamente hidratados e carregados são convertidos em grupos ácidos carboxílicos. A partir

da perda dessas cargas e da hidratação, as moléculas poliméricas se associam, formando junções e uma rede de cadeias poliméricas que prende porções da solução aquosa. O ajuste do pH nesta faixa neutraliza as cargas dos grupos carboxílicos e evita sua ionização (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

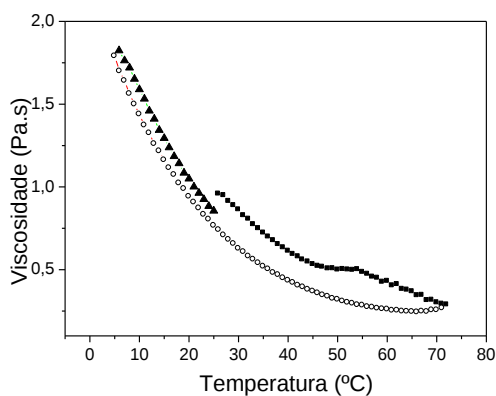
Figura 5.11: Rampas de aquecimento-resfriamento: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); Rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲), de emulsões nas proporções 1:1 (a) e 4:1 (b) com 15% de óleo de soja, pectina (c) e (d) WPC puros.



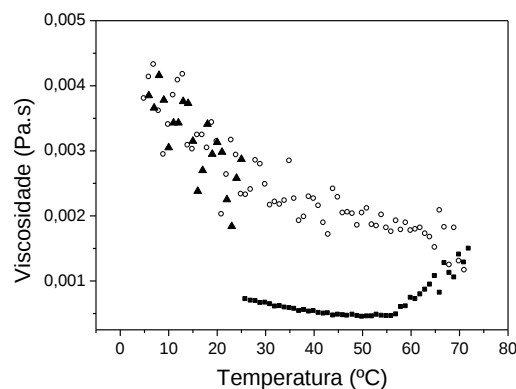
(a)



(b)



(c)



(d)

Esse comportamento e a influência da proporção de pectina foi claramente comprovado quando a solução de pectina pura a 6 % (0,06 kg / kg) foi submetida às mesmas condições das emulsões (Figura 5.11c). As rampas mostraram notoriamente que a pectina gelificou com o aquecimento, apresentando pico em 50 °C, mas na segunda e terceira rampas

a viscosidade aumentou com a diminuição de temperatura e, ao resfriar, retornou à sua característica inicial, comprovando o comportamento de gel reversível.

Essas características das emulsões tornam sua aplicação altamente favorável como substitutos de gordura na obtenção de molhos ou sobremesas. Em altas temperaturas, para molhos ou sopas, por exemplo, que são consumidos logo após o preparo, a viscosidade é potencializada, atribuindo melhor apelo sensorial na degustação dos alimentos quentes. Da mesma forma, é favorável para sobremesas consumidas resfriadas ou em temperatura ambiente de forma geral, por exemplo, pudins, bebidas lácteas pasteurizadas, pelo fato de manter suas características iniciais em baixas temperaturas mesmo quando submetidas a processos industriais com temperaturas elevadas, como a pasteurização a 72°C (QI, et al. 2015) para controle microbiológico, seguida de resfriamento para conservação (5-18°C) e consumo em temperatura ambiente (25°C).

As amostras da proporção WPC:PEC 4:1 apresentaram comportamento similar. Neste caso observou-se único pico de viscosidade em 65°C na rampa de aquecimento (Figura 5.11b), possivelmente próximo à temperatura de gelificação da proteína (KUHN; PICONE; CUNHA, 2012)

Na proporção WPC:PEC 4:1, em que há predomínio da proteína, a viscosidade da primeira rampa (aquecimento) até a temperatura de 40°C foi inferior às demais rampas e acima de 40°C a viscosidade foi potencializada, porém na rampa 2 (resfriamento) e na rampa 3 (aquecimento até 25 °C) a emulsão manteve a viscosidade atingida após o aquecimento, indicando a formação de géis irreversíveis, comportamento característico das proteínas de soro. Em condições específicas, as proteínas de soro formam géis não reversíveis, os quais aprisionam grandes quantidades de água e de compostos não proteicos, originando excelentes propriedades funcionais que auxiliam na formação de produtos com teor reduzido de gordura (PINHEIRO; PENNA, 2004).

Esse comportamento da proteína também foi observado ao avaliá-la pura na concentração de 6 % (0,06 kg / kg) (Figura 5.11d). Após a primeira rampa de aquecimento ocorreu a gelificação, proporcionando um aumento de viscosidade, potencializada entre 60-70 ° C que foi mantida nas rampas de resfriamento, caracterizando o comportamento de gel irreversível esperado para essa proteína.

É importante destacar que ambos os efeitos da pectina e da proteína ocorreram no processo de aquecimento-resfriamento das emulsões, porque a estabilização das emulsões ocorreu devido a atuação conjunta dos dois biopolímeros. Li e Zhong (2016), ao avaliarem

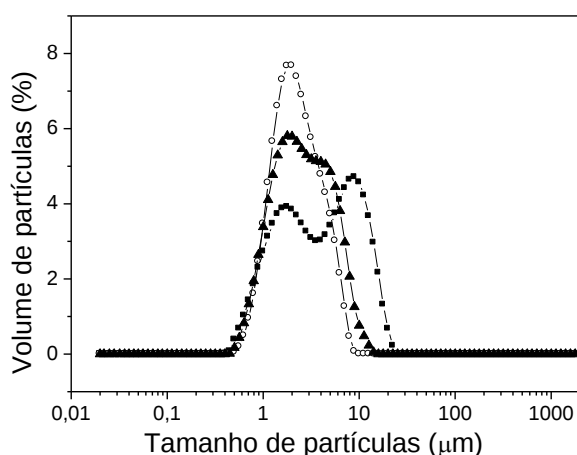
as propriedades de agregação e gelificação de misturas de proteína de soro pré-aquecida e pectina em diferentes pH's, concluíram que ligações de hidrogênio e atração hidrofóbica são responsáveis parcialmente pela formação de géis e destacam que para controlar essas propriedades é necessário controlar a relação de massa dentre os biopolímeros.

5.2.2.5 Distribuição de tamanho de gotas

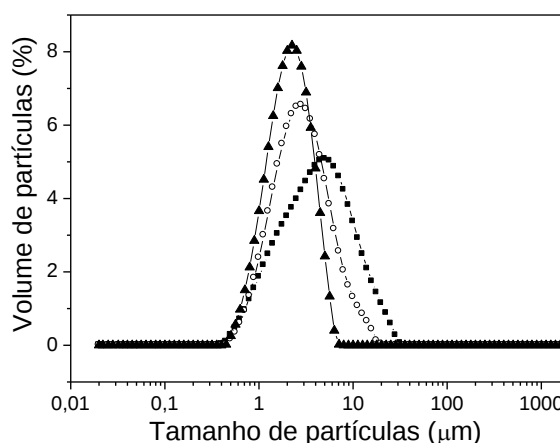
A distribuição do tamanho de gotas confirmou os padrões estruturais observados nas imagens obtidas por microscopia ótica e laser confocal (Figuras 5.8 e 5.9) e o efeito do ultrassom, apresentando pequenos tamanhos de gotas, característica de emulsões estáveis, comprovados pelos baixos valores de diâmetro médio da gotícula ($D_{3,2}$) sendo de 2,14; 2,02 e 2,6 μm , respectivamente para 5, 10 e 15 % de óleo na proporção WPC:PEC 1:1, e de 1,88; 2,38 e 2,94 μm para 5, 10 e 15% de óleo, respectivamente em WPC:PEC 4:1.

As distribuições de tamanho de gotículas são apresentadas na Figura 5.12. Emulsões WPC:PEC 1:1 (Figura 5.12a) apresentaram distribuição bimodal, principalmente em 15 % de óleo com picos em 1,8 μm e 8 μm . Com 5% de teor de óleo, a distribuição bimodal foi atenuada com um pico de 1,8 μm e pequeno ombro a 5 μm . A emulsão com 10% de teor de óleo apresentou distribuição de tamanho monomodal com distribuição média de gotas em torno de 1,8 μm .

Figura 5.12: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W nas proporções WPC: PEC (a) 1: 1 e (b) 4: 1 com 5% ($\blacktriangle$), 10% ($\circ$) e 15% ($\blacksquare$) óleo de soja.



(a)



(b)

O comportamento bimodal dos sistemas 1:1 também pode ser atribuído à concentração de biopolímeros utilizados na formulação das emulsões. Simo et al. (2012) constataram que a adição de baixos níveis de pectina levou a obtenção de distribuição bimodal e concluíram que a concentração crítica de pectina deve ser excedida antes que uma rede forte do gel seja formada nas emulsões. Em contrapartida, Kaltsa et al. (2014) avaliaram o efeito da proporção de WPI com Tween 20 na distribuição do tamanho das gotas e constataram que o excesso de WPI também ocasionou distribuição bimodal das gotas. Neste trabalho, acredita-se que o comportamento bimodal é atribuído à presença da pectina, comportamento constatado quando utilizada em maiores concentrações (1:1) possivelmente por estar próximo da concentração crítica, o mesmo não aconteceu para menores proporções de pectina (WPC:PEC 4:1).

Assim, pode se concluir que independente do biopolímero utilizado nas emulsões é primordial o equilíbrio de suas proporções para uma distribuição mais estreita no tamanho de gotículas. Também é importante destacar que a distribuição bimodal foi proeminente somente em 15 % de óleo e este aumento no volume de gotas pode ter favorecido tal comportamento.

A proporção WPC:PEC 4:1 (Figura 5.12b) que continha maior concentração de WPC, a distribuição foi monomodal com predominância de pequenas gotículas. No entanto, o tamanho médio das gotículas aumentou com o aumento do teor de óleo com picos de tamanho de gotícula em 2,2; 2,8 e 5,04 μm para 5, 10 e 15% de teor de óleo. Perrechil e Cunha (2013) observaram que o aumento de caseinato de sódio até determinada concentração ocasionou a redução do diâmetro das gotículas de óleo.

Resultados similares foram reportados por Piriyaprasarth, Juttulapa e Sriamornsak (2016) ao analisarem o tamanho de gotículas de emulsões estabilizadas por pectina, usando várias concentrações de óleo de farelo de arroz. Este aumento também pode ser favorecido pelo processo de bicamada, Mohammadi et al. (2016) ao nano encapsular compostos fenólicos constataram que o tamanho de gotículas de emulsões W / O / W estabilizadas por complexos WPC:pectina foram maiores que sistemas estabilizados somente com WPC. Os autores concluíram que a utilização simultânea dos dois biopolímeros aumentou a espessura da camada interfacial ao redor das gotículas e consequentemente seu tamanho.

Ambos os sistemas apresentaram boa distribuição do tamanho de gotas, com pequenas gotículas nas emulsões e o aumento do teor de óleo proporcionou o aumento da

população de gotas e consequentemente a fração volumétrica ocupada por elas, o que justifica maior viscosidade obtida em alguns sistemas.

CONCLUSÕES PARCIAIS WPC-PECTINA

Complexos WPC:PEC apresentaram maior interação eletrostática no pH 3,5 e sem separação de fases macroscópica. A turbidimetria indicou maior interação com o aumento do conteúdo de proteína e apresentou menores valores de absorbância para as amostras sonicadas, indicando que a aplicação de ultrassom ocasionou a redução dos complexos formados em todas as proporções de biopolímeros utilizadas. Este comportamento foi comprovado pela redução das curvas de escoamento para as amostras tratadas com ultrassom que apresentaram comportamento newtoniano com menor viscosidade e menor tamanho de complexos na microscopia ótica. O processo de bicamada foi altamente favorável na estabilização das emulsões constatada pela microscopia confocal com aprisionamento das gotículas de óleo, onde as emulsões foram todas estáveis para 1:1 e 4:1 ambas em 5, 10 e 15 % óleo sem índice de cremação e com comportamento newtoniano, distribuição estreita do tamanho de gotas e estáveis no decorrer de 7 dias. Além disso, rampas de aquecimento–resfriamento permitiram constatar o efeito das proporções de biopolímeros e seu diferente comportamento nas emulsões o que favorece fortemente e sugere sua aplicação como substitutos de gordura em distintos produtos na indústria alimentícia, proporcionando alimentos mais saudáveis e atendendo a exigência dos consumidores atualmente.

5.3 SISTEMAS SPI-PECTINA

5.3.1 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS SPI-PECTINA

5.3.1.1 Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica

A pectina de alta metoxilação apresentou valores de absorbância praticamente nulos (0,009 a.u.) e o SPI apresentou 0,2 a.u. Freitas, Albano e Telis (2017) avaliaram a influência do pH (3-7) por turbidimetria em pectina de alta metoxilação e isolado proteico de soja e também constataram baixos valores de absorbância no pH 3,5 sendo 0,03 a.u. e 0,3 a.u., respectivamente.

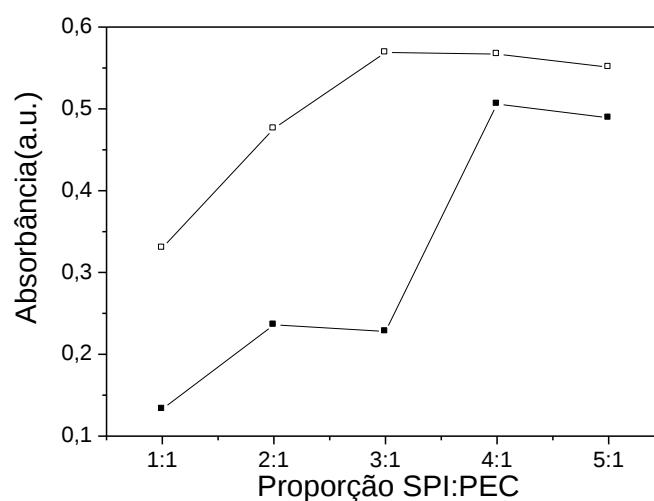
Nas diferentes proporções do sistema SPI:PEC todas as amostras apresentaram comportamento parecido, porém amostras submetidas ao tratamento ultrassônico apresentaram maiores valores de absorbância, em contrapartida amostras não sonicadas apresentaram menores valores (Figura 5.13a). Isto pode estar relacionado com a formação instantânea de maiores complexos no sistema sem sonicação que precipitaram rapidamente, ocasionando a leitura de absorbância em um sistema mais diluído. Nos sistemas sonicados as partículas menores permaneceram dispersas na solução, levando a medições de absorbância superiores (APÊNDICE D).

Lam et al. (2007), ao compararem misturas de SPI nativo com pectina de alta e baixa metoxilação homogeneizadas a alta pressão ou não, concluíram que as amostras homogeneizadas apresentaram melhor estabilidade. Porém, misturas com pectinas em determinado grau de metoxilação não puderam ser homogeneizadas, pois complexos muito grandes foram formados na mistura em baixo pH. O aparecimento de turbidez é normalmente atribuído ao aparecimento de partículas dispersas ou gotículas no meio, associadas aos coacervados formados. A dispersão da luz pela amostra depende do tamanho das partículas dispersas, do comprimento de onda da luz e do índice de refração das partículas que está relacionado ao meio e à concentração de partículas neste (DUCCEL et al., 2004). Hu et al. (2015) avaliaram o efeito do ultrassom nas propriedades físico-químicas e estruturais em agregados de β -conglucina (7S) e glicina (11S) da soja. A aplicação de ultrassom diminuiu a turbidez e o tamanho de partícula da 7S, o que foi atribuído à dissociação parcial dos agregados.

Os dados obtidos também mostraram que o aumento da proporção de proteína aumentou a leitura de absorbância, indicando que esse aumento ocasionou maior formação de complexos no pH ácido (3,5). Resultados semelhantes foram reportados por Freitas, Albano e Telis (2017) ao avaliarem o efeito da proporção de proteína de soja com a pectina

em diferentes pH's: foi observado que para o mesmo pH, o aumento da proporção de proteína isolada de soja ocasionou um aumento do valor da leitura de absorbância, resultando em maior formação de complexos, principalmente em soluções mais ácidas, semelhante ao ocorrido neste trabalho.

Figura 5.13: Efeito da proporção SPI:PEC com aplicação de ultrassom (U) (□) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) (APÊNDICE D) e imagens dos sistemas após 48h de repouso (b).



(a)



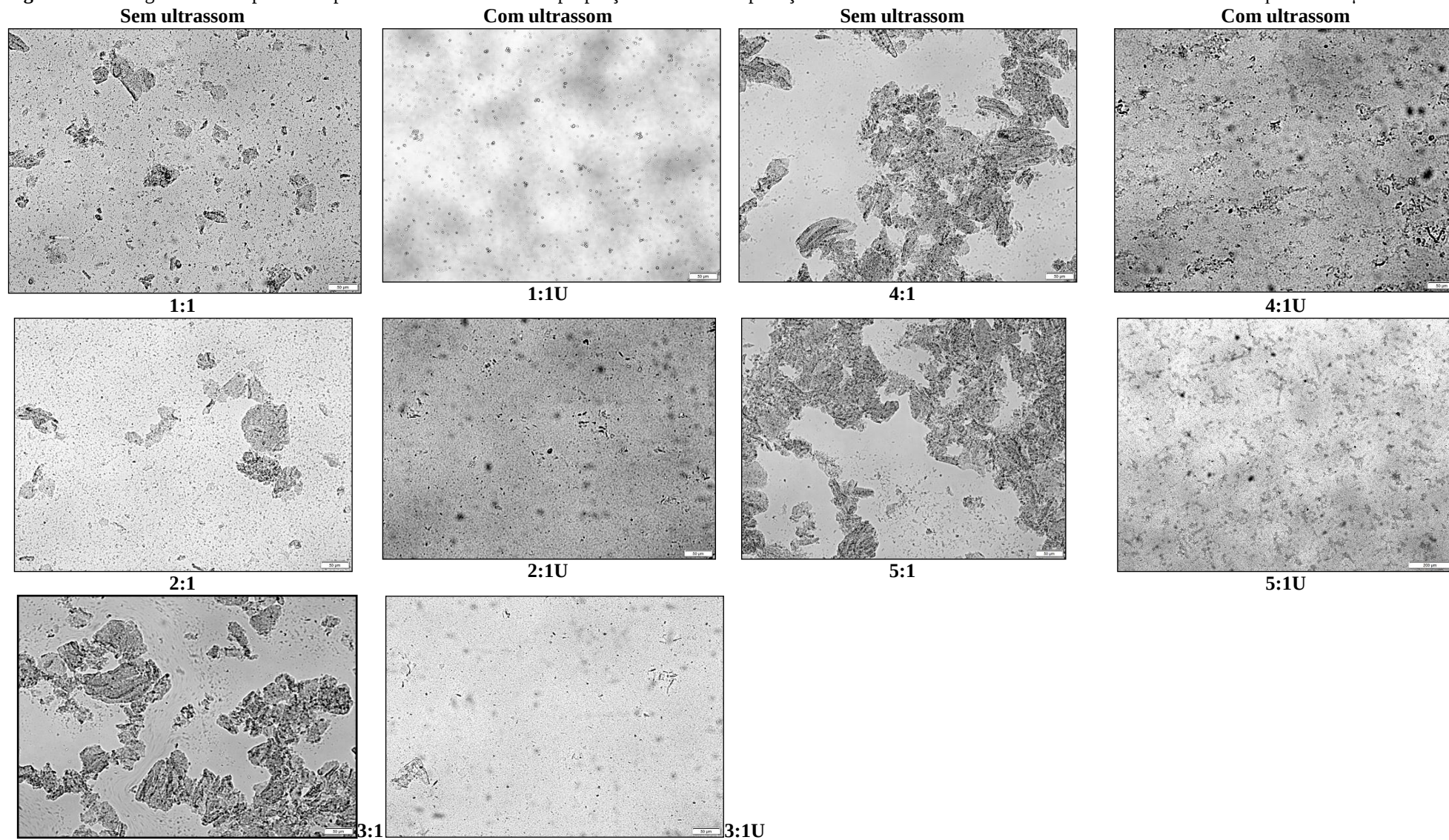
(b)

Esse aumento foi proeminente da proporção 1:1 para 3:1, principalmente nas amostras sonicadas, pois para as demais proporções houve uma estabilização na formação dos complexos. Isso pode indicar que foi alcançado o equilíbrio das proporções dentre os biopolímeros favorecendo a interação eletrostática entre eles no pH 3,5. A estequiometria dos complexos depende do valor do pH do sistema e da proporção entre os reagentes macromoleculares (TOLSTOGUZOV, 2003).

A avaliação visual dos sistemas mostrou claramente o efeito da aplicação do ultrassom e da proporção de proteína utilizada (Figura 5.13b). As amostras não sonicadas apresentaram uma leve separação de fases e turbidez nas proporções avaliadas, sendo mais acentuada em 3:1, 4:1 e 5:1, indicando maior formação de complexos seguida pela sua precipitação nos tubos. O precipitado se forma devido ao grande número de interações (THIES, 1995) e a maior tendência para sedimentar pode ser devido a alterações na densidade da partícula por apresentarem cargas mais próximas (JARAMILLO; ROBERTS; COUPLAND, 2011). Em contrapartida, as amostras sonicadas apresentaram-se turvas e homogêneas em todas as proporções. Soluções turvas indicam maior intensidade de cargas, com forte interação entre os polieletrólitos, mas sem separação de fases macroscópica (THIES, 1995). Lam et al. (2008) estudaram a interação de proteína de soja com pectina de alta metoxilação (HMP) e constataram que para teores suficientes de HMP, as suspensões apresentaram melhora da estabilidade à precipitação.

As imagens de microscopia ótica mostraram que os sistemas SPI:PEC que não sofreram sonicação apresentaram maior formação de complexos heterogêneos em todas as proporções (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e 5:1), porém foi observado que com o aumento da proporção de proteína a formação desses complexos foi potencializada, confirmando que o aumento de SPI propiciou maior interação eletrostática com a pectina (Figura 5.14). Sessler et al. (2013) avaliaram o efeito do pH e a adição de SPI em pectina e a microestrutura mostrou que os isolados de proteína de soja não foram homogeneamente dispersos na rede, havendo variação no tamanho das partículas e indicando que os agregados de SPI eram heterogêneos.

Figura 5.14: Imagens dos complexos do par SPI:PEC nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes de 10x de aumento. Barra corresponde a 50µm.



Por outro lado, as amostras que foram submetidas à aplicação de ultrassom apresentaram complexos muito menores, indicando que a sonicação ocasionou a redução do tamanho das partículas dispersas no meio, gerando um sistema mais fluido, homogêneo e estável em comparação aos sistemas não tratados, melhorando o efeito do SPI. No entanto, também apresentaram um aumento dos complexos proporcional ao aumento da proporção de proteínas. Em um estudo do efeito do ultrassom nas propriedades físicas e estruturais das dispersões de SPI, HU et al. (2013) mostraram que o tratamento de ultrassom conduziu a uma maior solubilidade e caráter fluido de dispersões de SPI. Além disso, o tamanho e distribuição das partículas de dispersões de SPI tratados com ultrassom foram menores que nas amostras não tratadas.

Nas condições aplicadas (20 kHz) o ultrassom apresentou efeitos favoráveis no sistema SPI:PEC, podendo contribuir para sua aplicação como um substituto de gordura em função da ação emulsificante e estabilizante da proteína de soja e da pectina, respectivamente. Jambrak et al. (2009) avaliaram o efeito do ultrassom em diferentes condições nas propriedades físicas do isolado e concentrado proteico de soja e constataram que a frequência de 20 kHz causou mudanças significativas na condutividade, no aumento da solubilidade e a área superficial específica aumentou significativamente, o que é de interesse na textura dos alimentos.

5.3.1.2 Comportamento reológico – Cisalhamento estacionário

O modelo Lei da Potência apresentou bom ajuste com elevado coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$) para todas as proporções com e sem ultrassom.

Os parâmetros reológicos do sistema SPI:PEC, mostraram que o índice de consistência (K) não apresentou variação entre as rampas ascendente e descendente, indicando ausência de tixotropia, e foi pouco afetado pelo aumento no conteúdo de proteína e por sonicação. A amostra 5:1 foi a única que apresentou um aumento proeminente no valor de K, indicando maior interação eletrostática entre os biopolímeros nessa proporção e a única em que a sonicação causou um decréscimo deste parâmetro (Tabela 5.4, APÊNDICE F).

O índice de comportamento (n) variou de 0,719 a 0,970 mostrando comportamento pseudoplástico, tendendo ao comportamento newtoniano (Figura 5.15). Comportamento similar também foi encontrado por Stone; Teymurova e Nickerson (2014) ao determinarem o comportamento reológico de complexos eletrostáticos entre proteína isolada de canola e goma arábica. Esta tendência ao comportamento newtoniano pode estar relacionada com a

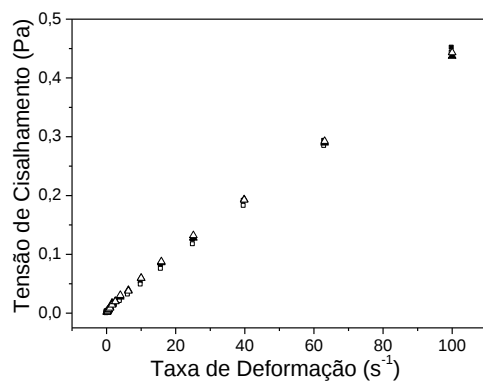
baixa viscosidade da pectina na concentração utilizada e ao pequeno tamanho dos complexos formados entre SPI e pectina, levando-os a permanecer em solução e prevenindo a separação de fases definida (JARAMILLO; ROBERTS; COUPLAND, 2011; LAM et al., 2007).

Tabela 5.4: Proporções entre os componentes do sistema misto (SPI, PEC e água) e valores de índice de consistência (K) a 25 °C nas rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções SPI:PEC sem e com aplicação de ultrassom.

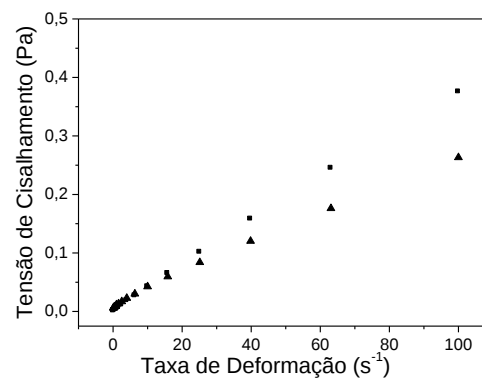
SPI:PEC	Proporções entre os componentes		Sem aplicação de ultrassom		Com aplicação de ultrassom	
	SPI:H ₂ O	PEC:H ₂ O	Rampa 1 K (Pa.s ⁿ)	Rampa 2 K (Pa.s ⁿ)	Rampa 1 K (Pa.s ⁿ)	Rampa 2 K (Pa.s ⁿ)
1:1	1:98,0	1:98	0,006	0,005	0,007	0,007
2:1	1:73,5	1:147	0,004	0,004	0,006	0,008
3:1	1:65,3	1:196	0,004	0,004	0,006	0,008
4:1	1:61,3	1:245	0,006	0,007	0,003	0,003
5:1	1:58,8	1:294	0,016	0,016	0,005	0,005

Além disso, baixos valores de K obtidos, apesar do aumento da proporção de proteína, estão relacionados com a concentração dos biopolímeros nos sistemas. Na Tabela 5.4 é possível observar que embora a disponibilidade de proteína em relação à água (SPI:H₂O) tenha aumentado com o aumento de SPI, a disponibilidade de pectina (PEC:H₂O) diminuiu consideravelmente, tornando a quantidade de pectina disponível insuficiente para gelificar a fase aquosa. Mesmo baixa, a proporção de pectina utilizada indicou que houve interação entre os biopolímeros, porém o sistema permaneceu homogêneo e miscível, não existindo separação de fases macroscópica (Figura 5.13b), comportamento este que geralmente ocorre em soluções diluídas (SEMENOVA, 1991). É importante destacar que mesmo o sistema sendo aparentemente mais diluído, o ultrassom ocasionou a diminuição do tamanho das partículas, fato comprovado pela microscopia ótica (Figura 5.14). Outros autores têm reportado o efeito do ultrassom na redução do tamanho de partículas em complexos e/ou gotas em emulsões (GORDON; PILOSOFF, 2010; KALTSA et al., 2013; CHANDRAPALA et al., 2012) comprovando seu efeito em diferentes aplicações em alimentos.

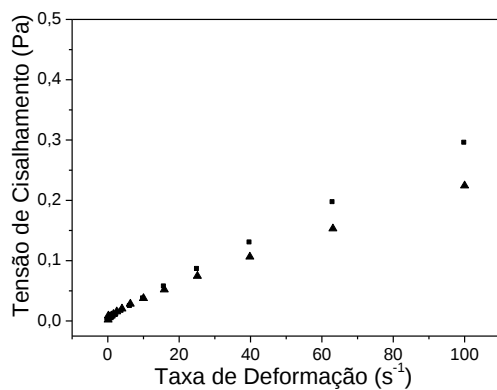
Figura 5.15: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente (■; ▲) e ascendente (Δ; □) do par SPI:PEC.



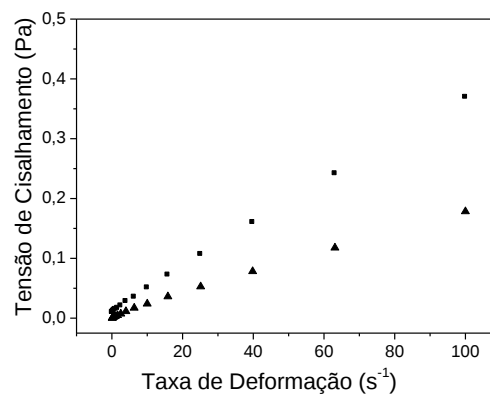
(a)



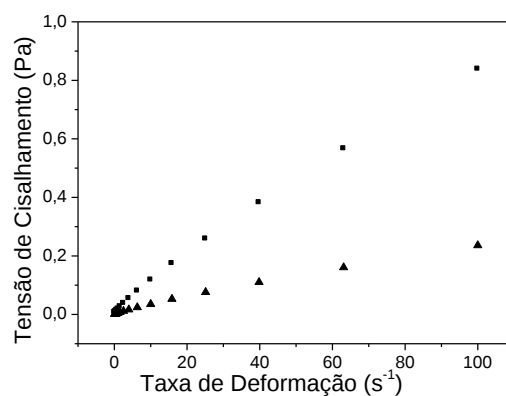
(b)



(c)



(d)



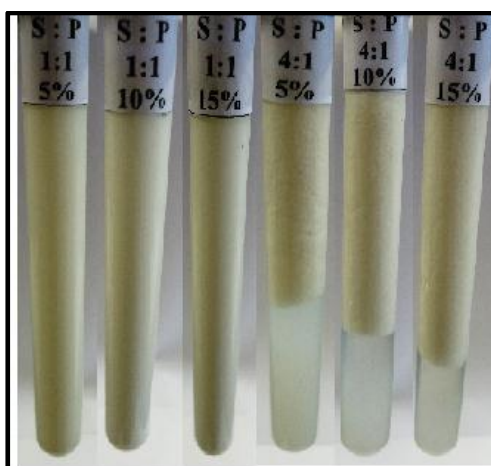
(e)

5.3.2 EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS SPI-PECTINA

5.3.2.1 Avaliação visual, índice de cremeação (IC) e composição química

Todas as emulsões na proporção SPI:PEC 1:1 foram estáveis, sem separação de fases (IC = 0) (APÊNDICE H). Por outro lado, na proporção SPI:PEC 4:1, em todos os teores de óleo houve separação de fases, formando-se um sistema cremoso na fase superior e um líquido transparente na fase inferior (Figura 5.16). Normalmente, a densidade das gotículas da emulsão é diferente da densidade do líquido que o rodeia, e por isso uma força gravitacional atua sobre elas (McCLEMENTS, 2005a). Se as gotas têm densidade mais baixa do que a do líquido circundante elas tendem a mover-se para cima, no que se denomina cremeação (McCLEMENTS, 2007).

Figura 5.16: Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (SPI:PEC) em diferentes teores de óleo (5, 10 e 15 %). Imagens após 48 horas de repouso



A estabilidade do sistema SPI:PEC 1:1 em comparação com a separação de fases observada no sistema 4:1 pode ser discutida em função das proporções entre os diferentes biopolímeros, o óleo e a água presentes em cada formulação. No sistema 4:1, enquanto a proporção SPI:óleo é cerca de 1,6 vezes maior, a proporção PEC:óleo foi cerca de 2,5 menor (Tabela 5.5). Isso demonstra que a maior disponibilidade de proteína, o que pode favorecer maior recobrimento da interface óleo/água, não foi capaz de compensar a deficiência de pectina no sistema. A insuficiência de pectina, também demonstrada pelas proporções PEC:H₂O, pode ter sido responsável pela baixa viscosidade da fase contínua, o que favoreceu maior movimentação das gotículas de óleo e permitiu a separação gravitacional das fases. Perrechil e Cunha (2013) constataram que menores concentrações de κ -carragena levaram à formação de uma camada translúcida, indicando instabilidade da emulsão. No entanto, as

emulsões foram estáveis quando se utilizou valores superiores de κ -carragena, e atribuíram essa estabilização ao aumento da viscosidade da fase contínua proporcionada pelo aumento do polissacarídeo.

Tabela 5.5: Proporções entre os diferentes componentes das emulsões nas proporções SPI:PEC 1:1 e 4:1 e composição química das fases creme e soro das emulsões 4:1.

Proporção entre componentes							
SPI:PEC (1:1)				SPI:PEC (4:1)			
Óleo (%)	SPI:Óleo	PEC:Óleo	PEC:H ₂ O	Óleo (%)	SPI:Óleo	PEC:Óleo	PEC:H ₂ O
5	1:5,3	1:5,3	1:98	5	1:3,3	1:13,2	1:245
10	1:11,1	1:11,1	1:98	10	1:6,9	1:27,8	1:245
15	1:17,6	1:17,6	1:98	15	1:11,0	1:44,1	1:245
Composição química 4:1							
Componentes Químicos	Fase creme – Óleo (%)			Fase soro – Óleo (%)			
	5	10	15	5	10	15	
Proteína	2,2738 ^{n.s.}	1,9882 ^{n.s.}	1,7434 ^{n.s.}	0,4380 ^{n.s.}	0,4463 ^{n.s.}	0,4574 ^{n.s.}	
Lipídeos	9,4255 ^c	16,6055 ^b	22,8403 ^a	0,4213 ^{n.s.}	0,4336 ^{n.s.}	0,5989 ^{n.s.}	
Água	88,3532 ^a	77,4309 ^b	75,3446 ^b	97,7294 ^{n.s.}	97,8302 ^{n.s.}	97,7038 ^{n.s.}	
Carboidratos	0,8593 [*]	0,642 [*]	0,6528 [*]	1,4113 [*]	1,2901 [*]	1,2399 [*]	

(*) Conteúdo de carboidratos obtido por diferença. (n.s. e *) na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$) de acordo com o teste de médias de Tukey.

Isso indica que para cada proporção entre os componentes presentes na emulsão há uma concentração ideal ou crítica de polissacarídeo que deve ser utilizada para que a estabilidade seja obtida. A concentração de pectina precisa ser suficientemente elevada para assegurar a completa cobertura das gotículas e evitar a floculação, mas não deve exceder uma concentração crítica, acima do qual as interações de depleção farão com que as gotículas se agreguem (SIMO et al., 2012; McCLEMENTS, 2005b). A proporção 1:1 parece representar uma concentração mais apropriada de pectina, gerando o aumento da viscosidade da fase contínua e impedindo a maior movimentação das gotas, ocasionando a estabilização.

O índice de cremeação das emulsões 4:1 (APÊNDICE H) apresentou valores de 46,2, 38,6 e 37,5 % para 5, 10 e 15 % de óleo, respectivamente. Considerando que o óleo presente no sistema tende a se alojar na fase creme, pode-se atribuir o aumento do volume ocupado pela fase creme ao aumento da massa (ou volume) de óleo presente na emulsão. Isso foi comprovado ao determinar a composição química das diferentes fases (Tabela 5.5), sendo que para a fase creme as variáveis com efeito significativo ($p \leq 0,05$) foram teor de óleo e a água, esta última somente para 5 e 10 % de óleo, o que justifica os valores de IC de 10 e 15% de óleo serem muito próximos. Os demais componentes (proteínas e carboidratos)

não apresentaram efeito significativo ($p \geq 0,05$) na fase creme, o que era esperado sabendo que a proporção de biopolímeros na composição era a mesma (4:1). O mesmo aconteceu para todos os componentes na fase soro, não apresentando efeitos significativos ($p \geq 0,05$).

Na fase creme há maior quantidade de proteína e lipídeos e menor quantidade de água e carboidratos, comprovando que o SPI foi adsorvido na interface óleo-água criando uma membrana protetora. Em contrapartida, a quantidade insuficiente de pectina favoreceu a desestabilização por meio da coalescência (junção de gotas maiores) e por floculação, processo no qual as gotas emulsificadas se associam em flocos sem a destruição das gotas individuais (HILL, 1996; McCLEMENTS, 2007), ocasionando maiores teores de água e carboidratos na fase soro.

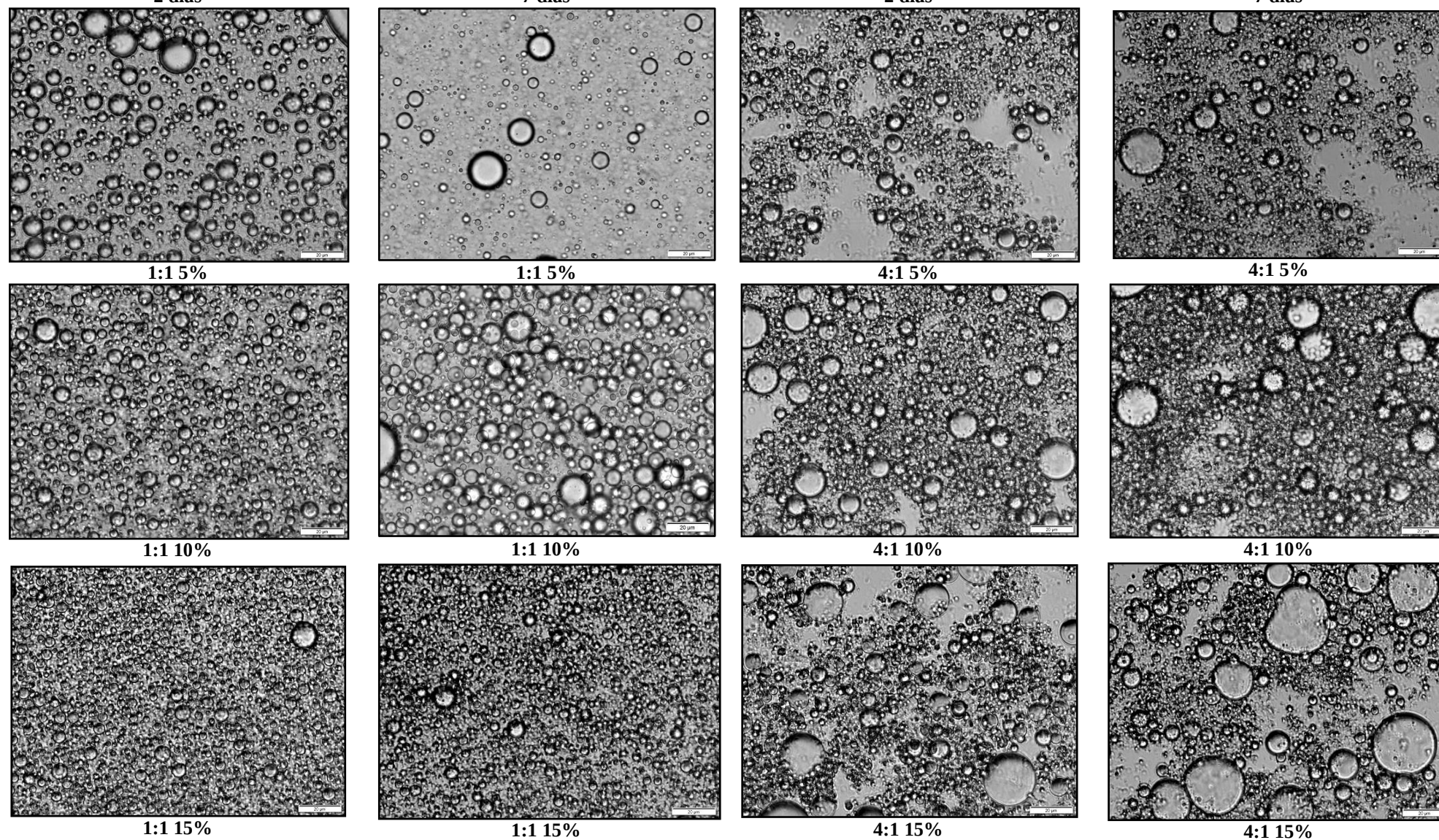
5.3.2.2 Microscopias ótica e confocal de varredura a laser

A morfologia das emulsões SPI:PEC 4:1 foi analisada em amostras da fase creme por serem úteis para a compreensão dos mecanismos de desestabilização, bem como pelo fato que se trata de um material com propriedades de textura que podem ser de interesse em determinadas aplicações na indústria de alimentos, uma vez que, logo após a separação inicial, suas características foram mantidas por um período de 7 dias.

As imagens obtidas por microscopia ótica mostram que a população de gotas aumentou com o aumento do teor de óleo. Além disso, as emulsões SPI:PEC 1:1 apresentaram menores gotículas dispersas na fase contínua, num comportamento característico de emulsões estáveis (Figura 5.17). As imagens também mostram que, para formulações adequadas, a homogeneização por ultrassom proporcionou a obtenção de pequenas gotículas.

A Figura 5.17 revela que o mecanismo de desestabilização está associado ao crescimento das gotas de óleo, já que o tamanho médio e a polidispersão das gotas aumentou na proporção 4:1 durante o armazenamento de 2 e 7 dias. Esse crescimento pode ocorrer pela junção de gotas próximas entre si (coalescência parcial) ou pelo crescimento das gotas maiores à custa da difusão de gotas menores que, na sequência, se fundem às gotas maiores (Ostwald ripening) (McCLEMENTS, 2007).

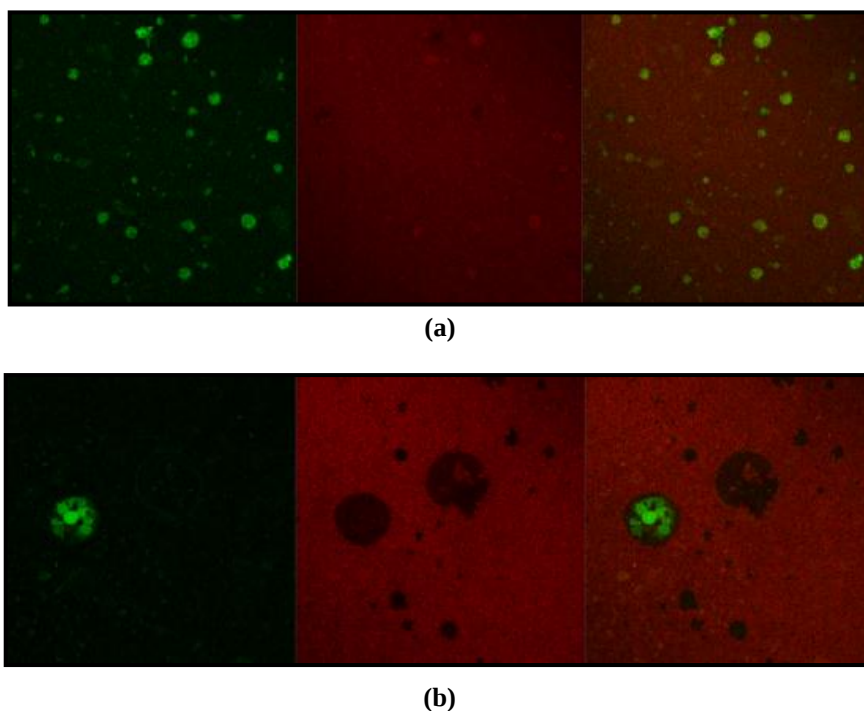
Figura 5.17: Imagens das emulsões (1:1) e dos cremes (4:1) SPI:PEC nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm



Esse processo foi intenso em sistemas 4:1, possivelmente porque houve separação de fases e maior empacotamento das gotas devido à menor proporção de pectina utilizada. Cho e McClements (2009) avaliaram a microscopia ótica de emulsões em diferentes concentrações de pectina e destacaram a importância do controle da concentração de polissacarídeo para assegurar a estabilidade coloidal da emulsão.

As imagens de microscopia confocal mostraram que as gotículas de óleo foram revestidas pela proteína (em verde) e recobertas e aprisionadas pela pectina (em vermelho), formando uma rede na fase contínua (Figura 5.18). No sistema 1:1 há maior número de gotas, as quais são pequenas e distribuídas na rede tridimensional de pectina (Figura 5.18a), o que ocorre em concentrações suficientemente altas de polissacarídeos e inibe eficazmente o seu movimento (DICKINSON, 1992). A fase creme das emulsões 4:1 apresentou gotas grandes e flocos de gotas pequenas que se formaram, provavelmente, devido à aproximação das partículas originais após a drenagem da água da fase contínua (Figura 5.18b), confirmando a floculação como mecanismo de desestabilização (SIMO et al., 2012; McCLEMENTS, 2005a), como discutido no item 5.3.2.1.

Figura 5.18: Micrografias confocais a laser de emulsões com 15% de óleo de soja nas proporções SPI: PEC 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: PEC corada usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: SPI corado usando FITC. As imagens foram obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 μm .



Além disso, a microscopia confocal permitiu identificar a forma física e a distribuição das gotas, o que leva a concluir que a influência do polissacarídeo na estabilidade de emulsões e a formação de creme não são, por conseguinte, simples e depende das características do sistema (McCLEMENTS, 2000).

5.3.2.3 Comportamento reológico – Cisalhamento estacionário

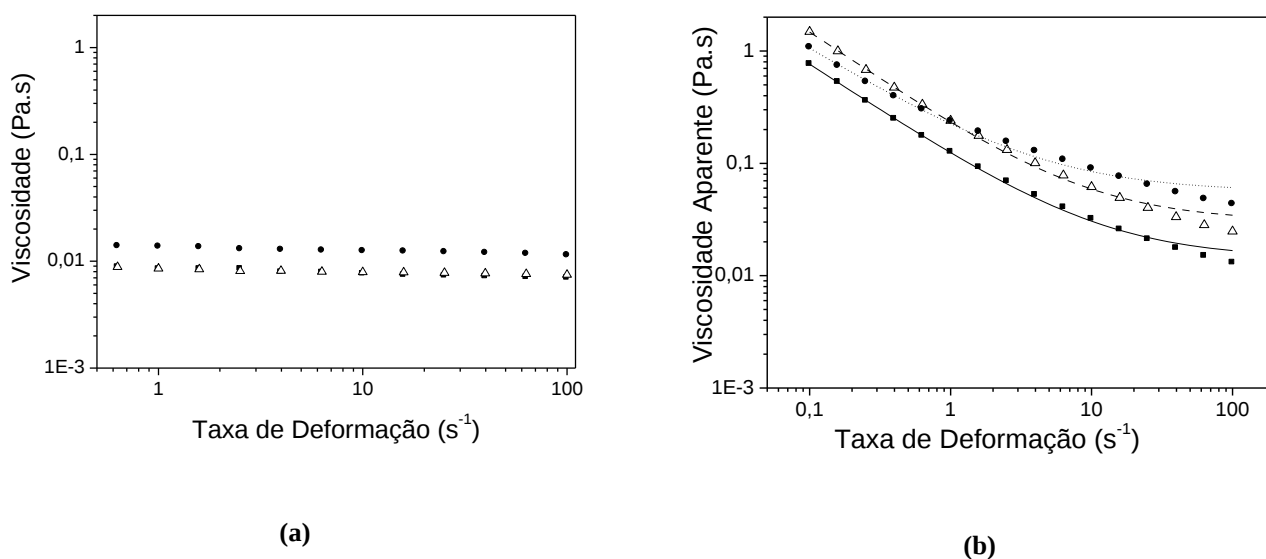
Emulsões do sistema SPI:PEC 1:1 apresentaram um bom ajuste do modelo de Newton ($R^2 > 0,98$) com comportamento newtoniano em todos os teores de óleo, com baixos valores de viscosidade (Tabela 5.6) e sem diferença entre 5 e 10 % de óleo, enquanto para 15 % de óleo houve um leve aumento da viscosidade, devido ao aumento de volume de óleo (Figura 5.19a). O comportamento newtoniano revela a estabilidade das emulsões frente ao cisalhamento, o que pode ser atribuído a um balanço adequado entre a pectina e o isolado proteico de soja, que gerou uma estrutura de menores gotículas, mais homogêneas e, portanto, com menor resistência ao alinhamento do fluxo. Normalmente, o comportamento newtoniano em emulsões está relacionado com emulsões bem diluídas (MONTALVO, 2008). As propriedades reológicas de fluidos newtonianos são independentes da taxa de cisalhamento e do histórico de deformação do fluido, sendo dependentes apenas da composição e da temperatura (VIDAL, 2000).

Nas emulsões com maior concentração de proteína, proporção SPI:PEC 4:1 os ensaios reológicos foram feitos apenas para a fase creme. Estes apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$) em todos os teores de óleo analisados (APÊNDICE G). Soluções de macromoléculas, como soluções proteicas, não apresentam comportamento newtoniano especialmente em altas concentrações e a viscosidade diminui quando a taxa de cisalhamento aumenta (pseudoplasticidade) (DAMODARAN, 2010).

Tabela 5.6: Valores de viscosidade (μ) a 25 °C na proporção SPI:PEC 1:1, índice de consistência (K), índice de comportamento (n) e viscosidade infinita (η_∞) na proporção SPI:PEC 4:1 a 25 °C.

Modelo de Newton		Modelo de Sisko			
SPI:PEC 1:1 % Óleo	Rampa 1 μ (Pa.s)	SPI:PEC 4:1 % Óleo	K (Pa.s ⁿ)	n	η_∞
5	0,0070	5	0,1104	0,1679	0,0143
10	0,0076	10	0,2031	0,1477	0,0305
15	0,0116	15	0,1696	0,2280	0,0559

Figura 5.19: Viscosidade das emulsões com 5 % (■), 10 % (Δ) e 15 % (●) de óleo de soja na proporção SPI:PEC 1:1 (a) e 4:1 (b).



O ajuste do modelo de Sisko apresentou elevados coeficientes de determinação ($R^2 > 0,99$), com leve aumento no índice de consistência (K) e na viscosidade infinita (η_∞) com o aumento do teor de óleo (Tabela 5.6), indicando o aumento do empacotamento das gotas em maiores teores de óleo. Ao contrário dos sistemas 1:1, nas emulsões 4:1 houve mudança de viscosidade com a taxa de deformação aplicada, apresentando uma taxa de deformação crítica que marca a extremidade do platô newtoniano ou o início da região pseudoplástica (MARFIL; TELIS-ROMERO; TELIS, 2012) (Figura 5.19b), que foi satisfatoriamente descrito pelo modelo de Sisko. Este é considerado como um modelo lei da potência generalizado, que inclui um componente newtoniano, sendo muito aplicado em processos de mistura envolvendo altas taxas de deformação (NINDO et al., 2007). Isso demonstra que esses materiais são mais suscetíveis ao cisalhamento, o qual pode ser responsável pelo rompimento de agregados ou pela deformação de gotas (MARFIL; TELIS-ROMERO; TELIS, 2012). Simo et al. (2012) ao determinarem o comportamento reológico de emulsões com diferentes teores de pectina, constataram que no pH 4,0 as emulsões tinham comportamento de sólido em baixas taxas de deformação, indicando que uma rede de gotículas agregadas foi formada.

Além disso, é importante destacar o efeito do ultrassom na viscosidade do creme, pois ao ocasionar a redução do tamanho das gotículas ocorre o aumento do volume de gotas e consequente aumento da área interfacial o que favorece o aumento da viscosidade. O comportamento reológico de uma suspensão depende, essencialmente, do estado de dispersão e da distribuição de tamanho das partículas que a compõem. A viscosidade de

suspensões tem sido relacionada à distância de separação entre as partículas que as constituem (ORTEGA; PILEGGI; PANDOLFELLI, 1999). Efeitos similares da aplicação de ultrassom no índice de consistência da proteína de soja foram encontrados por Jambrak et al. (2009), com aumento no índice de consistência após a sonicação, além do comportamento pseudoplástico. Esses resultados sugerem algumas correlações úteis entre o índice consistência e a potência de utilização do ultrassom (TAN et al., 2015).

5.3.2.4- Rampas de aquecimento-resfriamento

As rampas de aquecimento-resfriamento (Figura 5.20) permitiram identificar o efeito da temperatura no comportamento reológico dos biopolímeros puros e das emulsões.

Na rampa de aquecimento (a 72°C) a pectina pura apresentou aumento de viscosidade próximo de 50°C, indicando que ocorreu a formação de gel nesta temperatura. Nas segunda e terceira rampas houve aumento da viscosidade com a redução da temperatura e vice-versa, e leve redução da viscosidade em comparação à primeira rampa, porém a mesma foi praticamente reconstituída, mantendo sua característica inicial, indicando comportamento de gel reversível (Figura 5.20a).

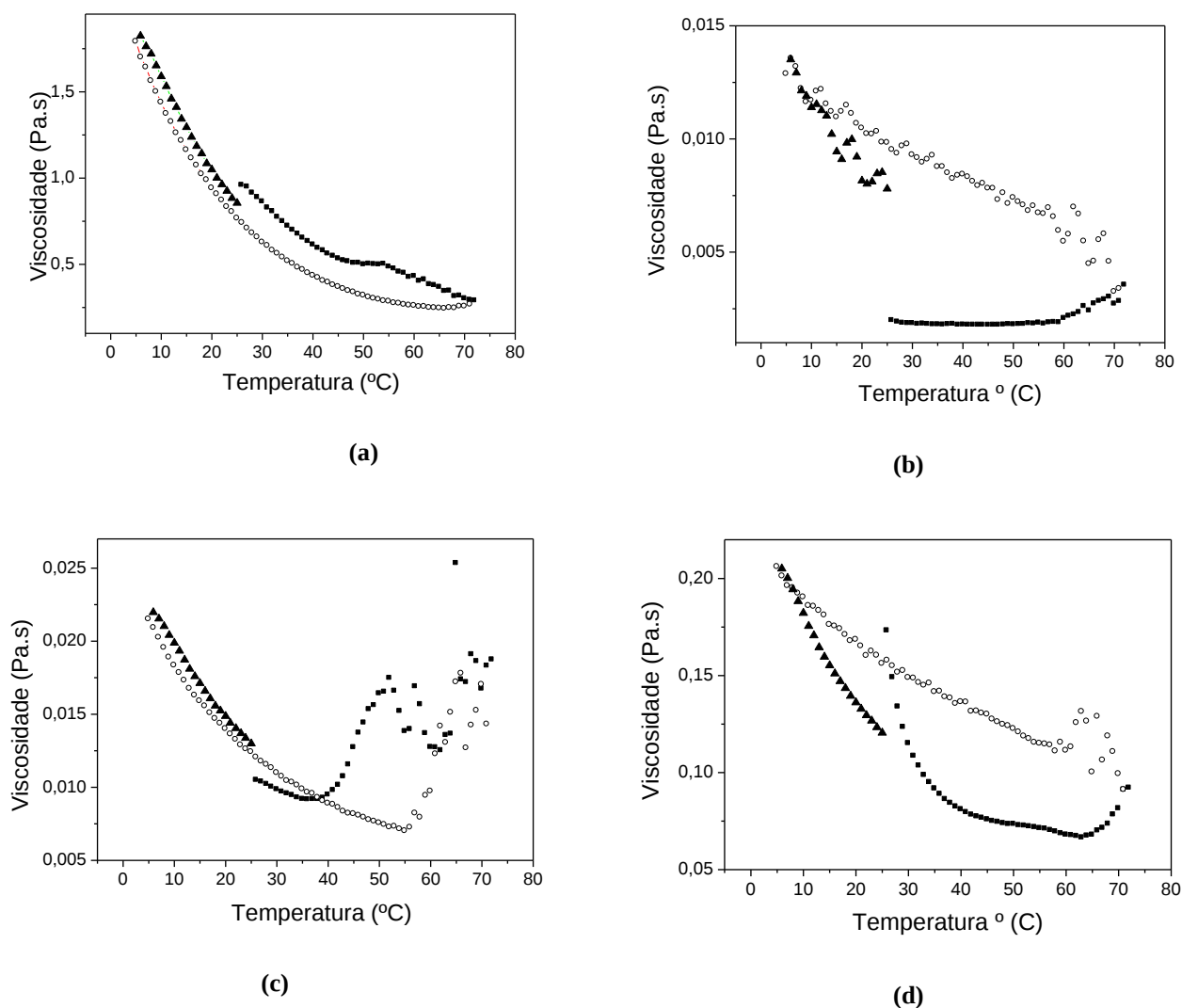
O SPI puro na rampa de aquecimento mostrou viscosidade constante, com aumento a partir de 60°C atingindo maior valor em 72°C. Ao longo da rampa de resfriamento a viscosidade aumentou constantemente e, por fim, apresentou valores similares à segunda rampa em baixas temperaturas e leve redução até 25°C (terceira rampa) (Figura 5.20b), caracterizando um gel irreversível. A precipitação das proteínas pelo calor causa desnaturação irreversível na maioria dos casos (YASUMATSU et al., 1972).

Para os sistemas SPI:PEC 1:1 e 4:1 (Figuras 5.20c,d) é perceptível a semelhança com a pectina e com o SPI puros, respectivamente, devido ao comportamento característico de cada biopolímero observado.

Nas emulsões 1:1 (Figura 5.20c), na primeira rampa de aquecimento há um pico de viscosidade em 50°C seguido por outro pico em 70°C aproximadamente. De acordo com a microscopia confocal a laser, a pectina formou uma rede tridimensional na fase contínua (Figura 5.18) e, assim, o aquecimento potencializou a gelificação e o aumento de viscosidade dessa rede, fator que também foi potencializado pela combinação do pH 3,5 com o alto grau de metoxilação. A formação de gel para as pectinas depende do grau de esterificação: em pectinas com alto teor de metoxilação a agregação e formação do gel pode ser induzida em baixos valores de pH (entre 3 e 4), pois a repulsão eletrostática entre as cadeias de pectina é

reprimida, viabilizando interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (KUHN; PICONE; CUNHA, 2012). À medida que o pH de uma solução de pectina diminui, os grupos carboxilato, altamente hidratados e carregados, são convertidos em grupos não carregados e apenas levemente hidratados. Em consequência, as moléculas poliméricas podem associar-se formando junções e uma rede de cadeias poliméricas que aprisionam a solução aquosa de moléculas (FENNEMA et al.,2010).

Figura 5.20: Rampas de aquecimento-resfriamento, rampa 1: 25 a 72 °C (■), rampa 2: 72 a 5 °C (○) e rampa 3: 5 a 25 °C (▲), dos biopolímeros puros, pectina (a) e SPI (b) e das emulsões nas proporções 1:1 (c) e 4:1 (d) com 15% de óleo.



O pico em 70°C deve estar relacionado com maiores valores de viscosidade atingida pelo SPI, possivelmente devido à desnaturação da fração 7S (β - conglucina), pois esteve muito próximo das temperaturas de desnaturação encontradas por Souza (2000) (75,7°C),

Takeiti et al (2002) (75,4°C) e Puppo et al. (2004) (73,9°C). As proteínas são susceptíveis à desnaturação pelo calor e pelo frio. A etapa importante no processo de gelificação das proteínas consiste no aquecimento da solução proteica que é induzida pela desnaturação, desdobramento e a agregação subsequente das proteínas (DAMODARAN, 1988; DOI, 1993). As proteínas de soja são propensas a desnaturar e tendem a interagir umas com as outras quando aquecidas (NISHINARI et al., 2014). Segundo alguns autores a glicinina e a β - conglucina aparentemente sofrem desnaturação na faixa de 85-95 e 65–75°C, respectivamente (GERMAN, et al., 1982; KITABATAKE et al., 1990). Bikbov et al. (1981) encontraram por calorimetria diferencial picos endotérmicos em 68,5°C para soluções de globulina de soja, que foram atribuídos à desnaturação de 7S.

Demais autores também relataram a desnaturação da proteína de soja da fração 7S em 65°C, encontrada por diferentes métodos como espectros FTIR (NAGANO; MORI; NISHINARI, 1994) e por reologia com espectros mecânicos (NAGANO; AKASAKA; NISHINARI, 1994), confirmando a temperatura com picos de viscosidade (faixa 65-72°C) obtida neste trabalho em ambas proporções.

É importante destacar que conforme relatado por alguns autores, a desnaturação da fração proteica 11S (glicinina) ocorre a partir de 80°C (PUPPO et al., 2004 (86,7°C), BIKBOV et al., 1981 (84.5 C), NAGANO; AKASAKA; NISHINARI, 1994) (80°C); NAGANO; MORI; NISHINARI, 1994 (85°C)), podendo concluir que neste caso em estudo a fração 11S (glicinina) nas emulsões não sofreu desnaturação, pois a temperatura máxima atingida foi de 72°C, fator que impediu a modificação de suas estruturas. Isso também significa que dependendo do processamento industrial que o alimento será submetido, a glicinina não sofrerá o impacto térmico do processamento o que pode ser favorável em muitos alimentos por não prejudicar suas propriedades funcionais. O calor causa a desnaturação irreversível das proteínas, o que resulta na diminuição da solubilidade e, conseqüentemente, muitas propriedades funcionais são destruídas ou prejudicadas por tratamentos com calor (YASUMATSU et al., 1972). No entanto, a desnaturação proteica depende da composição, concentração, conteúdo de umidade e força iônica (LIU, 1999).

Na rampa de resfriamento ocorreu um decréscimo acentuado da viscosidade até 55°C, porém ao continuar o resfriamento a viscosidade foi potencializada em menores valores de temperatura. Esse comportamento das emulsões é justificado pela gelificação da pectina e desnaturação da fração proteica, pois quando suspensões de pectina são aquecidas em uma temperatura acima da temperatura de gelificação e então resfriadas ocorre a

gelificação devido às moléculas poliméricas se associarem e formarem zonas de junção à medida que elas colidem (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Da mesma forma, após o resfriamento os grupamentos expostos do polipeptídeo desnaturado interagem, conduzindo à formação de uma rede complexa que atua como matriz capaz de reter água e outros componentes (DAMODARAN, 1988).

Finalmente, ao retornar à temperatura ambiente (25°C) foi observado menor viscosidade para maiores temperaturas e vice-versa. As viscosidades referentes à primeira, segunda e terceira rampas à 25°C foram de 0,010, 0,012 e 0,013 Pa.s, respectivamente, indicando que as emulsões foram praticamente restabelecidas, num comportamento de gel reversível característico da pectina. Quando o pH de uma suspensão de pectina é ajustado a 2,8-3,5 e possui determinada concentração de teor de sólidos solúveis, ao resfriar a suspensão será formado um gel, que mantém sua característica, mesmo quando reaquecido a temperaturas próximas a 100°C (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

As emulsões SPI:PEC 1:1 mostraram aspectos muito favoráveis, permitindo sua aplicação como substitutos de gordura em alimentos que são submetidos e consumidos em altas e/ou moderadas temperaturas, como molhos, bolos, sopas, etc. pois irão apresentar melhores atributos sensoriais pelo fato da viscosidade inicialmente ser potencializada em temperaturas elevadas. Igualmente, é promissora sua aplicação para alimentos resfriados, que de forma geral são consumidos resfriados ou em temperatura ambiente como doces, pudins, bebidas pasteurizadas, etc., pois garante que esses alimentos não sofrerão alterações dos atributos sensoriais mesmo após o processamento, tendo em vista que esses alimentos são preparados em baixas temperaturas (resfriamento), em seguida, submetidos aos processos industriais como a pasteurização, 72°C (QI, et al., 2015) depois são destinados ao resfriamento para conservação (5-18°C) e por último, consumidos em temperatura ambiente (25°C). Além disso, as proteínas de soja são uma opção para substituição das proteínas do leite, possibilitando o consumo de diversos alimentos para pessoas que possuem intolerância a lactose ou que são alérgicas ao leite.

O creme da proporção 4:1 apresentou predominância das características do SPI, com aumento da viscosidade das emulsões a partir de 65°C, potencializada em 72°C na rampa de aquecimento, seguida pelo aumento da viscosidade das emulsões na rampa de resfriamento, indicando a formação de géis irreversíveis, com um pico em 65°C, apresentando somente leve redução na terceira rampa (Figura 5.20d). Possivelmente, a partir de 65°C iniciou-se o

processo de gelificação da proteína que foi potencializada entre 65 e 72°C devido à desnaturação da fração proteica 7S (β -conglucina).

Ao comparar as duas proporções é notável que a viscosidade do creme da proporção 4:1 foi maior que das emulsões 1:1. Isto está relacionado com a separação de fases que ocasionou maior empacotamento das gotas, eliminando parcialmente a fase aquosa, além da capacidade do SPI formar géis irreversíveis, fatores esses que intensificaram a viscosidade do creme, o que se torna um fator de interesse, pois a aceitação de vários alimentos dos tipos semissólidos e líquido por parte do consumidor como molhos, sopas, bebidas, etc. dependem da viscosidade ou da consistência do produto (DAMODARAN, 2010).

Embora no sistema 4:1 a predominância tenha sido do SPI, na rampa de aquecimento também foi observada uma curva característica discreta da pectina próximo de 50°C, o que nos leva a concluir que ambos os biopolímeros tiveram efeito no comportamento dos cremes, o que permitiu sua estabilização por 7 dias. Da mesma forma e, principalmente nas emulsões 1:1, os biopolímeros tiveram forte influência na estabilização dos sistemas, estabilização esta obtida pela interação atrativa e equilíbrio entre eles. Li e Zhong (2016) estudaram misturas de proteína de soro pré-aquecida e pectina em diferentes pH's e, ao avaliarem as propriedades de agregação e gelificação das misturas, concluíram que ligações de hidrogênio e atração hidrofóbica são parcialmente responsáveis pela formação de géis e destacam que para controlar essas propriedades é necessário controlar a relação de massa entre os biopolímeros.

5.3.2.5 Distribuição de tamanho de gotas

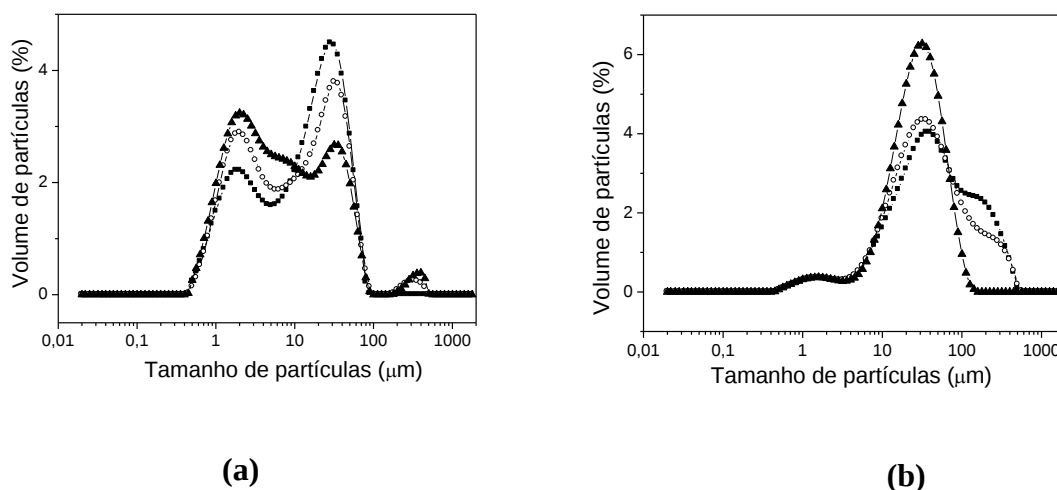
Emulsões 1:1 apresentaram distribuição bimodal acentuada das gotas com diâmetro médio ($D_{3,2}$) de 3,36; 3,94 e 4,4 μm para 5, 10 e 15 % de óleo, respectivamente. Os cremes 4:1 apresentaram distribuição bimodal moderada com $D_{3,2}$ de 13; 14,5 e 15,5 μm para 5, 10 e 15 % de óleo, respectivamente. Possivelmente essa distribuição está relacionada com a proporção de pectina utilizada, pois Simo et al. (2012) constataram que a adição de baixos níveis de pectina em emulsões ocasionou uma distribuição bimodal em todas as amostras.

O diâmetro médio das gotículas teve o mesmo comportamento para as duas proporções, indicando que o aumento do teor de óleo propiciou o aumento proporcional do diâmetro, comportamento esperado devido ao aumento do volume da fase dispersa nas emulsões ou cremes. Também se pressupõe que a proporção de biopolímeros apresentou influência no diâmetro médio das gotas, pois houve um aumento significativo de $D_{3,2}$ da

proporção 1:1 para 4:1. Diferenças em $D_{3,2}$ foram reportadas por Simo et al. (2012), em condições semelhantes a este trabalho, pois ao avaliarem emulsões no pH 4 houve um aumento de diâmetro com o aumento da concentração de pectina.

Emulsões SPI:PEC 1:1 (Figura 5.21a) em sua distribuição bimodal apresentaram predominância do tamanho de gotículas em 2 μm e 30 μm , porém em 5% de óleo houve maior volume de gotículas com 2 μm e menor volume de gotículas com 30 μm . Em 15% de óleo o inverso ocorreu; emulsões com 10% de óleo apresentaram valores intermediários, fato comprovado na morfologia das gotas.

Figura 5.21: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W nas proporções SPI: PEC (a) 1: 1 e (b) 4: 1 com 5% ($\blacktriangle$), 10% ($\circ$) e 15% ($\blacksquare$) óleo de soja.



Os cremes 4:1 apresentaram distribuição bimodal com leve predominância de gotículas com aproximadamente 1,3 μm e forte predominância de gotas com 30 μm (Figura 5.21b). Além disso, foi observado um pico moderado em aproximadamente 200 μm para 10 e 15% de óleo, indicando o empacotamento das gotas devido à separação de fases ocasionada pela coalescência e floculação das gotas. Cho e McClements (2009) observaram mudança na camada do creme de emulsões instáveis e atribuíram isto à diferença na concentração de pectina e ao empacotamento das gotículas dentro da camada de creme, pois segundo eles em concentrações mais elevadas de gotículas há maior disponibilidade de gotas a serem empacotadas.

Mesmo que nos sistemas 4:1 a estabilização das emulsões não tenha ocorrido, os cremes apresentaram praticamente a mesma predominância de gotas das emulsões estáveis obtidas em 1:1 (30 μm) tornando esses cremes ainda mais interessantes e propícios para aplicação

na indústria de alimentos, por apresentarem diversos atributos de interesse, como viscosidade, tamanho de gotas e estabilidade do creme. Essas características podem ter sido potencializadas pela maior proporção de proteína e pelo efeito da aplicação do ultrassom nestas e no sistema, proporcionando a predominância de gotas pequenas nos cremes, conforme discutido anteriormente e relatado por outros autores (LU et al., 2002; JAMBRAK et al. 2009; ARZENI et al. 2012).

CONCLUSÕES PARCIAIS SPI-PECTINA

Os complexos foram reduzidos com a aplicação de ultrassom gerando maior homogeneização das partículas em relação às amostras não tratadas para todas as proporções, comprovados pelas imagens de microscopia ótica e dados reológicos. Isso comprova a eficiência do ultrassom na obtenção de menores partículas e estabilização de sistemas. Emulsões estabilizadas pela combinação de SPI e pectina de alta metoxilação foram estáveis quando empregados na proporção 1:1, com teor de óleo de 5 a 15%, apresentando comportamento newtoniano e pequenas gotículas com distribuição bimodal de 2 e 30 μm , sugerindo sua aplicação em alimentos como substitutos de gordura com baixo nível calórico. Sistemas formulados com menor proporção de pectina (4:1) tiveram comportamento pseudoplástico, sofreram cremeação devido à insuficiência de pectina na fase contínua que impediu o aprisionamento das gotas e favoreceu a floculação e coalescência parcial das gotas. Mesmo assim, os cremes obtidos permaneceram estáveis após 7 dias e não apresentaram separação de óleo, com predominância de gotículas de 30 μm e com atributos favoráveis para aplicação em diversos alimentos. Além disso, as emulsões em SPI:PEC 1:1 e os cremes de 4:1 apresentaram características reológicas importantes nas rampas de aquecimento-resfriamento, indicando o efeito da temperatura e da predominância do biopolímero presente na composição da emulsão permitindo o desenvolvimento de produtos distintos.

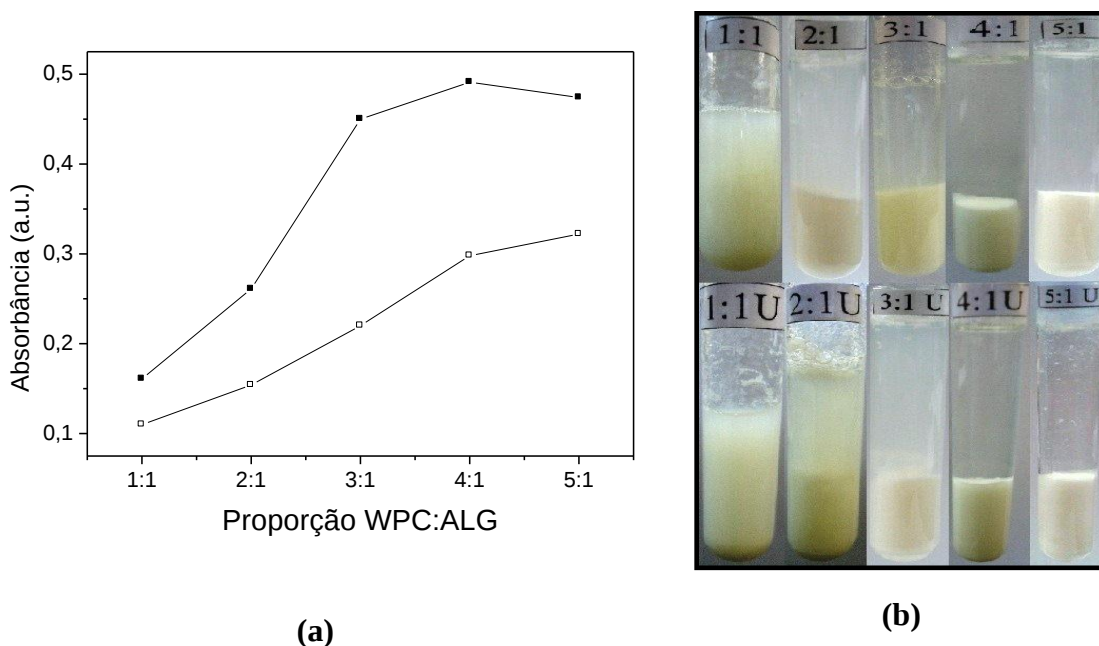
5.4 SISTEMAS WPC-ALGINATO

5.4.1 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS WPC-ALGINATO

5.4.1.1 Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica

As análises turbidimétricas (Figura 5.22a) indicaram comportamento semelhante em ambas amostras, porém amostras sonicadas tiveram menores valores de absorbância, independente da proporção de biopolímeros, indicando que o tratamento ultrassônico ocasionou melhor homogeneização do sistema, com consequente redução do tamanho dos complexos formados, resultando em uma solução menos turva. O ultrassom de alta intensidade tem sido aplicado para obtenção de micropartículas de soro de leite (GORDON; PILOSOFF, 2010), onde o tempo e a frequência de aplicação resultaram em menor turbidez em proteínas de soro (MARTINI, POTTER, WALSH, 2010; MADADLOU et al., 2009).

Figura 5.22: Efeito da proporção WPC:ALG com aplicação de ultrassom (U) (□) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) (APÊNDICE D) e imagens dos sistemas após 48h de repouso (b).



O aumento da proporção de proteína ocasionou maiores valores de absorbância, indicando maior complexação e estabilidade entre os biopolímeros (APÊNDICE D). A influência da aplicação de ultrassom também foi constatada por Hosseini et al. (2013) na interação entre alginato de sódio e β -Lactoglobulina onde a proporção e o pH entre os

biopolímeros apresentaram efeitos importantes na turbidez e no grau de sedimentação na formação das soluções, propiciando complexos solúveis estáveis.

A formação de complexos e a influência do conteúdo de proteína foram comprovadas na avaliação visual dos sistemas, os quais apresentaram mudanças físicas à medida que a quantidade de proteína aumentou em relação ao conteúdo de alginato (Figura 5.22b). Houve formação de duas fases distintas: uma fase inferior rica em biopolímeros e uma fase superior translúcida, indicando a complexação entre o WPC e o alginato (DOUBLIER et al., 2000) proeminentes em proporções WPC:ALG maiores que 3:1. A separação de fases ocorre quando existe uma forte atração eletrostática entre os biopolímeros, que faz com que eles se associem, resultando em uma separação de fases macroscópica (McCLEMENTS, 2006; SPERBER et al., 2009) que é promovida por um ligeiro aumento na densidade de cargas (THIES, 1995), e pela proporção de mistura dos biopolímeros que é um ponto crítico para controlar os parâmetros de equilíbrio de carga entre as proteínas e polissacarídeos, a intensidade das interações e o grau de complexação entre estes (YE, 2008).

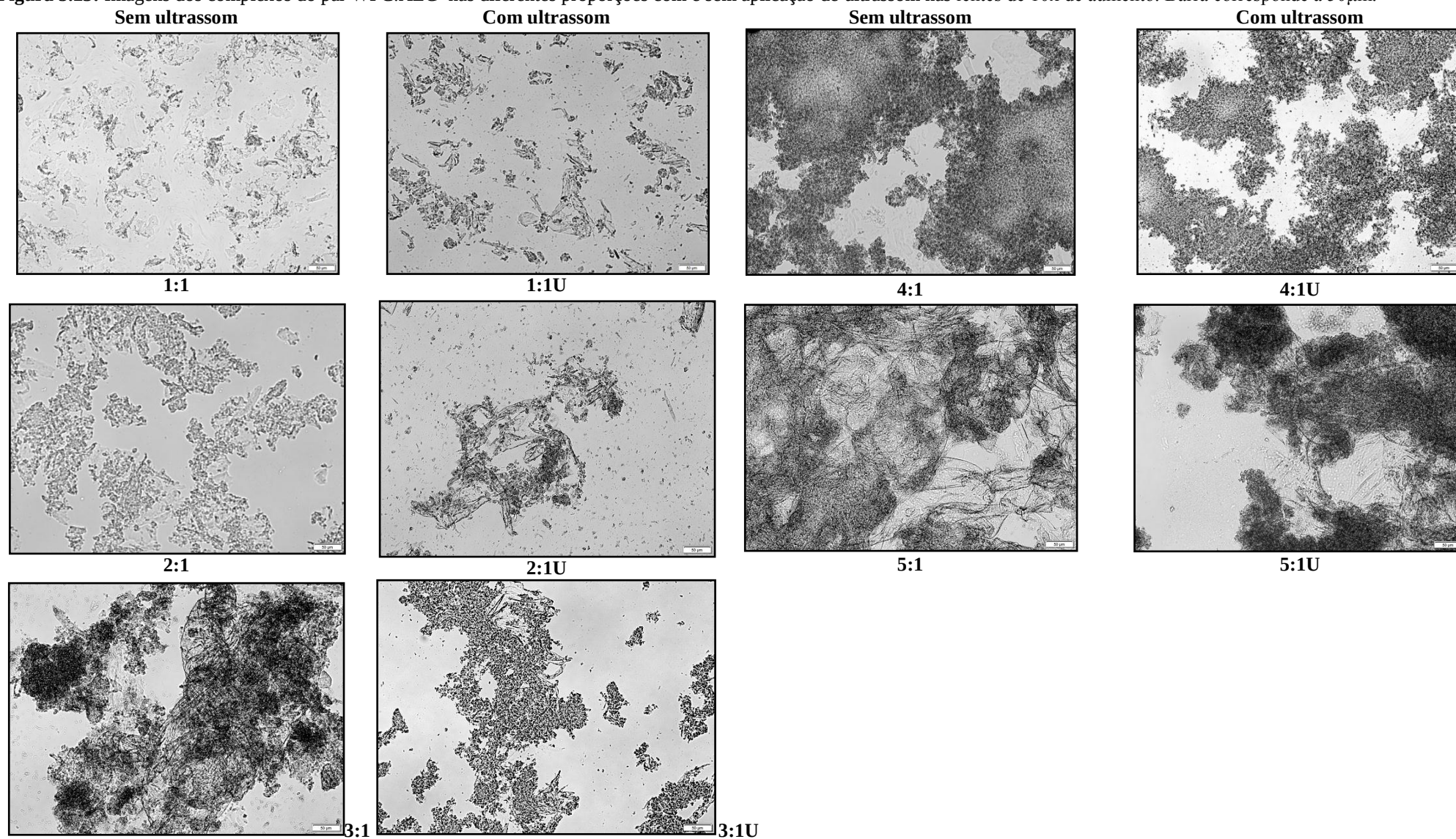
A complexação no pH 3,5 ocorreu poucos minutos após a adição de alginato na solução de proteína e uma aparência turva na fase superior das amostras 1:1, 2:1, 1:1U, 2:1U e 3:1U foi constatada. Resultados semelhantes na separação de fases foram encontrados por Nogueira (2013) ao avaliar o efeito do pH 3,5 e 3,75 em diferentes proporções de WPC com alginato. Essa turbidez possivelmente está relacionada com o excesso de cargas negativas nos sistemas, provenientes das cargas do alginato não neutralizadas pela presença insuficiente de proteína, pois segundo Thies (1995) em soluções turvas há uma maior densidade de cargas com interação forte entre os polieletrólitos. Costa (2014) avaliou a influência da concentração de proteína na aparência visual de misturas de solução de pectina com alginato e solução de proteína (SPI e gelatina de pele de tilápia) em diferentes pH's, e constatou a formação de soluções turvas de intensidades diferentes, quando ambos estavam em excesso. Por outro lado, para proporções de biopolímeros com um potencial zeta da mistura próximo de zero, houve precipitação de complexos deixando o sobrenadante límpido, o que explica o comportamento observado nas proporções 3:1, 4:1 e 5:1.

Segundo Perez et al. (2011), sob condições de pH neutro e concentração de biopolímero relativamente baixa, dois comportamentos interfaciais podem existir em misturas aquosas de WPC e polissacarídeos não-tensoativos: (i) adsorção de WPC através do mecanismo de interação segregativa e incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros (PEREZ et al. 2009; PEREZ et al; 2010a); e (ii) a adsorção interfacial do WPC

e polissacarídeos não-tensoativos juntos sob a forma de macromoléculas híbridas estabilizadas por interação associativa (atrativos) entre biopolímeros (PEREZ et al., 2009; PEREZ et al., 2010b).

As imagens de microestrutura (Figura 5.23) permitiram visualizar o efeito do ultrassom e a intensidade da formação de complexos entre WPC e alginato, sendo mais acentuada com o aumento da proporção de proteína no sistema, justificando a separação de fases. Além disso, as proporções 1:1 e 2:1 apresentaram menor quantidade de complexos formados e maior quantidade de solução diluída, justificando a avaliação visual e o porquê não foi possível avaliá-los no teste oscilatório (item 5.4.1.3). Gordon e Pilosof (2010) constataram que o aumento da concentração de proteínas de soro e a aplicação do ultrassom influenciaram no tamanho das partículas. Feng et al. (2017a) avaliaram a microestrutura de alginato submetido ou não ao tratamento ultrassônico, constataram diferenças significativas na microestrutura das amostras e concluíram que o alginato sonificado apresentou maior atividade interfacial. Demais estudos com alginato e tratamento ultrassônico afirmam que mudanças na distribuição de tamanho de partícula são atribuídas às forças de cisalhamento, micro correntes e turbulência da sonicação e os colapsos das bolhas de cavitação são os principais responsáveis pelas mudanças na estrutura dos biopolímeros (CAMINO; PEREZ; PILOSOFF, 2009; FENG et al., 2016).

Figura 5.23: Imagens dos complexos do par WPC:ALG nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes de 10x de aumento. Barra corresponde a 50µm.



5.4.1.2 Comportamento reológico – Cisalhamento estacionário

O modelo da lei da Potência ajustou-se bem às curvas de fluxo da fase coacervada ($R^2 > 0,9$), com comportamento pseudoplástico ($n < 1$) e aumento do índice de consistência (K) com o aumento da proporção de proteína, principalmente para as proporções 3:1, 4:1 e 5:1 (Tabela 5.7, APÊNDICE F), onde se constatou maior separação de fases, formação de complexos e leve tixotropia (Figuras 5.24c, 5.24d, 5.24e). Tan et al. (2015) caracterizaram propriedades reológicas de suspensão de proteínas de soro de leite tratada com ultrassom e os valores do índice de consistência, aumentaram significativamente com a concentração de proteína.

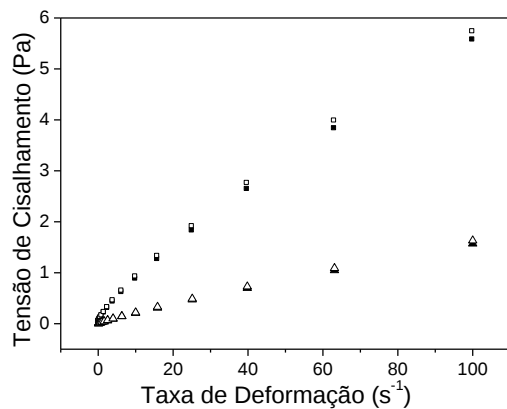
Embora haja forte interação dos biopolímeros, a tixotropia provavelmente foi ocasionada por ser um sistema heterogêneo e não compacto com maior volume de fase aquosa, constatado na microscopia ótica (Figura 5.23) e necessitar de menor tensão de ruptura, havendo maior efeito da taxa de deformação. Ou seja, a taxa de deformação aplicada teve forte influência por ocasionar a “quebra” dos complexos heterogêneos formados, tendendo à uma homogeneidade reduzindo a viscosidade o que gerou a tixotropia.

Amostras sonicadas apresentaram comportamento semelhante, porém o tratamento ultrassônico ocasionou redução nos valores de K e diminuição na tensão de cisalhamento em comparação às amostras não sonicadas para a maioria das proporções, indicando rompimento de agregados e redução de viscosidade (Figura 5.24). A aplicação de ultrassom por curto período de tempo em soluções de proteína de soro de leite quebra os agregados e previne sua reconstituição reduzindo a viscosidade (CHANDRAPALA et al., 2012). Redução no índice de consistência e comportamento pseudoplástico também foram relatados por Arzeni et al. (2012) ao comparar o efeito do ultrassom em amostras de WPC.

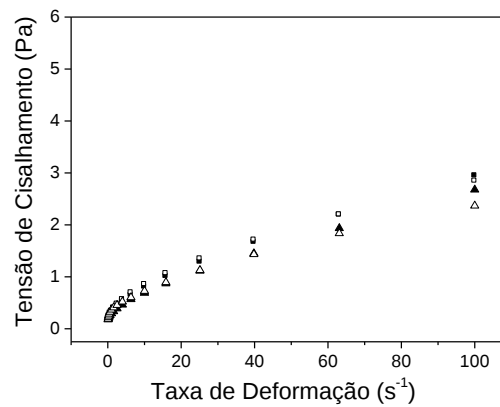
Tabela 5.7: Proporções entre os componentes do sistema misto (WPC, ALG e água) e valores de índice de consistência (K) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções WPC:ALG sem e com aplicação de ultrassom.

WPC:ALG	Proporções entre os componentes		Sem aplicação de ultrassom		Com aplicação de ultrassom	
	WPC:H ₂ O	ALG:H ₂ O	Rampa 1 K (Pa.s ⁿ)	Rampa 2 K (Pa.s ⁿ)	Rampa 1 K (Pa.s ⁿ)	Rampa 2 K (Pa.s ⁿ)
1:1	1:98,0	1:98	0,137	0,148	0,028	0,029
2:1	1:73,5	1:147	0,251	0,291	0,213	0,286
3:1	1:65,3	1:196	9,799	10,761	13,292	15,746
4:1	1:61,3	1:245	18,125	19,764	10,866	12,594
5:1	1:58,8	1:294	14,416	20,450	17,713	19,864

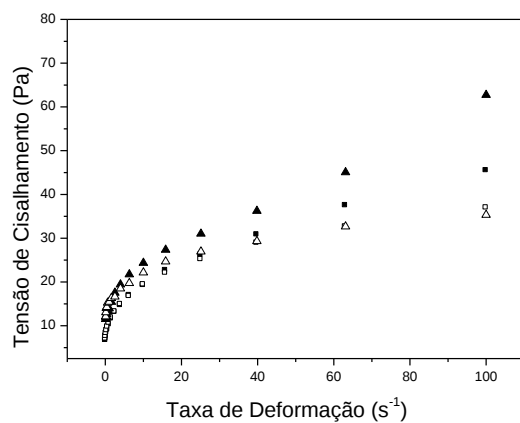
Figura 5.24: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente (■; ▲) e ascendente (Δ; □) do par WPC:ALG.



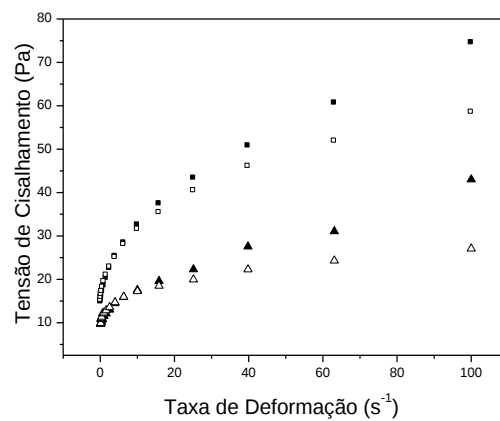
(a)



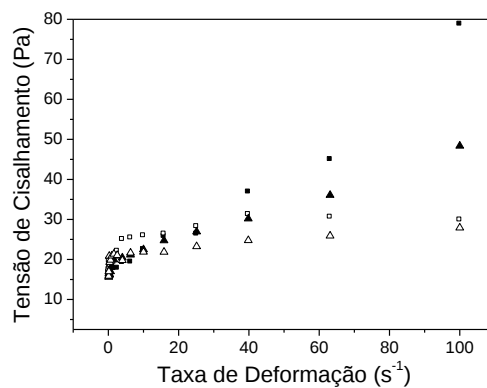
(b)



(c)



(d)



(e)

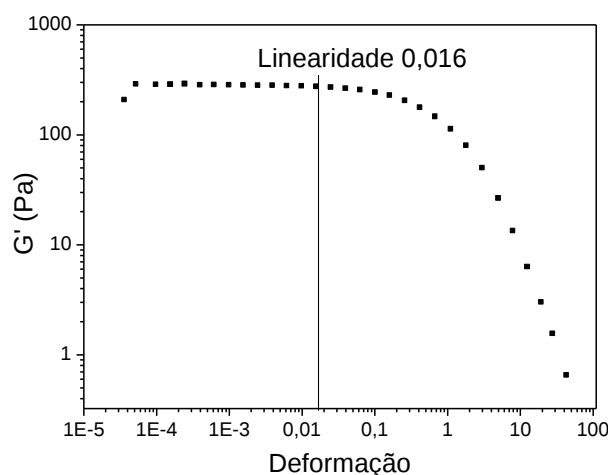
A variação nos parâmetros reológicos está relacionada com a proporção entre os diferentes componentes do sistema (Tabela 5.7). Com o aumento de WPC, a relação WPC:H₂O aumentou e a relação ALG:H₂O diminuiu, permitindo maior reticulação do alginato e fortes interações dos biopolímeros, pois houve maior equilíbrio de cargas dentre eles. Weinbreck e Wientjes (2004) descreveram por reologia e outras análises a formação de um coacervado com cadeias de goma acácia reticuladas eletrostaticamente com proteínas de soro de leite e a alta viscosidade em determinado pH foi explicada pelas fortes interações eletrostáticas entre proteínas e polieletrólitos.

Essa forte interação eliminou parcialmente o solvente (água) do sistema para a fase superior que se tornou mais translúcida com o aumento do conteúdo proteico, conforme observado na Figura 5.22b.

5.4.1.3 Comportamento reológico – Cisalhamento oscilatório

As proporções WPC:ALG 1:1 e 2:1 não apresentaram região de viscoelasticidade linear (RVL), o que impossibilitou a análise oscilatória para essas amostras, que foi justificada pelas imagens de microscopia ótica por apresentarem pequena formação de complexos e maior quantidade de fase fluida, tendendo ao comportamento viscoso (Figura 5.23). Considerando a RVL das outras proporções WPC:ALG, adotou-se a deformação de 1,6 % para a determinação dos espectros mecânicos (Figura 5.25).

Figura 5.25: Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações na frequência de 1 rad/s para o sistema WPC:ALG.

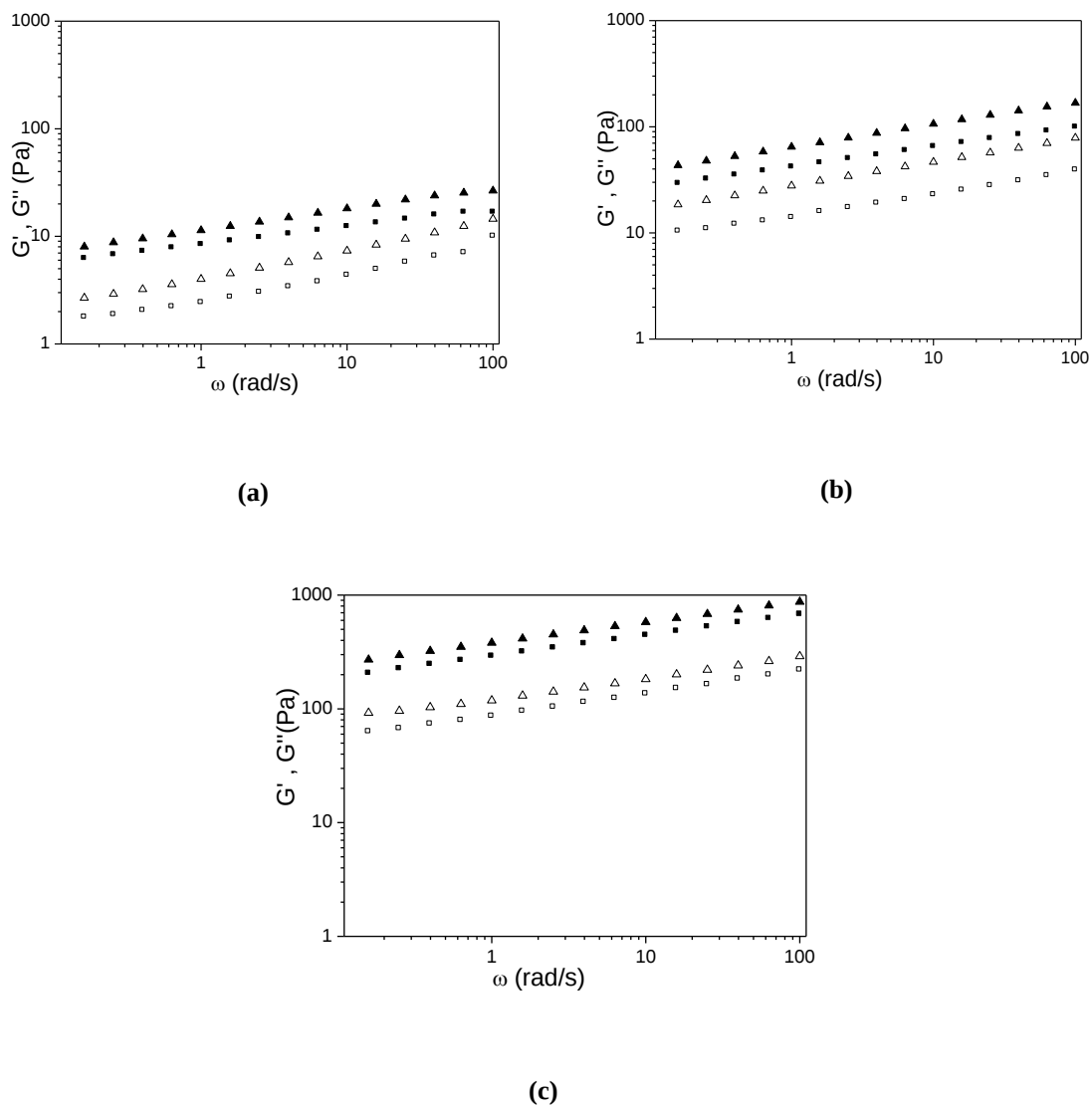


Os módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') apresentaram praticamente o mesmo comportamento para todas as proporções analisadas sendo G' maior que G'' em toda faixa de frequência aplicada (Figura 5.26), indicando um material estruturado, que se intensificou devido ao aumento do teor de proteína e da rede formada pelo alginato com o aumento da disponibilidade de água (Tabela 5.7). Amostras de alginato modificados hidrofobicamente apresentaram G' com uma ordem de grandeza de 100 kPa, valor significativo para um material com tão alto teor de água, que evidenciou sinergia entre os mecanismos de gelificação: uma rede associativa conduzida por interações hidrofóbicas e reticulação química (CHOUDHARY; BHATIA, 2012). A aplicação do ultrassom potencializou esses módulos, pois em todas as proporções os valores de G' e G'' foram superiores às amostras sem sonicação, apresentando comportamento elástico predominante. Comportamento similar foi observado para o coacervado de albumina de soro bovino-pectina, apresentando estruturas de rede com comportamento elástico (RU et al., 2012), assim como em um estudo da modificação das propriedades reológicas e estruturais da mistura de proteína de soro e gelatina através de alta pressão, foi detectado um impacto notável da alta pressão sobre as propriedades estruturais, gerando maiores valores de G' e agregados relativamente monodispersos de proteína de soro de leite (DEVI et al., 2014).

Embora o sistema WPC:ALG apresente forte interação dos biopolímeros com formação de complexos, sua microestrutura não é compacta e possui maior teor de solvente (água) com complexos grandes e heterogêneos dispersos nesse meio, impedindo a formação de uma rede definida. Ao aplicar o ultrassom ocorreu uma maior homogeneização desses complexos tornando uma rede estruturada, homogênea e compacta, fazendo com que os módulos G' e G'' se intensificassem. Ru et al. (2012) constataram que um equilíbrio entre as cargas positivas e negativas dos biopolímeros favoreceu a formação de coacervados albumina de soro bovino-pectina com estruturas de rede mais compactas.

É possível concluir que estruturas parciais de gelificação foram formadas entre a proteína e o polissacarídeo através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas dos componentes.

Figura 5.26: Módulos de armazenamento, G' (■; ▲), e módulo de dissipação, G'' (Δ; □) dos complexos para proporções 3:1 (a), 4:1 (b) e 5:1 (c) com aplicação de ultrassom (triângulos) e sem aplicação do ultrassom (quadrados) do par WPC:ALG.



5.4.2 EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS WPC-ALGINATO

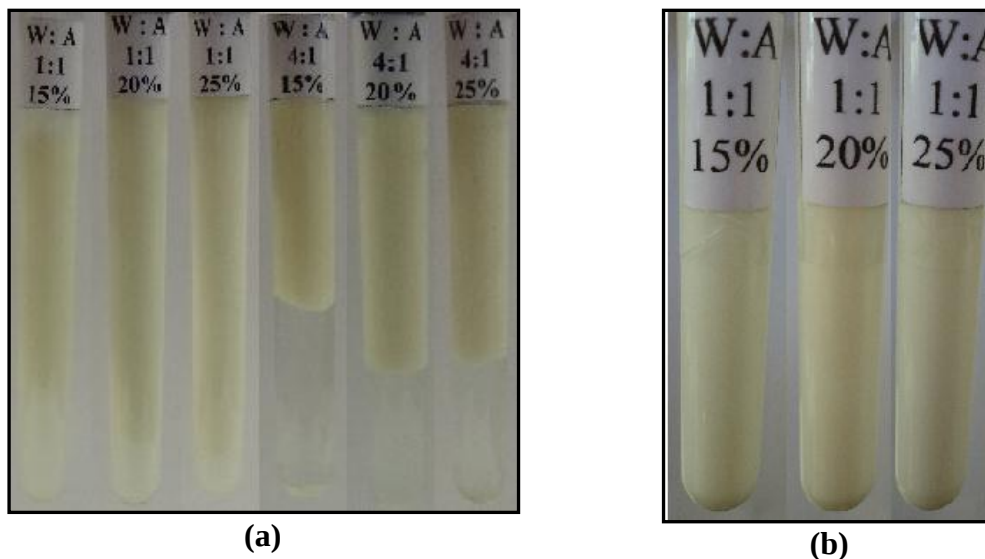
5.4.2.1 Avaliação visual, índice de cremação (IC) e composição química

Imagens das emulsões sonicadas preparadas pelo complexo WPC:ALG (Figura 5.27a) apresentaram cremação.

Emulsões com maior concentração de alginato (1:1) apresentaram fase inferior aquosa turva, com índice de cremação de 33,81 %, 23,78 % e 15,04 % para 15, 20 e 25 % de teor de óleo, tendendo a uma maior estabilidade. Na proporção 4:1 houve uma separação de fases bem definida, indicando forte interação atrativa entre os biopolímeros devido à menor concentração de polissacarídeo, conforme discutido no item 5.4.1.2, com índice de

cremeação de 52,88 %, 40,93 % e 37,02 % para 15, 20 e 25 % de óleo (APÊNDICE H). Cho e McClements (2009) ao avaliarem diferentes concentrações de pectina e gotículas na estabilização de emulsões atribuíram a instabilidade à uma concentração crítica de pectina para ocorrência de floculação que era independente da concentração inicial de gotículas.

Figura 5.27: Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (WPC:ALG) em diferentes teores de óleo (15, 20 e 25 %). Imagens após 48 horas de repouso. (a) ultrassom. (b) homogeneizador a alta pressão.



À medida que o teor de óleo aumentou em relação à solução total, a fase aquosa diminuiu para as duas proporções devido ao aumento da área de contato, proporcionando maior adsorção dos biopolímeros, dando maior estabilidade às emulsões constatada no decorrer dos dias (30 dias ou mais). Considerando que o óleo presente no sistema tende a se deslocar para a fase creme, o aumento do volume ocupado por esta fase ocorreu devido ao aumento da massa (ou volume) de óleo presente nas emulsões. Com esse aumento as relações WPC:Óleo e H_2O :óleo diminuíram (Tabela 5.8), disponibilizando maior número de gotas para a adsorção proteica interfacial e consequente redução da fase aquosa. Em maiores concentrações de gotículas há mais gotículas disponíveis para alojar na camada de creme e a floculação tende a formar uma rede de partículas tridimensional que se estende ao longo do tubo, aumentando a fase creme (CHO; McCLEMENTS, 2009; McCLEMENTS, 2005a).

Tabela 5.8: Proporções entre os diferentes componentes das emulsões e a composição química das fases creme e soro das emulsões nas proporções WPC:ALG 1:1 e 4:1.

Proporção entre componentes							
WPC:ALG (1:1)				WPC:ALG (4:1)			
Óleo (%)	WPC:Óleo	H ₂ O:Óleo	ALG:H ₂ O	Óleo (%)	WPC:Óleo	H ₂ O:Óleo	ALG:H ₂ O
15	1:17,6	5,55:1	1:98	15	1:11,1	5,55:1	1:245
20	1:25,0	3,90:1	1:98	20	1:15,6	3,90:1	1:245
25	1:33,3	2,93:1	1:98	25	1:20,8	2,93:1	1:245

Composição química 1:1						
Componentes químicos	Fase creme – Óleo (%)			Fase soro – Óleo (%)		
	15	20	25	15	20	25
Proteína	0,9546 ^{n.s.}	1,1244 ^{n.s.}	1,0175 ^{n.s.}	0,4864 ^{n.s.}	0,5205 ^{n.s.}	0,4640 ^{n.s.}
Lipídeos	21,4278 ^c	27,4603 ^b	31,6040 ^a	1,1151 ^c	1,0763 ^b	0,2900 ^a
Água	71,2245 ^a	69,8390 ^b	61,6488 ^c	95,5793 ^{n.s.}	95,7460 ^{n.s.}	95,6399 ^{n.s.}
Carboidratos	6,3934 [*]	1,9098 [*]	5,7296 [*]	2,8192 [*]	2,6572 [*]	4,1861 [*]

Composição química 4:1						
Componentes químicos	Fase creme – Óleo (%)			Fase soro – Óleo (%)		
	15	20	25	15	20	25
Proteína	1,9639 ^{n.s.}	1,8704 ^{n.s.}	1,9811 ^{n.s.}	0,3830 ^{n.s.}	0,4662 ^{n.s.}	0,4037 ^{n.s.}
Lipídeos	27,8949 ^c	34,0870 ^b	43,1306 ^a	0,2340 ^{n.s.}	0,1348 ^{n.s.}	0,3003 ^{n.s.}
Água	67,8257 ^a	61,2827 ^b	51,4181 ^c	97,3092 ^{n.s.}	97,0450 ^{n.s.}	97,3558 ^{n.s.}
Carboidratos	2,3156 [*]	2,7598 [*]	3,4702 [*]	2,0738 [*]	2,3540 [*]	1,9392 [*]

(*) Conteúdo de carboidrato obtido por diferença. (n.s. e *) na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$) de acordo com o teste de médias de Tukey.

Além disso, no sistema WPC:ALG 4:1 a proporção WPC:Óleo foi 1,6 vezes maior que o sistema 1:1, disponibilizando maior fração proteica para recobrimento das gotas na interface óleo/água. Porém, isso não supriu a ausência de alginato, o que aumentaria a viscosidade da fase aquosa contínua (H₂O:ALG) e estabilizaria as emulsões. O efeito da concentração de alginato foi comprovado ao avaliar a estabilidade do sistema na proporção WPC:ALG 1:1 que apresentou a proporção H₂O:ALG 2,5 vezes menor em relação à proporção 4:1, com obtenção de menores índices de cremação, mostrando que maiores concentrações de alginato de sódio favorecem a obtenção de emulsões estáveis por aumentar a viscosidade da fase contínua, evitando a floculação das gotas. Harnsilawat et al. (2006b) destacam que emulsões estáveis obtidas com alginato foram formadas quando a concentração de polissacarídeo foi suficiente para saturar as gotículas revestidas com proteína. O efeito da concentração de polissacarídeos utilizada na estabilização de emulsões foi relatado por outros autores e também destacam o efeito da concentração crítica de polissacarídeo acima do qual as interações de depleção farão com que as gotículas se

agreguem (CHO; McCLEMENTS, 2009; PERRECHIL E CUNHA, 2013; SIMO et al. 2012, McCLEMENTS, 2005b).

A composição química das fases creme e soro das emulsões (Tabela 5.8) permitiu constatar o efeito de cada componente na estabilização. Lipídeos e água foram variáveis com efeito significativo ($p \leq 0,05$) na fase creme em ambas proporções, confirmando o aumento de volume da fase creme em relação ao aumento de óleo e a consequente redução de água. Na fase soro da proporção 1:1 somente lipídeos apresentou significância ($p \leq 0,05$), o que justifica tendência à estabilização e fase turva indicando que as gotas não foram alojadas somente em uma fase. Em contrapartida, na fase soro da proporção 4:1 nenhum dos componentes apresentou efeito significativo ($p \geq 0,05$), indicando a ausência dos biopolímeros e do óleo nessa fase, que se mostrou límpida e translúcida.

A fase creme das duas proporções apresentou maior teor de proteína, carboidratos e lipídeos e menor quantidade de água, comprovando que o WPC adsorveu na interface óleo-água e o alginato recobriu as gotículas de óleo revestidas, gelificando parcialmente a fase aquosa contínua, proeminente em 1:1, e justificando tendência à estabilização. Em contrapartida, em 4:1, a fase soro apresentou maior quantidade de água, comprovando que a concentração de alginato foi insuficiente para gelificar a fase contínua aquosa e aprisionar as gotículas de óleo. A adsorção de polieletrólitos pode levar à estabilidade da emulsão devido à formação de multicamada ou à instabilidade das emulsões devido à floculação (HILL, 1996; GUZEY; McCLEMENTS, 2006; McCLEMENTS, 2007).

Embora as emulsões não tenham sido totalmente estáveis, o tratamento ultrassônico reduziu o tamanho das gotículas de óleo, aumentando a área interfacial das gotas e gerando menor cremeação, porém em combinação com outros fatores não foi suficiente para tornar o sistema estável.

Ao submeter emulsões com maior concentração de polissacarídeo (WPC:ALG 1:1) à alta pressão, as emulsões tornaram-se totalmente estáveis (Figura 5.27b) mostrando a influência dos diferentes processos de homogeneização na estabilização de emulsões. A homogeneização é um processo obtido aplicando uma agitação mecânica intensa a uma mistura líquida usando, por exemplo, um misturador de alto cisalhamento, um moinho coloidal, um microfluidizador, um homogeneizador de alta pressão ou ultrassônico (McCLEMENTS, 2005a; McCLEMENTS 2007) e é responsável por reduzir o tamanho das gotículas (WALSTRA, 1993; WALSTRA, 2003). Neste caso, a alta pressão propiciou maior homogeneização do sistema e redução no tamanho das gotículas, consequentemente gerou uma maior área interfacial, favorecendo a estabilidade das emulsões. A distribuição de

tamanho das gotículas influencia na textura, estabilidade, aparência, atributos sensoriais e qualidade nutricional da emulsão (McCLEMENTS, 2005a; McCLEMENTS 2007). Perrechil e Cunha (2010) avaliaram a influência de diversos fatores na estabilidade de emulsões e concluíram que a homogeneização a alta pressão e o aumento do conteúdo de goma de alfarroba levaram à formação de emulsões mais estáveis devido à redução do tamanho das gotículas de óleo e ao aumento da viscosidade, respectivamente.

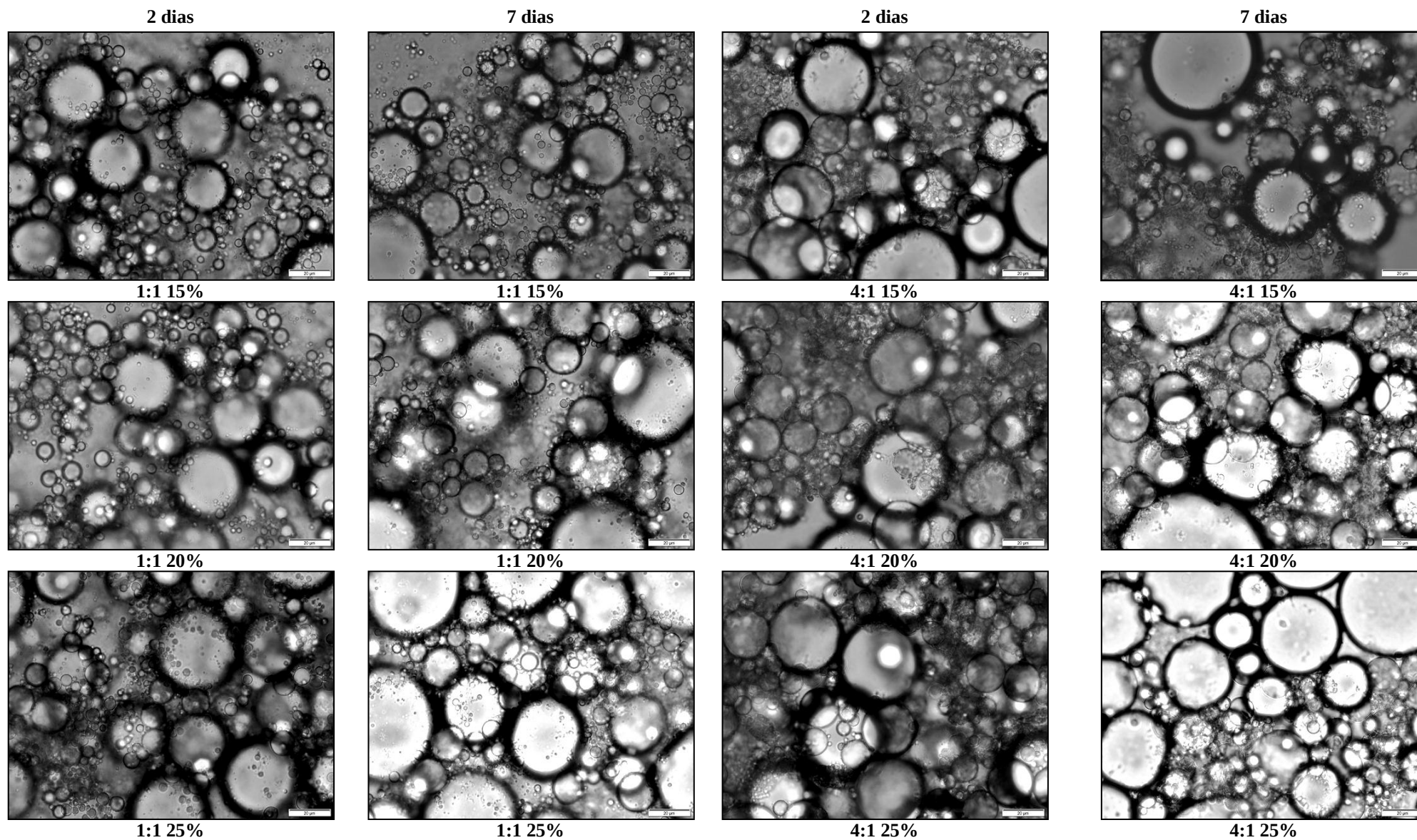
5.4.2.2 Microscopias ótica e confocal de varredura a laser

A microestrutura das emulsões preparadas com ultrassom (Figura 5.28) apresentou aumento no volume de gotas com o aumento do teor de óleo em ambas proporções. O aumento do teor de óleo na emulsão, aumenta a população de gotas de óleo existentes, tornando maior a probabilidade de colisão e a coalescência entre elas (KUNERT, 2007).

As imagens mostraram cremes com gotas grandes e pequenas bem definidas e dispersas em um sistema empacotado aparentemente “estável”. Possivelmente, a forte interação gerou melhor adsorção da proteína na interface óleo/água e do polissacarídeo nas gotículas revestidas, onde ambos desenvolveram sua capacidade emulsificante e estabilizante, formando uma bicamada na gota de óleo e eliminação parcial do sistema aquoso, que também foram melhoradas pelo tratamento ultrassônico (CAMINO et al., 2009, CHANDRAPALA et al., 2012, KALTSA et al., 2013). Já o aumento no tamanho das gotas ocorreu devido ao empacotamento do sistema e pela junção de gotas próximas entre si (coalescência parcial) ou pelo crescimento das gotas maiores à custa da difusão de gotas menores que, na sequência, se fundiram às maiores (Ostwald ripening) (McCLEMENTS, 2007).

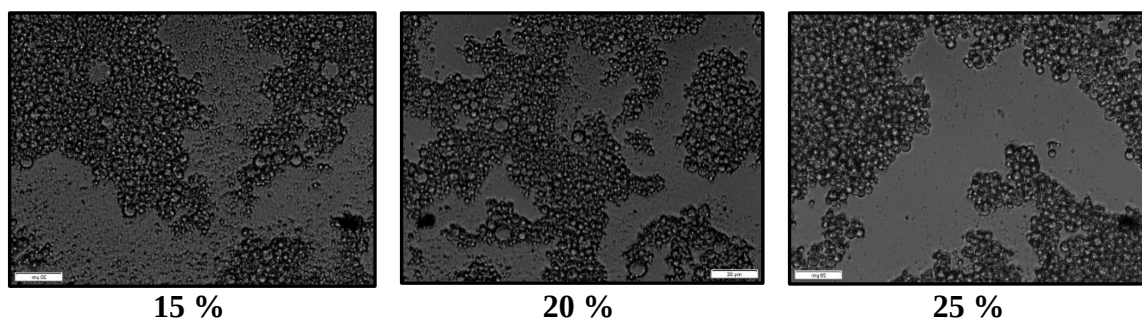
Imagens dos cremes das emulsões com maior teor de alginato (WPC:ALG 1:1) em comparação ao sistema 4:1 apresentaram um sistema ligeiramente menos empacotado e com maior volume de gotículas menores, tendendo à estabilização, conforme observado na avaliação visual (Figura 5.27a). Ao aumentar a concentração inicial de alginato de sódio, o grau de agregação de gotículas diminuiu, indicando as melhores condições para produzir emulsões estáveis como matrizes de encapsulamento (FIORAMONTI et al., 2015).

Figura 5.28: Imagens das emulsões WPC:ALG tratadas com ultrassom nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde 20µm.



Emulsões WPC:ALG 1:1 homogeneizadas em alta pressão não tiveram forte influência do teor de óleo no tamanho das gotículas, havendo somente aumento no volume de gotas, entretanto apresentaram redução significativa em seu tamanho em relação às amostras sonicadas para todos os teores de óleo (Figura 5.29), comprovando o aumento da área interfacial que torna as emulsões estáveis. O efeito da alta pressão foi observado por microscopia ótica por Noello et al. (2016) em emulsões estabilizadas por WPC e pectina em diferentes composições e constataram uma distribuição estreita e uniforme no tamanho das gotículas, assim como sistemas mais estáveis e com menores gotículas em maior concentração de polissacarídeo foram relatados por Perrechil e Cunha (2010).

Figura 5.29: Imagens das emulsões tratadas com alta pressão do par WPC:ALG na proporção 1:1 com diferentes teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm.

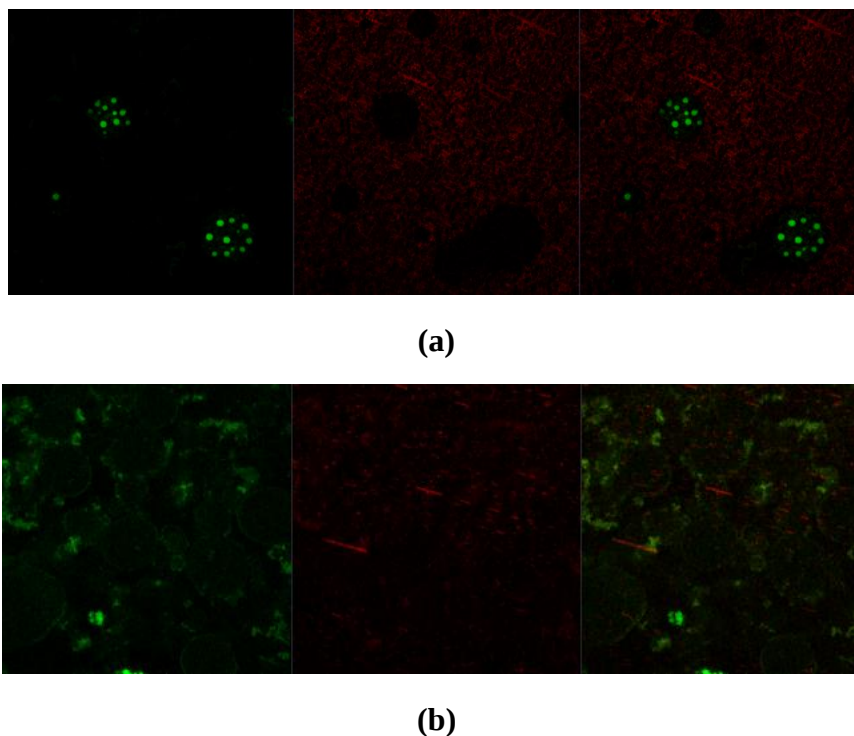


A microscopia confocal das amostras sonicadas comprovou que as gotículas de óleo foram revestidas pelo WPC (em verde) e recobertas e aprisionadas pelo alginato de sódio (em vermelho) em uma rede tridimensional, indicando a interação entre os biopolímeros e a gelificação parcial da fase contínua pelo polissacarídeo, com a formação de diferentes estruturas em cada proporção de biopolímero estudada (Figura 5.30). Foi constatado um sistema instável com a presença de gotas maiores dispersas na rede e com flocculação, processo que as gotas emulsificadas se associam em flocos sem a destruição das gotas individuais (McCLEMENTS, 2005a), o que favoreceu a formação do creme, sendo proeminente para menores proporções de alginato. Essas diferenças na estrutura dos agregados podem ser atribuídas aos diferentes mecanismos responsáveis pela flocculação de gotículas: flocculação em ponte (forte, irreversível) e flocculação de depleção (fraca, reversível) (CHO; McCLEMENTS, 2009) e pela concentração de polissacarídeo (SIMO et al. 2012; FIORAMONTI et al., 2015)

A microestrutura do creme das emulsões mostrou ser um material de interesse devido suas características reológicas, por ser um material mais estruturado que foi estável no

decorrer dos 7 dias, permitindo aplicações distintas na indústria de alimentos, como molhos e sobremesas e na microencapsulação.

Figura 5.30: Micrografias confocais a laser de emulsões com 25 % de óleo de soja nas proporções WPC:ALG 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: ALG corado usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: WPC corado usando FITC. As imagens foram obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 μm



5.4.2.3 Comportamento reológico – Cisalhamento estacionário

O modelo de Sisko apresentou um bom ajuste ($R^2 > 0,999$) na viscosidade aparente dos cremes das amostras sonicadas, as quais apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$). A viscosidade infinita (η_∞) se manteve constante em torno de 0,2 e o índice de consistência (K) aumentou com o aumento de óleo e WPC (Tabela 5.9, APÊNDICE G), indicando o aumento do empacotamento das gotas em maiores proporções de proteína; Consequentemente houve um ligeiro aumento da viscosidade aparente que foi favorecida pelo maior grau de floculação e volume de gotas (Figuras 5.31a, 5.31b), o que está de acordo com trabalhos anteriores (McCLEMENTS, 2005a; McCLEMENTS, 2007; CHUNG; DEGNER; McCLEMENTS, 2012).

Não houve diferenças entre as rampas 1 e 2, indicando ausência de tixotropia para as duas proporções em todos teores de óleo. Possivelmente a aplicação de ultrassom inibiu a

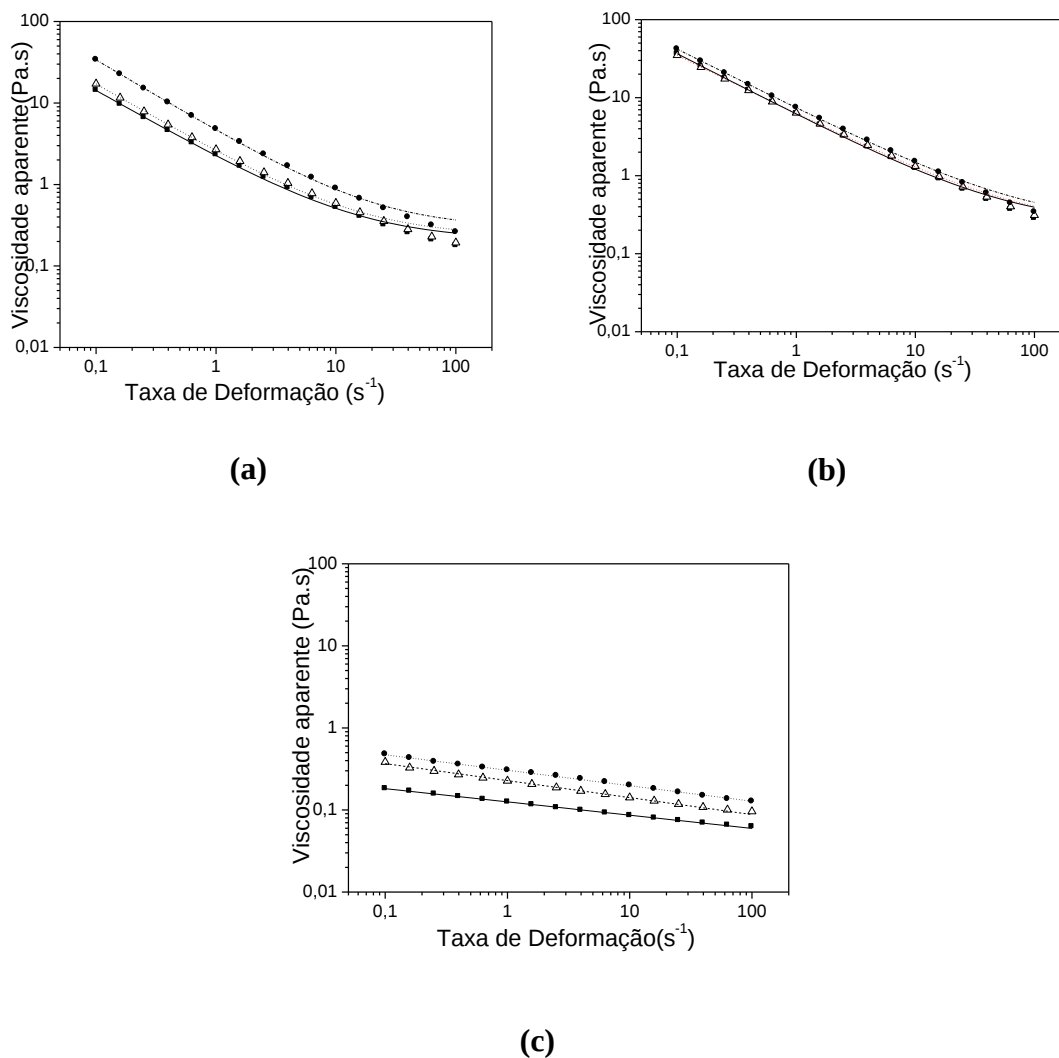
tixotropia por ocasionar a diminuição do tamanho das gotículas e maior homogeneidade do sistema, o que é de grande interesse para a textura em determinados alimentos.

Tabela 5.9: Valores de índice de consistência (K) e viscosidade infinita (η_{∞}) a 25 °C nas rampas descendente (1) e ascendente (2) na proporção WPC:ALG 1:1 e 4:1 das emulsões tratadas com ultrassom ou alta pressão.

Modelo de Sisko (Ultrassom)				
WPC:ALG	Rampa 1		Rampa 2	
% Óleo	K (Pa.s)	η_{∞}	K (Pa.s)	η_{∞}
1:1 15%	2,056	0,209	2,177	0,173
1:1 20%	2,394	0,231	2,576	0,187
1:1 25%	4,414	0,291	4,994	0,202
4:1 15%	5,957	0,234	6,609	0,128
4:1 20%	6,097	0,215	6,771	0,099
4:1 25%	7,202	0,240	8,026	0,081
Modelo Lei da Potência (Alta Pressão)				
WPC:ALG	Rampa 1		Rampa 2	
% Óleo	K (Pa.s)		K (Pa.s)	
1:1 15%	0,125		0,130	
1:1 20%	0,228		0,236	
1:1 25%	0,305		0,331	

Emulsões WPC:ALG 1:1 estabilizadas com homogeneização em alta pressão apresentaram um bom ajuste do modelo Lei da Potência ($R^2 > 0,99$), comportamento pseudoplástico ($n < 1$) e aumento de K proporcional ao aumento da fração de óleo. Entretanto, a alta pressão apresentou redução significativa da viscosidade aparente em comparação às amostras sonicadas, com tendência ao comportamento newtoniano ($n \cong 0,8$) (Figura 5.31c). Esse tipo de comportamento normalmente é associado às emulsões bem diluídas, em que a viscosidade da emulsão não depende da taxa de deformação aplicada (MONTALVO, 2008). Perrechil e Cunha (2010) avaliaram a influência de diferentes fatores no comportamento reológico de emulsões e constataram que emulsões submetidas a alta pressão foram estáveis, newtonianas e com baixa viscosidade. Isso indica que a alta pressão preveniu a floculação e agregação das gotas, o que resultou em menores viscosidades. A homogeneização a alta pressão é o método mais eficiente para a produção de emulsões e podem dissociar os agregados coloidais, além de ocasionar a redução do tamanho de gotas e da velocidade de cremação aumentando a estabilidade das emulsões (GALAZKA et al., 2000; DONSI, et al., 2010; PERRECHIL; CUNHA, 2010; YIN et al., 2012).

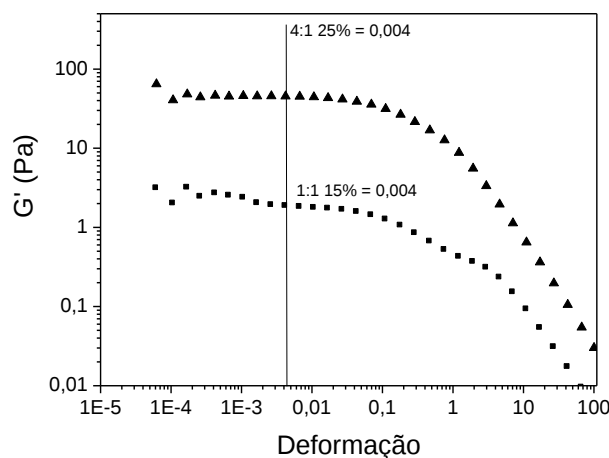
Figura 5.31: Viscosidade das emulsões (rampa ascendente) com 15 % (■), 20 % (Δ) e 25 % (●) de óleo de soja na proporção WPC:ALG 1:1 (a) e 4:1 (b) sonicadas com ajuste do Modelo de Sisko e 1:1 (c) homogeneizadas a alta pressão com ajuste da Lei da Potência.



5.4.2.4 Comportamento reológico – Cisalhamento oscilatório

A análise da RVL para amostras WPC:ALG sonicadas demonstrou ser possível realizar ensaios oscilatórios somente na proporção 4:1 por ser um material mais estruturado com valores de G' constantes até deformação de 0,1. Sendo assim, o valor de deformação adotado foi de 0,4 % (0,004) (Figura 5.32). Na proporção 1:1 não foi possível detectar a RVL, inviabilizando a obtenção de espectros mecânicos. Isso comprova o maior grau de floculação das gotas em 4:1.

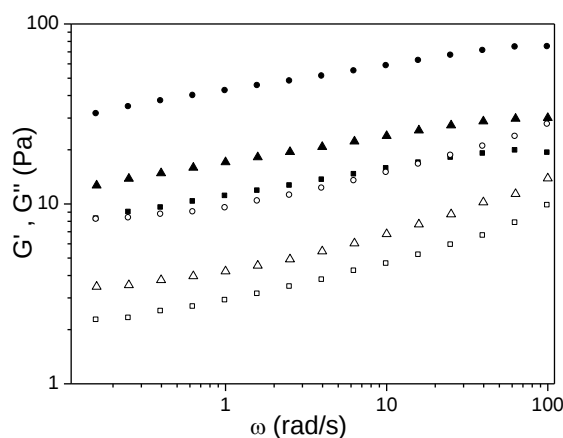
Figura 5.32: Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações na frequência de 1 rad/s para emulsões do sistema WPC:ALG.



As emulsões 1:1 estabilizadas com a aplicação de alta pressão também não apresentaram RVL, confirmando sua baixa viscosidade e tendência ao comportamento newtoniano. Devi et al. (2014) constataram por reologia que a alta pressão tem um forte impacto nas características reológicas e morfológicas de misturas de proteínas de soro com gelatina.

Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') dos cremes das emulsões 4:1 apresentaram praticamente o mesmo comportamento para todos os teores de óleo analisados, sendo G' maior que G'' em toda faixa de frequência aplicada e indicando um material estruturado. Esses valores se intensificaram com o aumento da fração de óleo, atingindo uma ordem de grandeza por volta de 30 Pa (Figura 5.33). Dados semelhantes foram reportados por Perrechil e Cunha (2010) para emulsões instáveis que se comportaram como gel com $G' > G''$, assim como Fernández Farrés e Norton (2014) atribuíram maiores valores de G' de géis de alginato ao aumento de contato das partículas e ao elevado volume de fase dispersa. Esses dados confirmam a avaliação visual e vão ao encontro dos resultados reológicos dos complexos, onde em 4:1 notou-se maior complexação entre os biopolímeros com eliminação parcial da fase aquosa com $G' > G''$.

Figura 5.33: Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos) para emulsões na proporção WPC:ALG 4:1 com 15 % ($\blacksquare, \square$), 20 % ($\blacktriangle, \triangle$) e 25 % ($\bullet, \circ$).



Dessa forma, os cremes mostraram ser um material estruturado por formarem uma rede rígida devido à forte interação atrativa entre o WPC e o alginato, possibilitando sua aplicação na indústria de alimentos na melhoria de formulações ou no desenvolvimento de novos produtos.

5.4.2.5 Rampas de aquecimento-resfriamento

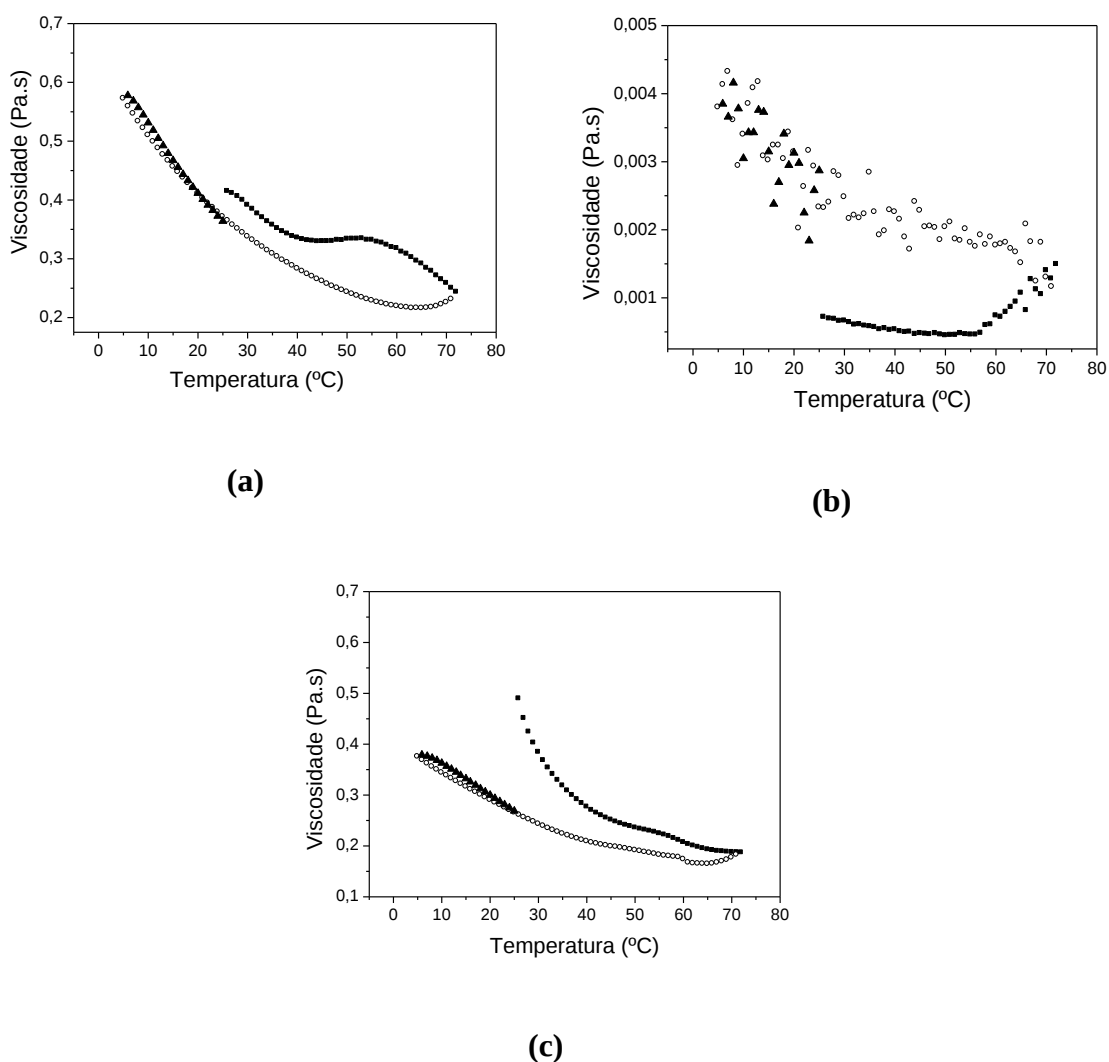
Os biopolímeros puros foram submetidos a rampas de aquecimento-resfriamento no estado estacionário e oscilatório afim de caracterizar seu comportamento e identificar sua influência no comportamento das emulsões de acordo com as características de cada sistema.

Nos ensaios de cisalhamento constante o WPC apresentou-se da seguinte forma: na primeira rampa de aquecimento a partir de aproximadamente 55 °C ocorreu a gelificação das proteínas de soro, proporcionando um aumento de viscosidade, potencializada na rampa de resfriamento e sendo também mantida na terceira rampa, caracterizando o comportamento de gel irreversível esperado para essa proteína (Figura 5.34b). O alginato que se encontrava em condição de gel a 25 °C apresentou um pico de viscosidade em 50 °C na primeira rampa, seguido por um decréscimo de viscosidade na rampa de resfriamento; possivelmente ocasionado pela taxa de deformação aplicada, principalmente em maiores temperaturas, seguido por um aumento progressivo em menores temperaturas, sendo que na terceira rampa apresentou valores intermediários, caracterizando um gel irreversível (Figura 5.35a).

Diante disso, o creme da emulsão na proporção 1:1 apresentou comportamento intermediário aos dois biopolímeros, com maior predominância do alginato de sódio devido à redução progressiva da viscosidade com o aumento de temperatura e vice-versa,

apresentando na terceira rampa valores intermediários de viscosidade em relação às duas rampas anteriores (Figura 5.34c). Entretanto na primeira rampa, a influência do WPC foi maior, pois não apresentou um aumento de viscosidade nas temperaturas de 45-60 °C, indicando que o WPC influenciou as características de viscosidade do alginato. Sendo que o mesmo quando avaliado puro, apresentou aumento de viscosidade entre 48-58 °C. Isso comprova o efeito dos dois biopolímeros utilizados no comportamento da emulsão.

Figura 5.34: Rampas de aquecimento-resfriamento constante: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); Rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲) do alginato de sódio (a), do WPC (b) puros e da emulsão na proporção 1:1 (c) com 25% de óleo de soja.

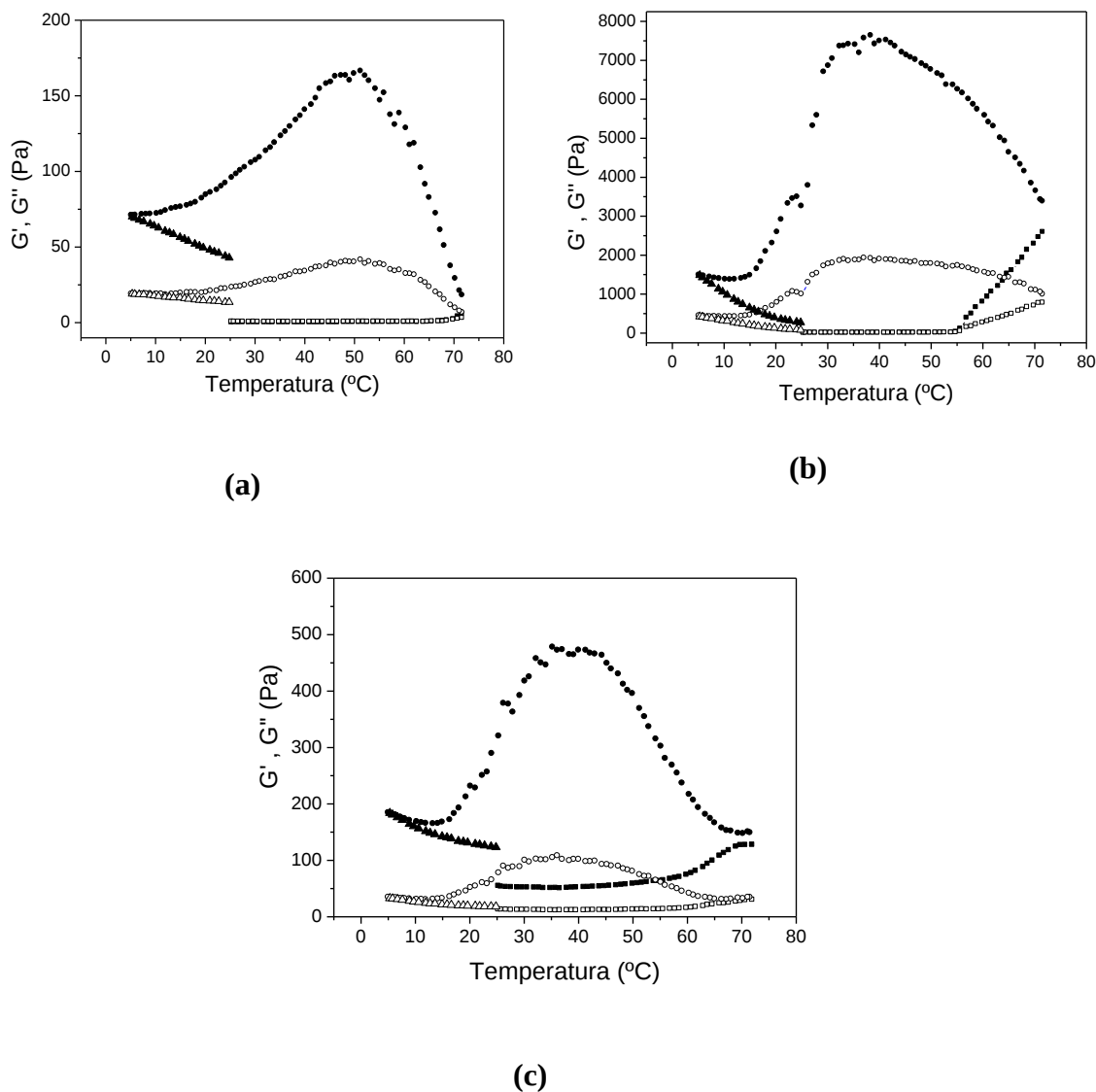


Nos ensaios de cisalhamento oscilatório, os biopolímeros tiveram semelhanças às curvas de cisalhamento constante. O WPC e o alginato de sódio apresentaram curvas semelhantes, na primeira rampa $G' = G''$ e constantes até 55 °C e 72 °C para o WPC e o

alginato, respectivamente, sendo que a igualdade dos módulos é considerada o ponto de gel (ANDRADE; NASSER, 2004). A amostra de alginato de sódio (Figura 5.35a) antes de iniciar o aquecimento já havia gelificado, pois diferentemente de outros polissacarídeos, a gelificação ocorre à temperatura ambiente, o que é muito atraente para aplicações alimentares (NUSSINOVITCH 1997; ONSØYEN 1999). Na rampa de resfriamento G' se intensificou com pico de 160 Pa em 50 °C, seguido pelo decréscimo de G' até 5 °C, indicando que a temperatura de 50 °C potencializou o gel. Finalmente, na terceira rampa G' apresentou valores intermediários às rampas anteriores, indicando característica de gel irreversível. Géis de alginato não são termoreversíveis, não necessitam de refrigeração e quando o pH da solução de alginato é reduzido, permite sua aplicação na preparação de géis de sobremesas macios, tixotrópicos e que não fundem mesmo em altas temperaturas (BEMILLER; HUBER, 2010). Este comportamento térmico característico do gel de alginato o destaca devido às suas propriedades funcionais (KUHN; PICONE; CUNHA, 2012).

O WPC (Figura 5.35b), na primeira rampa acima de 55 °C, apresentou aumento progressivo de G' até 72 °C, indicando a gelificação das proteínas de soro. Em seguida, na rampa de resfriamento, valores de G' aumentaram significativamente com um pico de 7500 Pa em 40° C. Abaixo desta temperatura houve redução progressiva de G' para 1500 Pa, seguido pelo decréscimo na terceira rampa em 270 Pa se aproximando do valor inicial de $G'=80$ Pa, tendendo a um comportamento de gel reversível. Géis proteicos são preparados por meio de aquecimento de uma solução proteica moderadamente concentrada, ocorrendo a formação de pró-gel; quando este é resfriado até temperatura ambiente ou refrigeração a redução da energia cinética favorece as ligações não covalentes, constituindo a gelificação (DAMODARAN, 2010). Entretanto, as propriedades físico-químicas do WPC estão diretamente relacionadas à β -lactoglobulina (β -Lg) e à α -La (-lactoalbumina), por serem as proteínas em maior quantidade no WPC, a α -La desnatura em 62 °C e a β -Lg em 78 °C (BRYANT; McCLEMENTS, 1998). Alguns autores afirmam que proteínas de soro formam géis irreversíveis somente quando aquecidas acima de 75 °C (AGUILERA; RADEMACHER, 2004), enquanto outros relatam que menor efetividade de reação ocorre em temperaturas inferiores a 95 °C, pois a β -Lg e a α -La apresentam mudança conformacional reversível dependendo da temperatura, do tempo de exposição ao calor, concentração do soro, pH e força iônica a que são submetidas (RELKIN, LAUNAY; LIU, 1998; GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002; PURWANTI et al., 2011).

Figura 5.35: Rampas de aquecimento-resfriamento oscilatório: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲) do alginato de sódio (a), do WPC (b) puros e da emulsão na proporção 4:1 (a) com 25% de óleo de soja. Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos).



O pH 3,5 e a concentração de proteína favoreceram a formação do gel proteico, resultando em valores de G' da terceira rampa levemente maiores que a primeira, pois quando o pH é alterado próximo do pI ocorre a agregação e gelatinização, além da formação de uma estrutura tridimensional em concentração proteica crítica (KUHN; PICONE; CUNHA, 2012). Resultados semelhantes de G' para géis de proteínas de soro foram reportados por Andrade e Nasser (2004).

O creme da emulsão 4:1 apresentou módulo G' superior a G'' em todas as rampas e faixa de temperatura, indicando um material estruturado (Figura 5.35c). Na rampa de

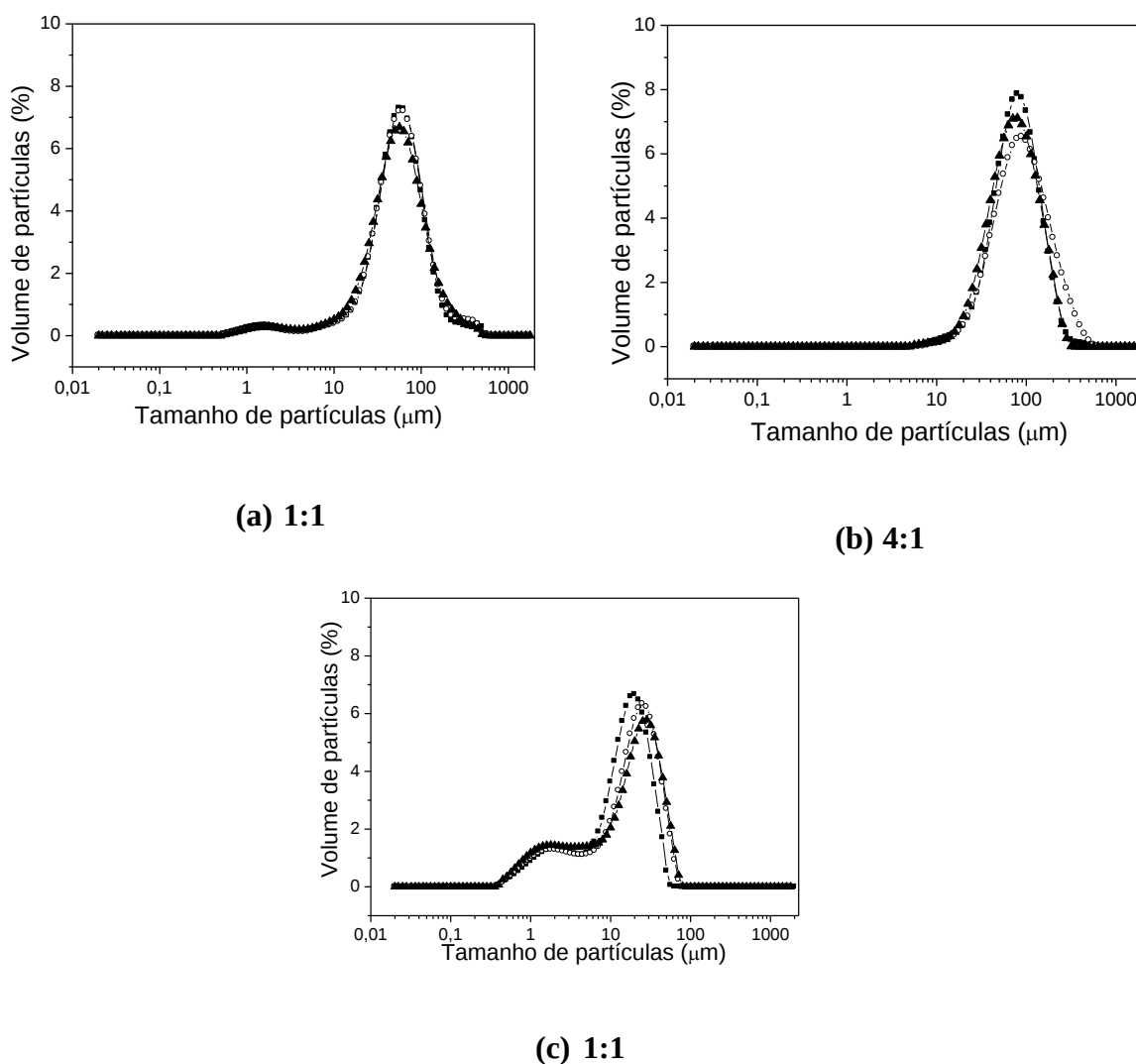
aquecimento G' foi potencializado em relação aos biopolímeros puros, possivelmente devido à complexação e ao teor de óleo das emulsões, além da elevação acima de 55 °C ocasionada pela gelificação proteica. Em seguida, a rampa de resfriamento apresentou uma curva simétrica, com predominância expressiva dos dois biopolímeros apresentando valores intermediários com pico de 470 Pa em 40 °C, seguido por uma leve redução de G' na terceira rampa, porém superior ao valor inicial. Esses resultados indicam a formação de um creme irreversível, estruturado e resistente, mostrando a influência do comportamento e da proporção de WPC e alginato utilizados. Li e Zhong (2016) avaliaram as propriedades de gelificação de proteínas de soro com pectina em diferentes pH's e concluíram que essas propriedades dependem da proporção e composição do biopolímero.

Além disso, o ultrassom favoreceu a obtenção de valores intermediários de G' e de viscosidade nas emulsões por ocasionar a redução dos tamanhos das gotas e agregados formados, gerando a obtenção de melhores estruturas. Estudos relatam que a aplicação de ultrassom em produtos lácteos com alto teor de proteína de soro após aquecimento, quebrou os agregados e evitou a reformação do gel, reduzindo o aumento de viscosidade (ASHOKKUMAR et al. 2009a, ASHOKKUMAR et al. 2009b; ASHOKKUMAR et al. 2009c; CHANDRAPALA et al., 2012), assim como a reologia e microestrutura de géis de proteína isolada de soro e gelatina foram manipuladas através de alta pressão (DEVI et al., 2014).

5.4.2.6 Distribuição de tamanho de gotas

Os cremes das emulsões submetidas ao tratamento ultrassônico apresentaram comportamento monomodal em ambas proporções. A proporção WPC:ALG 1:1 apresentou um pico em 56 μm , sendo que 20 e 25 % de óleo apresentaram o mesmo volume de gotas e 15 % de óleo apresentou menor volume. Porém, houve uma discreta proeminência em 1,4 μm indicando a presença de pequenas gotículas (Figura 5.36a). Em todos os teores de óleo os cremes tiveram comportamento muito semelhante constatado nos valores de diâmetro médio ($D_{3,2}$) de 22, 25 e 20 μm para 15, 20 e 25 % de óleo, respectivamente.

Figura 5.36: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W sonicadas nas proporções WPC:ALG (a) 1: 1 e (b) 4: 1 e emulsões submetidas à alta pressão 1:1 (c) com 15% (▲), 20% (○) e 25% (■) óleo de soja.



Nos cremes 4:1 houve predominância de gotículas com 80 μm com maior volume de gotas em 25 % de óleo, porém 20 % de óleo apresentou maior amplitude na faixa de distribuição do tamanho de gotas ocasionando um menor volume em relação à 15 % de óleo que apresentou uma faixa mais estreita proporcionando maior volume de gotas no mesmo tamanho. Isso foi comprovado nos valores de diâmetro médio ($D_{3,2}$) sendo 59, 72 e 64 μm para 15, 20 e 25 % de óleo, respectivamente.

É perceptível que emulsões com maiores concentrações de alginato de sódio tratadas com ultrassom tiveram tendência à estabilização, além de menores gotículas, conforme constatado nas análises de microestrutura (Figuras 5.28 a 5.30), em que menores concentrações levaram à floculação. Diversos autores têm relatado o efeito da concentração de biopolímeros (FIORAMONTI et al. 2016; SIMO et al., 2012) e do ultrassom (KALTSA

et al.,2013) na estabilização de emulsões, assim como a composição do polissacarídeo influencia a obtenção de géis fortes (FENG et al., 2017b).

Embora as emulsões não tenham sido estáveis, os valores $D_{3,2}$ não foram elevados, indicando que o ultrassom foi eficiente na redução do tamanho das gotículas, principalmente em WPC:ALG 1:1, tendendo à estabilização. Um estudo relatou que tratamento com ultrassom em alginato aumentou sua interação hidrofóbica e atividade interfacial, permitindo melhoria das propriedades físicas do alginato como aditivos alimentares, enzimas e fármacos (FENG et al. 2017a).

Em contrapartida, emulsões tratadas com homogeneizador a alta pressão apresentaram redução significativa no tamanho das gotículas. Os valores $D_{3,2}$ foram em média 5 μm para todos os teores de óleo, apresentaram leve distribuição bimodal com maior volume de gotas na faixa de 20 a 30 μm e 1,5 μm para todos os teores de óleo, proporcionando a estabilização das emulsões na proporção 1:1 (Figura 5.36c).

CONCLUSÕES PARCIAIS WPC-ALGINATO

O aumento da proporção de WPC ocasionou maiores valores de absorbância indicando maior complexação com o alginato que foi comprovado pela avaliação visual com forte separação de fases, complexos este que foram reduzidos com a aplicação de ultrassom, fato comprovado pelas imagens de microestrutura, que mostrou um sistema heterogêneo e não compacto. Menores proporções dos complexos (1:1 e 2:1) e das emulsões (1:1) não permitiram ensaios oscilatórios por apresentarem comportamento tendendo ao newtoniano. Nas demais proporções os complexos apresentaram bom ajuste da Lei da Potência com comportamento pseudoplástico com leve tixotropia e um material estruturado ($G' > G''$) em maiores concentrações de proteína. Os módulos de G' foram mais acentuados para as amostras sonicadas devido à heterogeneidade do sistema, onde o ultrassom gerou maior homogeneidade e compactação dos complexos gerando maiores valores de G' . Emulsões sonicadas apresentaram separação de fases em todas proporções e teores de óleo avaliados. Sistemas 1:1 tiveram tendência à estabilidade, apresentando fase aquosa turva que foi comprovado pela análise de composição química havendo efeito significativo dos lipídeos, indicando que o óleo não foi alojado somente na fase superior, ao contrário dos sistemas 4:1 que tiveram separação de fases bem definida com fase inferior translúcida, onde nenhum dos componentes das emulsões apresentaram efeito significativo, indicando que os

biopolímeros e o óleo foram alojados principalmente na fase creme. As imagens de microestrutura mostraram que as emulsões sonicadas foram instáveis devido à flocculação e coalescência das gotas com distribuição bimodal do tamanho de gotas com maior volume em 56 e 80 μm para 1:1 e 4:1, respectivamente. Amostras 1:1 quando tratadas com alta pressão tornaram-se estáveis com distribuição bimodal e presença de pequenas gotículas, comprovando o efeito positivo da alta pressão na estabilização de emulsões. O comportamento reológico de todas as emulsões mostrou-se pseudoplástico com bom ajuste de Sisko (ultrassom) e da Lei da Potência (alta pressão), porém menores valores de viscosidade aparente foram obtidos para as amostras preparadas com alta pressão. Rampas de aquecimento mostraram a influência do biopolímero predominante nos sistemas, possibilitando distintas aplicações, desde produtos resfriados até produtos consumidos quentes, devido suas características reológicas observadas. Os cremes sonicados da proporção 4:1 mostraram ser um material estruturado por formarem uma rede rígida devido à forte interação atrativa entre o WPC e o alginato, possibilitando sua aplicação na indústria de alimentos na melhoria de formulações, na microencapsulação de compostos ativos ou ainda no desenvolvimento de novos produtos.

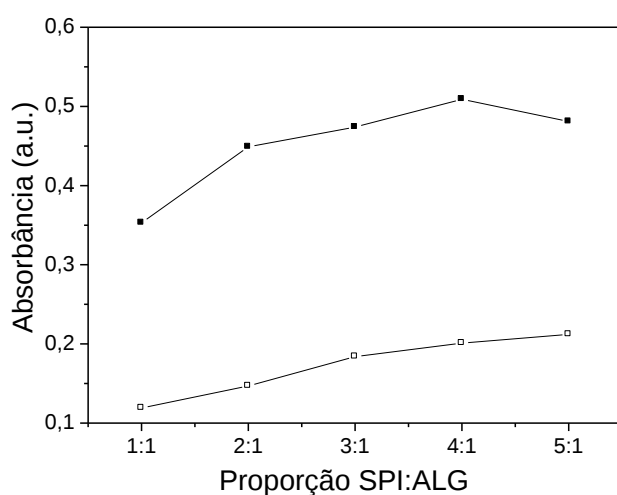
5.5 SISTEMAS SPI-ALGINATO

5.5.1 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS SPI-ALGINATO

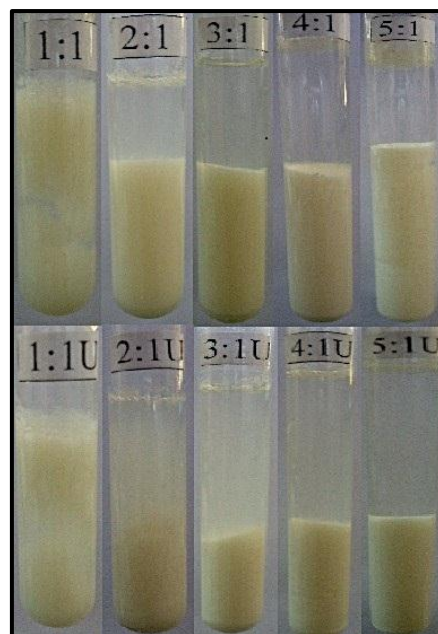
5.5.1.1 Turbidimetria, avaliação visual e microscopia ótica

A turbidimetria indicou que os complexos nas proporções avaliadas apresentaram comportamento semelhante, porém amostras sonicadas tiveram redução significativa dos valores de absorbância em relação às amostras não sonicadas, indicando que a aplicação de ultrassom reduziu o tamanho dos complexos formados, gerando uma solução menos turva e mais homogênea (Figura 5.37a) (APÊNDICE D). Além disso, o aumento da proporção de proteína ocasionou maiores valores de absorbância, indicando que o aumento de SPI propiciou maior formação de complexos no pH 3,5. Hosseini et al. (2013) constataram que na interação entre alginato de sódio e β -Lactoglobulina tratados por ultrassom a proporção entre os biopolímeros teve um efeito importante na turbidez e no grau de sedimentação na formação das soluções. Schmitt et al. (1999) observaram em um estudo de coacervação complexa, que a adição de solução de goma acácia à solução de β -lactoglobulina favoreceu a separação de fases e a amplitude das fases dependeu fortemente do valor do pH.

Figura 5.37: Efeito da proporção SPI:ALG com aplicação de ultrassom (U) (□) e sem aplicação de ultrassom (■) no pH 3,5. Leitura de absorbância em 590 nm (a) (APÊNDICE D) e imagens dos sistemas após 48h de repouso.



(a)



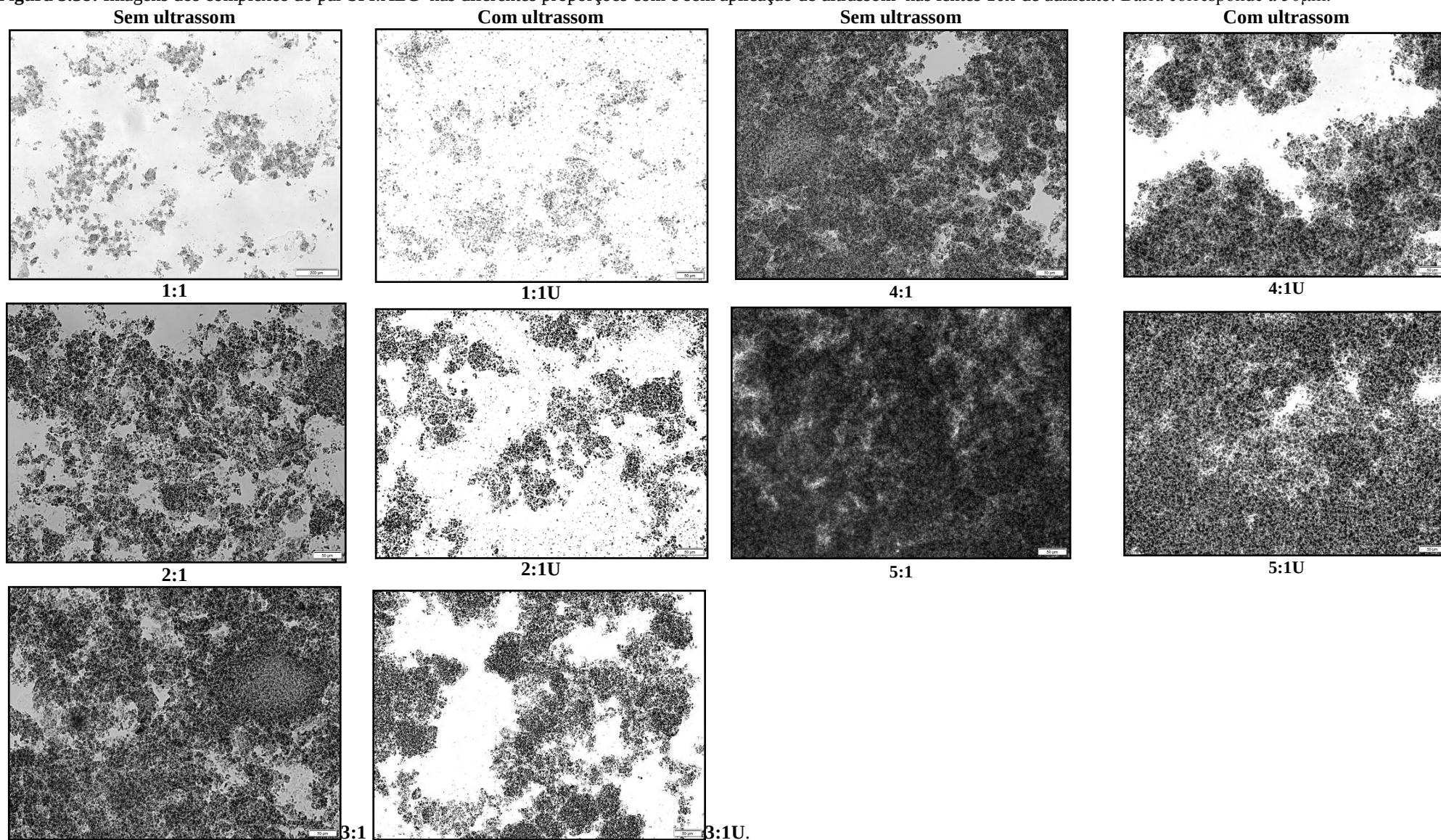
(b)

A avaliação visual permitiu observar uma fase superior translúcida e uma fase inferior coacervada, principalmente para proporções maiores que SPI:ALG 3:1, indicando a forte interação entre os biopolímeros com o aumento da proporção de SPI no pH 3,5 (Figura 5.37b). Um ligeiro aumento na intensidade das cargas é capaz de promover a separação associativa das macromoléculas (THIES, 1995). Quando isso ocorre, aparece a complexação entre os polímeros, onde as duas fases coexistentes apresentam a seguinte composição: uma fase rica em solvente, com uma concentração muito pequena de biopolímeros e uma fase rica em biopolímeros, num fenômeno chamado coacervação (DOUBLIER et al., 2000).

Uma leve turbidez na fase superior dos tubos das proporções SPI:ALG 1:1, 2:1, 1:1U, 2:1U foi constatada. Essa turbidez está relacionada com o excesso de cargas negativas nos sistemas, provenientes das cargas do alginato não neutralizadas pela presença insuficiente de proteína. No entanto, com o aumento de proteína nos sistemas, a partir da relação 3:1 houve uma separação de fases bem definida, indicando um equilíbrio de cargas e a formação de complexos coacervados que sedimentaram. Resultados semelhantes foram encontrados por Nogueira (2013) ao avaliar o efeito do pH 3,5 e 3,75 em diferentes proporções de solução WPC com solução de alginato. Costa (2014) avaliou a influência da concentração de proteína (SPI e gelatina de pele de tilápia) na aparência visual de misturas com solução de pectina e alginato, e constatou a formação de soluções turvas quando o polissacarídeo ou a proteína se encontravam em excesso. Porém, em proporções de biopolímeros com potencial zeta da mistura próximo de zero, houve precipitação de complexos deixando o sobrenadante límpido, indicando o equilíbrio de cargas na mistura.

A microscopia óptica permitiu a observação da intensidade da complexação (Figura 5.38), que foi mais pronunciada em maiores proporções de proteína no sistema, explicando a separação de fases. Além disso, foi possível observar o efeito do ultrassom na redução de tamanho dos complexos, proporções SPI:ALG 1: 1 e 2: 1 apresentaram menor quantidade de complexos e maior quantidade de solução diluída. Gordon e Pilosof (2010) avaliaram o efeito da aplicação do ultrassom no tamanho de proteínas de soro e constataram que o ultrassom e o aumento da concentração de proteína refletiu no tamanho das partículas. Além disso, o tamanho e distribuição das partículas de dispersões de SPI tratados com ultrassom foram menores e diferentes em relação às amostras não tratadas. Estes resultados foram consistentes com a melhoria da solubilidade da proteína após tratamentos ultrassônicos (HU et al., 2013).

Figura 5.38: Imagens dos complexos do par SPI:ALG nas diferentes proporções com e sem aplicação de ultrassom nas lentes 10x de aumento. Barra corresponde a 50µm.



As imagens mostraram que o aumento de SPI ocasionou variação no tamanho com formação de maiores agregados, principalmente em amostras não sonicadas. Sessler; Weiss e Vodovtzyz (2013) avaliaram por microestrutura o efeito do pH e a adição de SPI nas propriedades físico-químicas de pectina e encontraram que os isolados de proteína de soja são heterogeneamente dispersos na rede. Entretanto, amostras SPI:ALG sonicadas foram aparentemente melhor distribuídas na rede sem grandes aglomerados. O tratamento ultrassônico é um método eficiente para a formação de conjugados de proteínas e polissacarídeos e para modificar as propriedades físicas e funcionais de proteínas: tais como solubilidade, gelificação, emulsificação e capacidade de espuma (MU et al., 2010; HU et al., 2013).

5.5.1.2 Comportamento reológico – Cisalhamento estacionário

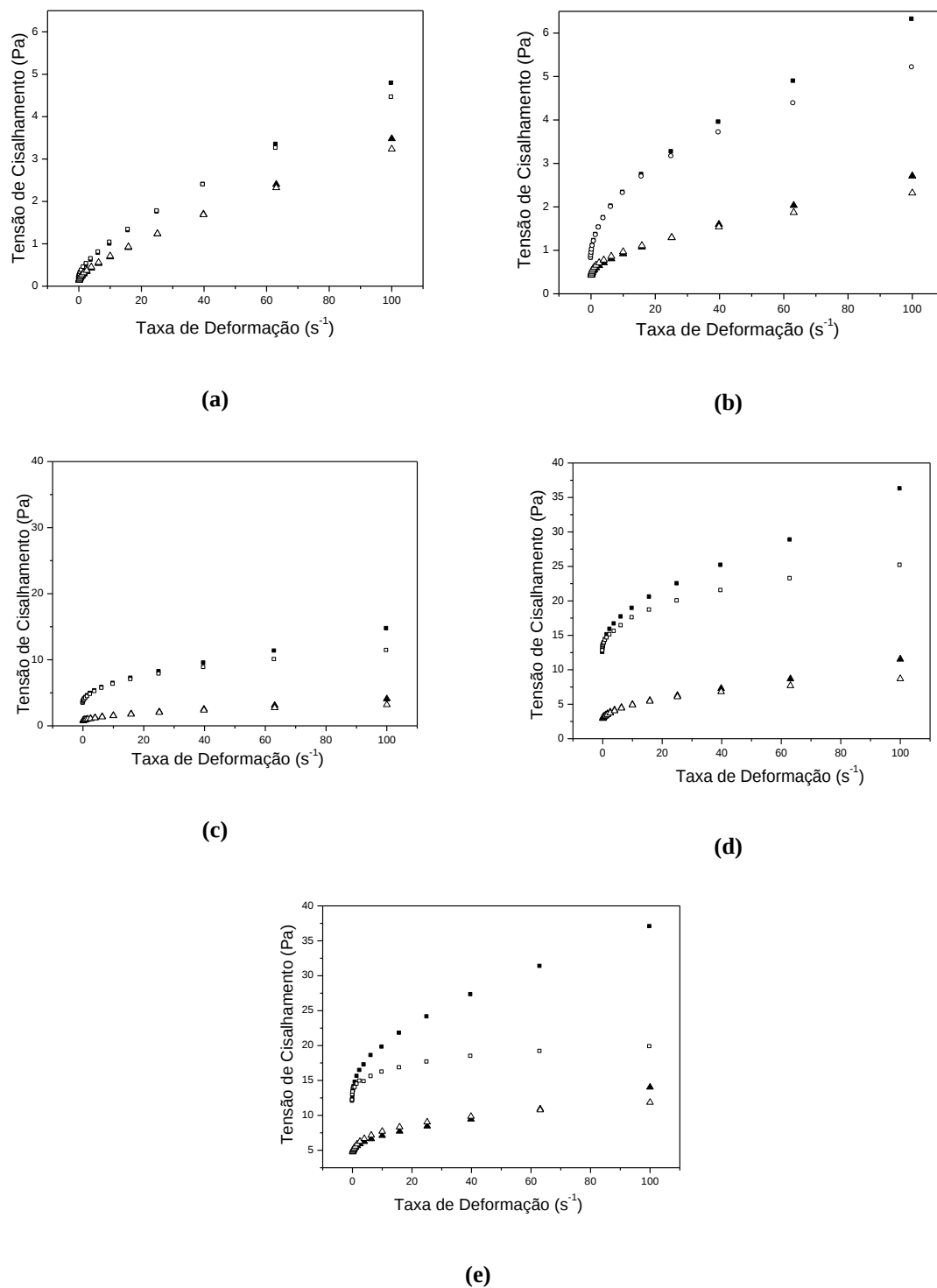
O modelo Lei da potência apresentou um bom ajuste ($R^2 > 0,9$) às curvas de fluxo da fase rica em biopolímero para todas as proporções SPI:ALG (Tabela 5.10, APÊNDICE F) e não houve diferenças significativas entre os valores de K e n calculados usando as rampas de taxa de deformação descendente e ascendente.

Tabela 5.10: Proporções entre os componentes do sistema misto (SPI, ALG e água) e valores de índice de consistência (K) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) dos complexos em diferentes proporções SPI:ALG sem e com aplicação de ultrassom.

SPI:ALG	Proporções de componentes		Sem aplicação de Ultrassom		Com aplicação de Ultrassom	
	SPI:H ₂ O	ALG:H ₂ O	Rampa 1 K (Pa.s)	Rampa 2 K (Pa.s)	Rampa 1 K (Pa.s)	Rampa 2 K (Pa.s)
1:1	1:98,0	1:98	0,219	0,262	0,146	0,178
2:1	1:73,5	1:147	1,092	1,186	0,470	0,567
3:1	1:65,3	1:196	4,057	4,226	0,887	0,953
4:1	1:61,3	1:245	14,327	14,524	3,302	3,477
5:1	1:58,8	1:294	14,550	14,167	5,384	5,768

Os complexos de biopolímeros apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$) e o índice de consistência (K) aumentou com o aumento da proporção de proteína, enquanto n diminuiu. Este efeito foi acentuado em SPI:ALG 3:1, 4:1 e 5:1 que apresentaram aumento da separação de fases, formação de complexos (como observado pela microscopia) e tixotropia. No entanto, nas amostras que apresentaram algum grau de tixotropia o ultrassom ocasionou redução considerável desse comportamento (Figura 5.39).

Figura 5.39: Efeito da aplicação de ultrassom (triângulos) e não aplicação do ultrassom (quadrados) nas proporções 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c), 4:1 (d) e 5:1 (e) nas curvas de escoamento descendente ((■) e (▲)) e ascendente ((Δ) e (□)) do par SPI:ALG.



Provavelmente, a aplicação de ultrassom reduziu o tamanho das partículas e aumentou a uniformidade, diminuindo os efeitos adicionais do cisalhamento na

microestrutura dos complexos, reduzindo a tixotropia. Este efeito é semelhante ao da homogeneização de alta pressão, que reduz o tamanho dos complexos através da ação de forças turbulentas, cavitação e cisalhamento (LE HÉNAFF, 1996). Jena e Das (2006) avaliaram o efeito do tempo de sonicação na distribuição do tamanho de partículas de leite de coco e constataram que o aumento no tempo de sonicação gerou maior redução no tamanho das partículas.

O aumento no índice de consistência pode ser discutido com base na proporção entre os diferentes componentes do sistema (Tabela 5.10). Ao aumentar a proporção de SPI, a relação SPI:H₂O aumentou e a relação ALG:H₂O diminuiu, no entanto esse aumento de água em relação ao alginato não interferiu na interação, pelo contrário, o aumento da proporção de SPI gerou maior equilíbrio de cargas com o alginato de sódio, tornando o sistema mais empacotado devido às fortes interações, uma vez que o solvente (água) foi eliminado do sistema para outra fase que tornou-se mais translúcida, conforme observado na Figura 5.37b. Da mesma forma, a concentração do alginato de sódio utilizada favoreceu o aumento de K devido a sua maior viscosidade. Baeza et al. (2002) relataram o aumento na viscosidade induzida por maiores interações eletrostáticas entre polímeros e Simo et al. (2012) constataram no preparo de emulsões com proteína e pectina, que o aumento da concentração de pectina ocasionou aumento na viscosidade aparente.

5.5.1.3 Comportamento reológico – Cisalhamento oscilatório

As proporções SPI:ALG 1:1 e 2:1 não apresentaram RVL, assim não foram realizados ensaios de cisalhamento oscilatório das mesmas. As imagens de microscopia ótica exibiram menor quantidade de complexos e maior quantidade de solução diluída apresentando comportamento viscoso, justificando porque não foi possível avaliá-los por ensaios reológicos oscilatórios. Para as demais proporções a deformação utilizada foi de 0,4%, dentro da RVL (Figura 5.40).

Os módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') mostraram praticamente o mesmo comportamento para todas as proporções analisadas (SPI:ALG 3:1, 4:1 e 5:1) com G' superior a G'' em uma ampla faixa de frequência, indicando um material estruturado. Esse comportamento foi intensificado com o aumento da proporção de proteína. A aplicação de ultrassom ocasionou redução nos valores de G' e G'' em comparação com amostras preparadas nas mesmas proporções SPI: ALG sem sonicação (Figura 5.41).

Figura 5.40: Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações para frequência de 1 rad/s para o sistema SPI:ALG.

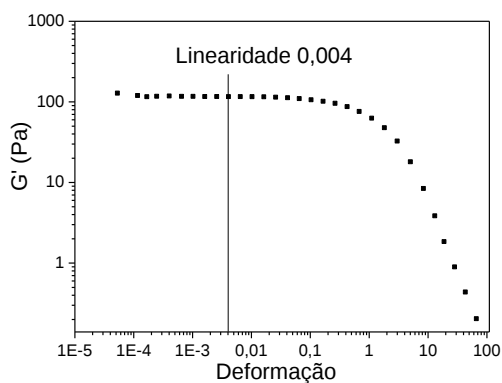
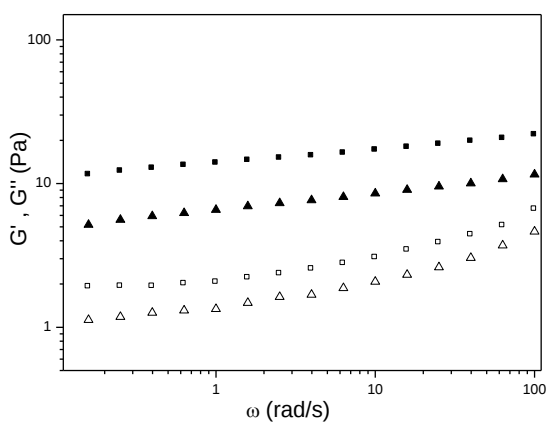
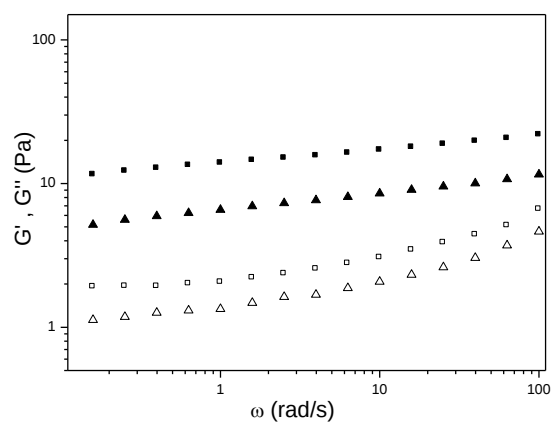


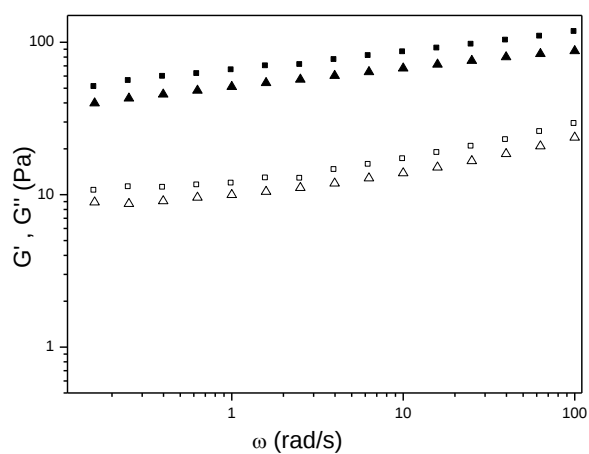
Figura 5.41: Módulos de armazenamento, G' (■; ▲), e módulo de dissipação, G'' (□; Δ) dos complexos nas proporções 3:1 (a), 4:1 (b) e 5:1 (c) com aplicação de ultrassom (triângulos) e sem aplicação do ultrassom (quadrados) do par SPI:ALG.



(a)



(b)



(c)

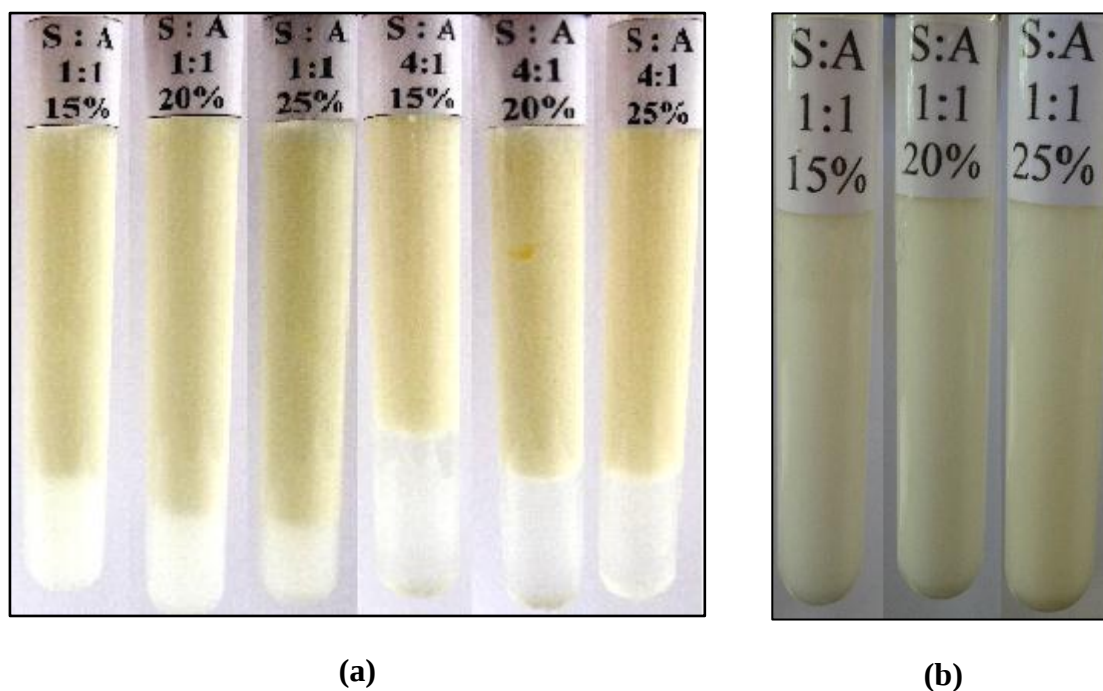
A interação entre SPI e ALG levou à formação de complexos e consequente separação de fases. Os complexos constituíram um sistema particulado e provavelmente devido à interação eletrostática geraram uma rede definida com pouco solvente no meio, onde a aplicação de ultrassom reduziu os módulos de armazenamento e dissipação devido à diminuição dos tamanhos de partículas dos complexos. Pan et al. (2015) encontraram que a adição de maiores proporções de alginato induziu a separação de fases e o valor de G' de uma solução pura de SPI foi amplamente influenciado pela concentração da solução, mas foi menos influenciado pela frequência de oscilação.

5.5.2 EMULSÕES O/W ESTABILIZADAS POR COMPLEXOS SPI-ALGINATO

5.5.2.1 Avaliação visual, índice de cremação (IC) e composição química

Na avaliação visual todas as amostras sonicadas preparadas pelos complexos SPI:ALG apresentaram cremação. Na proporção 4:1 a fase inferior (soro) foi aquosa e translúcida e a fase superior (creme) cremosa e opaca, porém em 1:1 a fase soro foi menor e apresentou turbidez, indicando tendência à estabilização (Figura 5.42a).

Figura 5.42: Aspecto visual das emulsões nas proporções 1:1 e 4:1 (SPI:ALG) em diferentes teores de óleo (15, 20 e 25 %). Imagens após 48 horas de repouso. (a) ultrassom. (b) homogeneizador a alta pressão.



As imagens apresentaram mudanças físicas à medida que a quantidade de óleo aumentou em relação à solução total, pois o IC diminuiu sendo na proporção 1:1 de 27,5; 25,1 e 21,3 % para 15, 20 e 25 % de óleo, respectivamente, e na proporção 4:1 atingiu valores de 38,6; 33,2 e 28,3 para 15, 20 e 25 % de óleo, respectivamente; isso indica o efeito do óleo com os diferentes componentes presentes na formulação das emulsões (APÊNDICE H).

Considerando que o óleo presente no sistema tende a se alojar na fase creme, pode-se atribuir o aumento do volume ocupado pela fase creme ao aumento da massa (ou volume) de óleo presente na emulsão. Além disso, com esse aumento as relações SPI:Óleo e H₂O:óleo diminuíram (Tabela 5.11), propiciando maior disponibilidade de gotas para a adsorção de proteína na interface e consequente redução da fase aquosa. A concentração de gotículas em uma emulsão influencia sua textura, estabilidade, aparência, atributos sensoriais e qualidade nutricional (McCLEMENTS, 2005a). Ademais, Na proporção SPI:ALG 4:1 a proporção SPI:Óleo foi 1,6 vezes maior que a proporção 1:1, propiciando maior disponibilidade de proteína para recobrimento das gotas na interface óleo/água. No entanto, isso não foi suficiente para suprir a ausência de alginato nesses sistemas, o que seria necessário para aumentar a viscosidade da fase aquosa contínua (H₂O:ALG) e estabilizar as emulsões. Esse efeito do alginato é comprovado ao avaliar a estabilidade do sistema na proporção SPI:ALG 1:1 que apresentou a proporção H₂O:ALG 2,5 vezes menor em relação a proporção 4:1, em que menores índices de cremeação foram obtidos, indicando o efeito positivo de maiores concentrações de alginato de sódio para obtenção de sistemas estáveis. Demais autores têm relatado o efeito de maiores concentrações de polissacarídeo na estabilização de emulsões por aumentar a viscosidade da fase contínua, evitando a flocculação das gotas. Também destacam o cuidado para não exceder a concentração crítica de polissacarídeo acima do qual as interações de depleção farão com que as gotículas se agreguem (PERRECHIL; CUNHA, 2013; SIMO et al. 2012, McCLEMENTS, 2005b).

Tabela 5.11: Proporções entre os diferentes componentes das emulsões e a composição química das fases creme e soro das emulsões nas proporções SPI:ALG 1:1 e 4:1.

Proporção entre componentes							
SPI:ALG (1:1)				SPI:ALG (4:1)			
Óleo (%)	SPI:Óleo	H ₂ O:Óleo	ALG:H ₂ O	Óleo (%)	SPI:Óleo	H ₂ O:Óleo	ALG:H ₂ O
15	1:17,6	5,55:1	1:98	15	1:11,1	5,55:1	1:245
20	1:25,0	3,90:1	1:98	20	1:15,6	3,90:1	1:245
25	1:33,3	2,93:1	1:98	25	1:20,8	2,93:1	1:245

Composição química 1:1						
Componentes químicos	Fase creme – Óleo (%)			Fase soro – Óleo (%)		
	15	20	25	15	20	25
Proteína	1,0145 ^{n.s.}	1,0254 ^{n.s.}	1,0567 ^{n.s.}	0,2894 ^{a,b}	0,3570 ^a	0,2174 ^b
Lipídeos	16,7690 ^c	21,3504 ^b	26,9004 ^a	0,7431 ^{n.s.}	1,3381 ^{n.s.}	1,7752 ^{n.s.}
Água	78,8803 ^a	73,3685 ^b	70,3442 ^b	97,1362 ^{n.s.}	97,0752 ^{n.s.}	97,2218 ^{n.s.}
Carboidratos	3,3362 [*]	1,2297 [*]	1,6987 [*]	1,8306 [*]	1,2297 [*]	0,78564 [*]

Composição química 4:1						
Componentes químicos	Fase creme – Óleo (%)			Fase soro – Óleo (%)		
	15	20	25	15	20	25
Proteína	1,5557 ^{n.s.}	1,3726 ^{n.s.}	1,3246 ^{n.s.}	0,3070 ^{n.s.}	0,4108 ^{n.s.}	0,3758 ^{n.s.}
Lipídeos	20,1047 ^c	25,5912 ^b	29,5289 ^a	0,0836 ^{n.s.}	0,0099 ^{n.s.}	0,0474 ^{n.s.}
Água	79,4059 ^a	70,8730 ^b	65,9120 ^b	98,2165 ^{n.s.}	97,8900 ^{n.s.}	98,1822 ^{n.s.}
Carboidratos	-	2,1634 [*]	3,2345 [*]	1,5600 [*]	1,6891 [*]	1,3945 [*]

(*) Conteúdo de carboidrato obtido por diferença. (n.s. e *) na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$) de acordo com o teste de médias de Tukey.

O efeito dos componentes foi comprovado ao determinar a composição química das fases creme e soro de todas as emulsões (Tabela 5.11). Para a fase creme das proporções 1:1 e 4:1 as variáveis com efeito significativo ($p \leq 0,05$) foram lipídeos e água, o que confirma o aumento de volume da fase creme em relação ao aumento de óleo e a redução de água nessa fase. Na fase soro da proporção 1:1, a proteína teve efeito significativo ($p \leq 0,05$), o que justifica a turbidez, indicando que as proteínas responsáveis por adsorver nas gotas não foram alojadas somente em uma fase. Em contrapartida, na proporção 4:1 nenhum dos componentes apresentou efeito significativo ($p \geq 0,05$) na fase soro, o que justifica uma fase límpida e translúcida.

Ao comparar as duas fases das emulsões, na fase creme há maior quantidade de proteína, carboidratos e lipídeos e menor quantidade de água, comprovando que o SPI revestiu as gotículas de óleo adsorvendo na interface óleo-água e o alginato também recobriu as gotículas de óleo revestidas, gelificando parcialmente a fase aquosa contínua, principalmente em 1:1 o que justifica a tendência à estabilização nessa proporção. Porém em

4:1, a fase soro apresentou maior quantidade de água, justificando que o alginato foi insuficiente para gelificar a fase aquosa contínua e aprisionar as gotículas de óleo revestidas, fator que favoreceu a desestabilização por meio da floculação (HILL, 1996; McCLEMENTS, 2007).

Além disso, pode se afirmar que o ultrassom ocasionou a redução de tamanho das gotículas estabilizadas pela interação entre os biopolímeros, aumentando a área interfacial das gotas e tendendo a uma menor cremeação, porém não foi suficiente para tornar o sistema estável. Hosseini et al. (2013) estudaram as interações entre β -lactoglobulina e alginato de sódio, sendo este último submetido ou não à aplicação de ultrassom e as propriedades das partículas formadas por interação eletrostática foram afetadas pela sonicação e pela concentração de alginato.

A influência da concentração de polissacarídeo utilizado e do método de homogeneização foi comprovada quando as emulsões da proporção 1:1 foram preparadas com homogeneizador a alta pressão. Todas as emulsões foram estáveis em todos os teores de óleo (Figura 5.42b). A alta pressão possibilitou uma melhor homogeneização das emulsões e a obtenção de gotículas ainda menores, gerando uma maior área interfacial e favorecendo a estabilidade. O uso de homogeneização a alta pressão é capaz de produzir emulsões nanométricas utilizando sistemas proteína:polissacarídeo (YIN et al. 2012).

5.5.2.2 Microscopias ótica e confocal de varredura a laser

As imagens de microscopia ótica das emulsões tratadas com ultrassom (Figura 5.43) na proporção SPI:ALG 1:1 indicaram aumento do tamanho das gotas com o aumento do teor de óleo em todos os sistemas, com presença de pequenas e grandes gotículas dispersas no meio. A presença de pequenas gotículas foi favorecida pela aplicação do ultrassom. Em contrapartida, à medida que aumenta o teor de óleo na emulsão, aumenta a população de gotas de óleo existentes, tornando maior a probabilidade de colisão e a coalescência entre elas (KUNERT, 2007).

Na proporção 4:1 a influência do teor de óleo também foi identificada, porém menores concentrações de alginato apresentaram um sistema mais heterogêneo com gotas grandes e com formação de gel, provavelmente devido à forte interação atrativa dos biopolímeros no pH 3,5 (Figura 5.43). A formação de gel em emulsões também foi reportada por Perrechil e Cunha (2010) ao analisarem a microscopia ótica nos pHs 3,7 e 5,0 e atribuíram que as redes de gotículas foram danificadas após as amostras serem cobertas com

lâmina de vidro. Fioramonti et al. (2015) constataram o efeito do pH e da concentração de alginato na obtenção de emulsões: em pH 4 emulsões preparadas com menor concentração de alginato apresentaram separação de fases e uma microestrutura de gel de flocos interligados formando uma rede, o que teria sido promovido pela maior neutralização de carga entre biopolímeros.

O aumento no tamanho das gotas pode ocorrer pela junção de gotas próximas entre si (coalescência parcial) ou pelo crescimento das gotas maiores à custa da difusão de gotas menores que, na sequência, se fundem às maiores (Ostwald ripening) (McCLEMENTS, 2005a). Esse processo foi proeminente em amostras 4:1, propiciando gotas ainda maiores, o que pode ter sido intensificado pela maior separação de fases e maior empacotamento das gotas devido à menor proporção de alginato utilizada. Fioramonti et al. (2015) constataram, por microscopia ótica, que o grau de floculação de sistemas com alginato diminuiu com o aumento da concentração deste.

Emulsões SPI:ALG 1:1 quando submetidas à alta pressão também tiveram influência do teor de óleo no tamanho das gotículas, entretanto apresentaram redução significativa em seu tamanho em relação às amostras sonicadas para todos os teores de óleo (Figura 5.44), tornando-as estáveis sem qualquer separação de fases. Sistemas mais estáveis e com menores gotículas foram obtidos para emulsões homogeneizadas a alta pressão, com maior concentração de polissacarídeo e com valores de pH próximos ao ponto isoelétrico (PERRECHIL E CUNHA, 2010).

As imagens de microscopia laser confocal das amostras sonicadas comprovaram que as gotículas de óleo foram revestidas pela proteína (em verde) e recobertas e aprisionadas pelo alginato de sódio (em vermelho) em uma rede, indicando a interação entre o SPI e o alginato, além da gelificação parcial da fase contínua pelo polissacarídeo (Figura 5.45). Observa-se um sistema instável com a presença de gotas maiores dispersas na rede e com floculação, o que favoreceu a formação do creme, sendo mais evidente em menores proporções de alginato. Fioramonti et al. (2015) constataram que a desestabilização de emulsões obtidas com alginato de sódio ocorreu por floculação, com a subsequente separação de fases. Simo et al. (2012) ao avaliarem a microestrutura de emulsões O/W preparadas com diferentes concentrações de pectina, β -lactoglobulina e óleo de milho, constataram um agrupamento de gotículas após o armazenamento.

Figura 5.43: Imagens das emulsões do par SPI:ALG nas diferentes proporções e teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm.

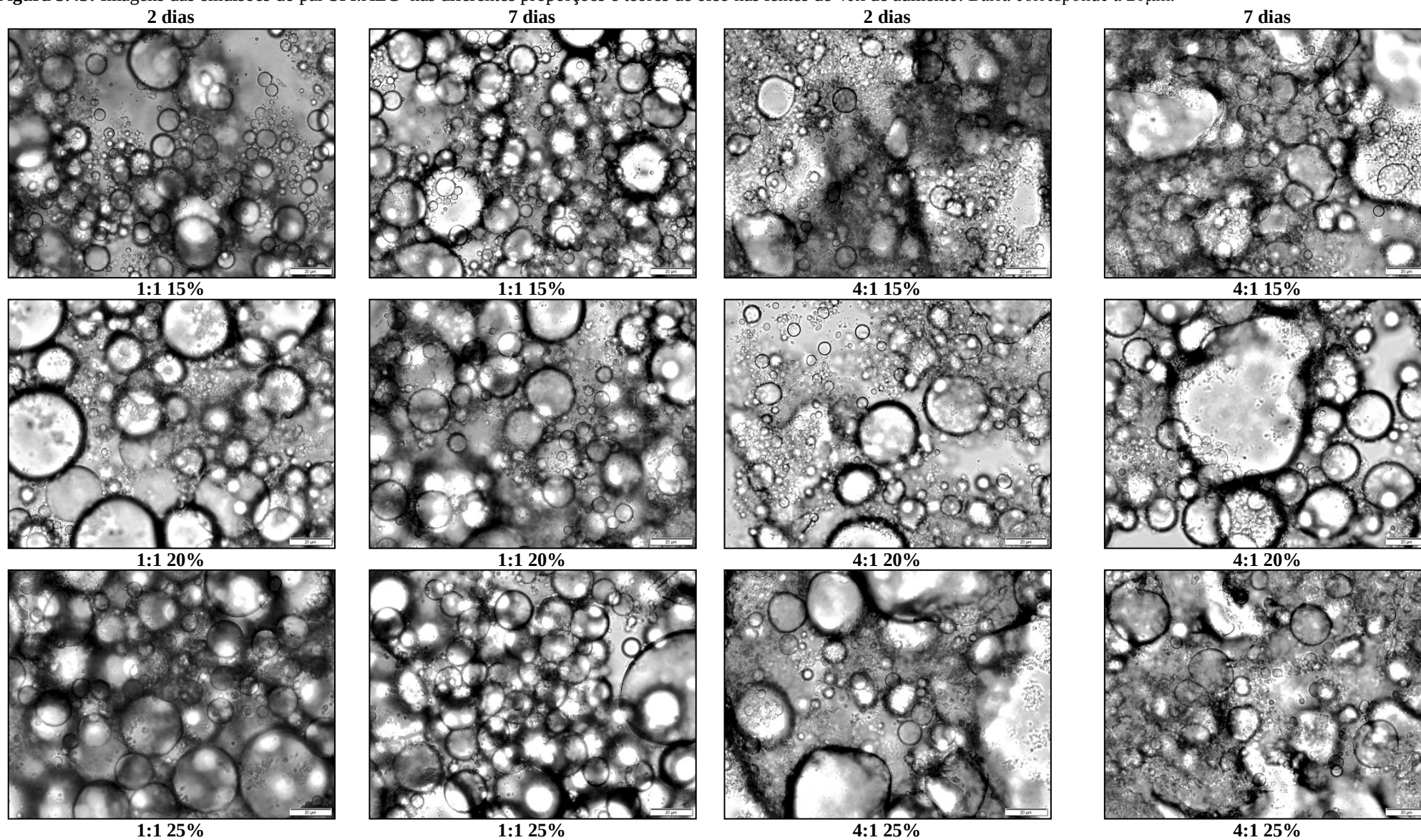
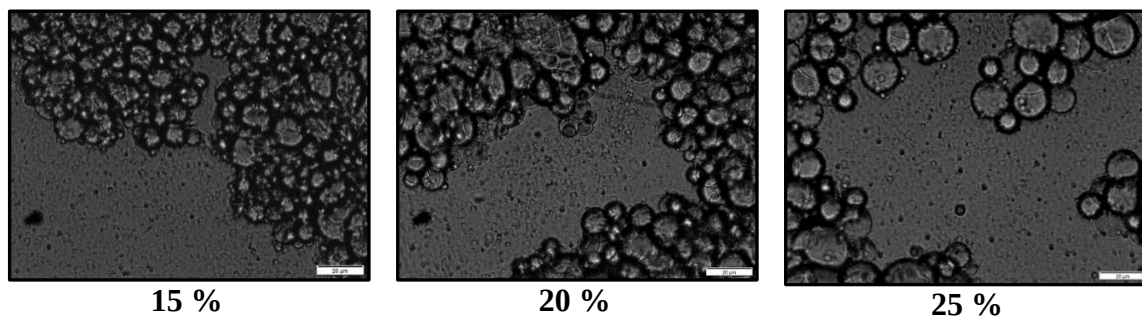
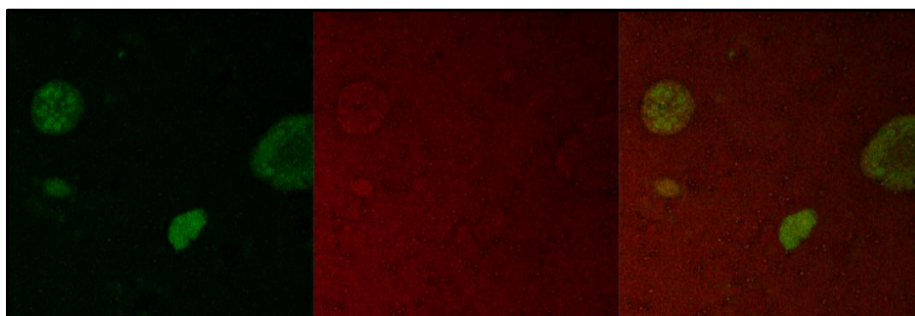


Figura 5.44: Imagens das emulsões tratadas com alta pressão do par SPI:ALG na proporção 1:1 com diferentes teores de óleo nas lentes de 40x de aumento. Barra corresponde a 20µm.

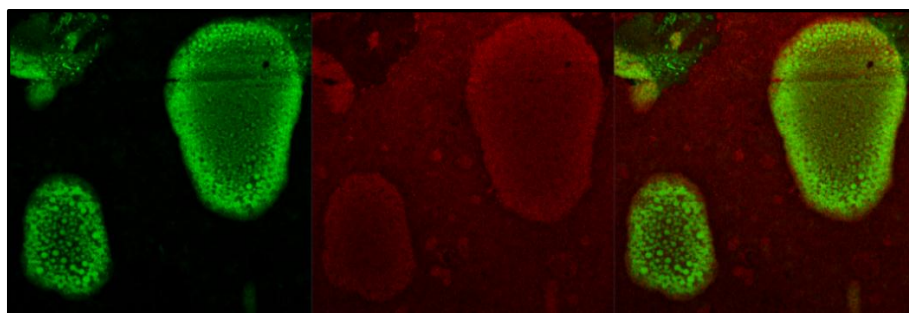


Apesar da avaliação visual mostrar a instabilidade das emulsões por separação de fases, a microscopia mostrou que os cremes foram estáveis no período de 2 e 7 dias e mantiveram suas características ao longo do tempo, provavelmente devido ao equilíbrio de cargas entre os biopolímeros e consequente complexação, o que favoreceu a formação da bicamada nas gotas de óleo e eliminação do sistema aquoso. O que torna esses cremes interessantes para aplicações distintas na indústria de alimentos.

Figura 5.45: Micrografias confocais a laser de emulsões com 15% de óleo de soja nas proporções SPI:ALG 1: 1 (a) e 4: 1 (b). Imagens verdes: ALG corado usando Rhodamine B; Imagens vermelhas: SPI corado usando FITC. As imagens foram obtidas a partir de dois canais separados e depois foram superpostas. Barra corresponde a 20 µm.



(a)



(b)

5.5.2.3 Comportamento reológico – Cisalhamento estacionário

Os cremes das emulsões sonicadas apresentaram um bom ajuste do modelo da Lei da Potência na viscosidade aparente, com alto coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0,99$), comportamento pseudoplástico ($n < 1$) e não houve variação significativa dos valores K e n da rampa descendente (rampa 1) para a rampa ascendente (rampa 2). O índice de consistência (K) aumentou com o aumento do teor de óleo nas emulsões e os valores de K foram mais acentuados na proporção SPI:ALG 4:1 (Tabela 5.12, APÊNDICE G). Este comportamento conferiu maiores valores de viscosidade aparente para os cremes 4:1 em comparação à proporção 1:1 (Figuras 5.46a e 5.46b). Pode-se afirmar que o aumento de proteína ocasionou maior complexação com o alginato e equilíbrio de cargas entre os biopolímeros, eliminando a fase aquosa, fato observado na avaliação visual por apresentar uma fase inferior límpida (Figura 5.42a), além de favorecer a floculação, o que tornou o creme mais viscoso. Segundo McClements (2004), quanto maior for a viscosidade aparente e o grau de pseudoplasticidade, mais fortes são os flocos formados no sistema.

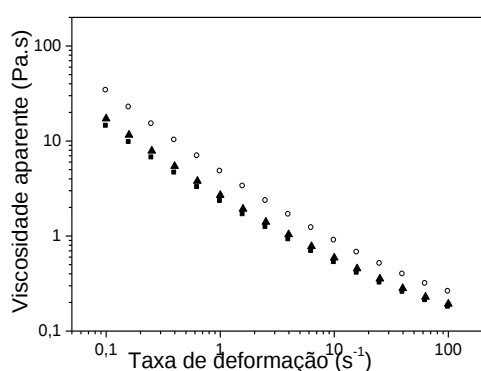
Tabela 5.12: Valores de índice de consistência (K) a 25 °C das rampas descendente (1) e ascendente (2) na proporção SPI:ALG 1:1 e 4:1 das emulsões tratadas com ultrassom.

Modelo Lei da Potência		
SPI:ALG	Rampa 1	Rampa 2
% Óleo	K (Pa.s)	K (Pa.s)
1:1 15%	2,281	2,364
1:1 20%	2,638	2,776
1:1 25%	4,705	5,204
4:1 15%	8,168	8,806
4:1 20%	9,443	9,771
4:1 25%	8,555	8,977

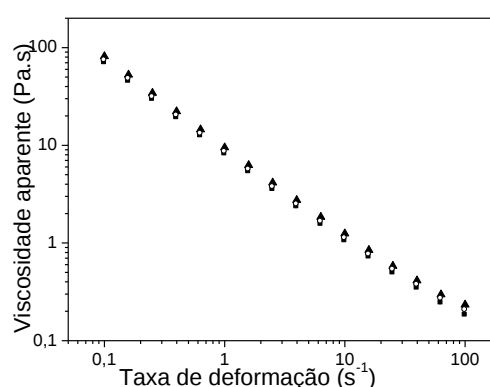
A viscosidade aparente aumentou com o aumento de óleo para todas as amostras, porém o tratamento ultrassônico também favoreceu essa elevação devido à maior área interfacial ocasionada pela redução do tamanho das gotículas. Oliveira (2016) obteve emulsões com SPI:alginato de sódio com e sem aplicação de ultrassom e constatou que amostras tratadas com ultrassom apresentaram menores gotículas e maiores viscosidades. Morais (2006) observou que a diminuição do tamanho das partículas aumentou a viscosidade das emulsões, pois o comportamento reológico de uma suspensão depende do estado de dispersão e da distribuição de tamanho das partículas que a compõem, sua viscosidade está

relacionada à distância de separação entre as partículas que as constituem (ORTEGA, PILEGGI, PANDOLFELLI, 1999). Pal; Yan e Masliyah (1992) mostraram que o aumento da viscosidade de um sistema devido à adição de partículas é função da fração de volume das partículas dispersas: como a fração de volume das partículas aumenta, a viscosidade do sistema também aumenta.

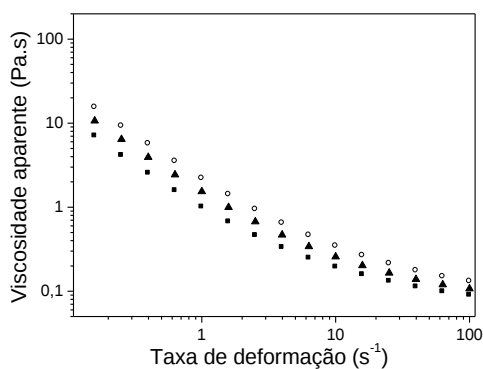
Figura 5.46: Viscosidade das emulsões (rampa ascendente) com 15 % (■), 20 % (▲) e 25 % (○) de óleo de soja na proporção SPI:ALG 1:1 (a) e 4:1 (b) sonicadas com ajuste da Lei da Potência e 1:1 (c) homogeneizadas a alta pressão.



(a)



(b)



(c)

Em todos os sistemas a segunda rampa (ascendente) apresentou maiores valores de viscosidade aparente em baixas taxas de deformação e vice-versa em comparação à primeira rampa. Sosa-Herrera et al. (2012) detectaram um aumento pronunciado na viscosidade em baixas taxas de deformação nos pH's 3,4 e 3,6 e um forte comportamento pseudoplástico em

altas taxas de deformação atribuídos à dissolução das associações intermoleculares. Isso demonstra que esses materiais são mais suscetíveis ao cisalhamento, o qual pode ser responsável pelo rompimento de agregados ou pela deformação de gotas (MARFIL; TELIS-ROMERO; TELIS, 2012) formados pela forte interação no pH 3.5.

Emulsões do sistema 1:1 estabilizadas pelo tratamento com alta pressão apresentaram comportamento semelhante às amostras sonicadas na mesma proporção, com influência da taxa de deformação aplicada na viscosidade aparente. Jabeen et al. (2016) constataram que hidrogéis compostos de alginato de sódio mostraram comportamento típico de gel com alta viscosidade a baixas taxas de deformação que diminui com o aumento da taxa de deformação.

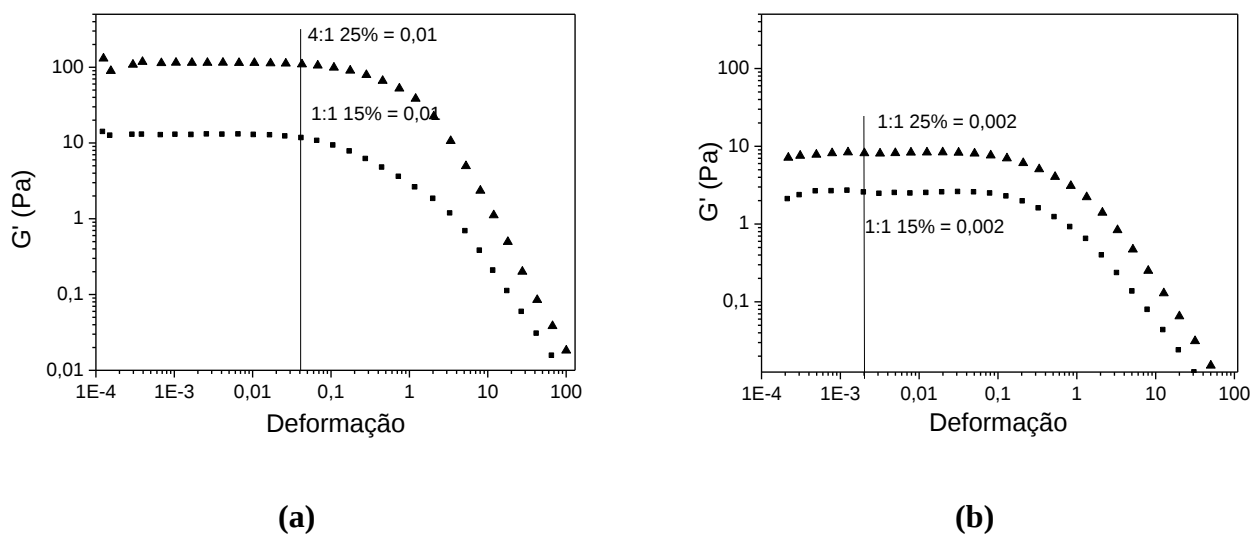
O comportamento reológico dos sistemas 1:1 sonicados e submetidos à alta pressão foram praticamente idênticos, havendo redução da viscosidade aparente para as amostras preparadas com o homogeneizador. Isto indica que a condição de ultrassom aplicada esteve muito próxima de alcançar a estabilidade das emulsões. Mudanças nas condições da sonicação resultam em alterações significativas na dimensão da gotícula de óleo e na estabilidade das emulsões produzidas (Kaltsa et al., 2013). A alta pressão ocasionou a redução das gotículas de óleo e, conseqüentemente, impediu a agregação e floculação das gotas, o que tornou as emulsões estáveis.

5.5.2.4 Comportamento reológico – Cisalhamento oscilatório

Foram realizados testes para determinação da região de viscoelasticidade linear das emulsões sonicadas (1:1 15 % de óleo e 4:1 25 % de óleo) e das emulsões tratadas a alta pressão (1:1 15 e 25 % de óleo) em suas condições extremas com o intuito de verificar se seria possível determinar os espectros mecânicos de todas as amostras. Uma ampla faixa de linearidade foi encontrada e a deformação adotada foi de 1 % (0,01) para amostras sonicadas (Figura 5.47a) e 0,2% (0,002) para amostras submetidas a alta pressão (Figura 5.47b).

Os cremes das emulsões sonicadas apresentaram o mesmo comportamento para as duas proporções e teores de óleo analisados, com G' maior que G'' em toda faixa de frequência aplicada, indicando um material estruturado com o aumento do teor de óleo. O módulo de armazenamento (G') se intensificou principalmente na proporção SPI:ALG 4:1 (Figura 5.48b), apresentando uma ordem de grandeza em torno de 100 Pa, enquanto em 1:1 esteve em torno de 30 Pa com 25 % de óleo (Figura 5.48a), a maior intensidade de G' é atribuída ao maior empacotamento das gotas e liberação da fase aquosa no sistema 4:1.

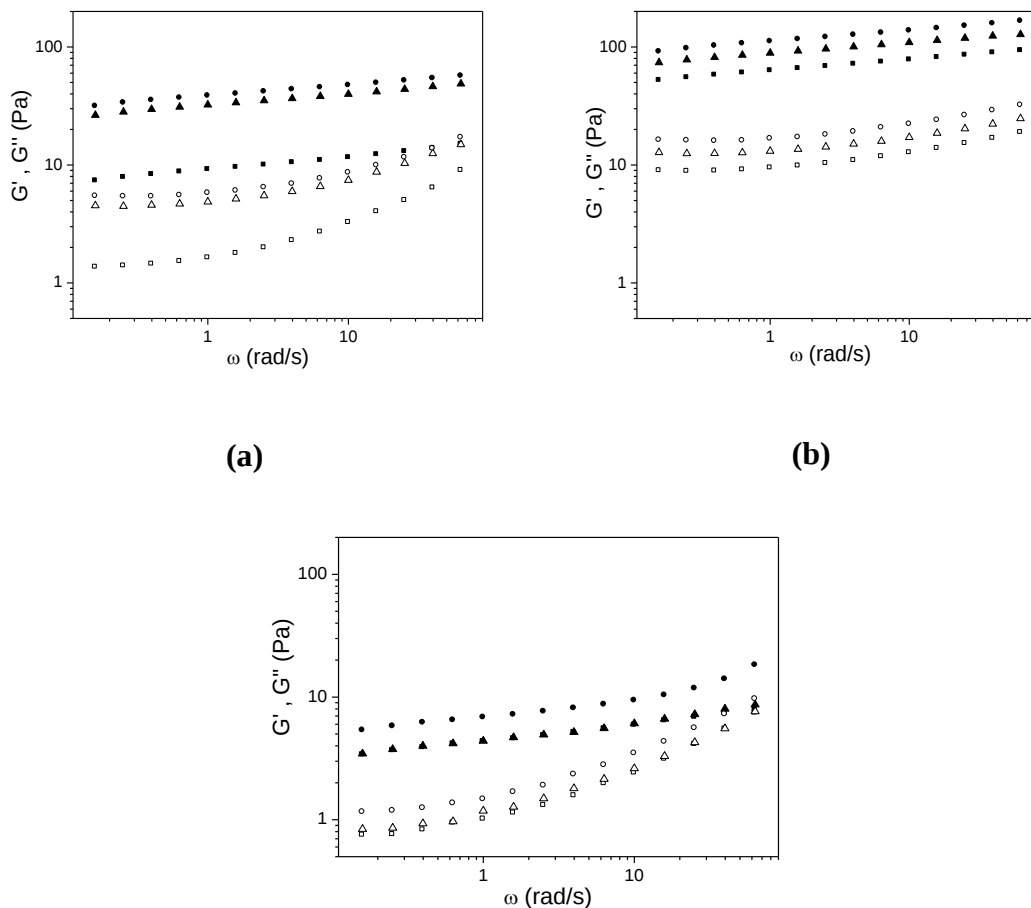
Figura 5.47: Região de viscoelasticidade linear em baixas deformações na frequência de 1 rad/s para emulsões do sistema SPI:ALG sonicadas (a) e submetidas a alta pressão (b) em suas condições extremas.



As emulsões estabilizadas pelo tratamento de alta pressão tiveram o mesmo comportamento, porém com redução significativa na grandeza de G' , sendo aproximadamente 5 Pa para 25 % de óleo (Figura 5.48c). Isso ocorreu justamente porque as emulsões permaneceram estáveis, impedindo o empacotamento das gotas e a eliminação parcial da fase aquosa dos sistemas.

Apesar da redução dos valores de G' , em todas as amostras o módulo elástico foi maior que o módulo viscoso na faixa de frequência aplicada, característica de um material estruturado.

Figure 5.48: Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos) das emulsões sonicadas, SPI:ALG 1:1 (a) e 4:1 (b) e a alta pressão 1:1 (c) com 15 % (■, □), 20 % (▲, △) e 25 % (●, ○).



Os cremes e as emulsões apresentaram uma rede mais resistente e estruturada, possivelmente devido ao alto poder gelificante do alginato. A influência do alginato também foi observada por Sosa-Herrera et al. (2012), que obtiveram a formação de uma rede tridimensional quando alginato foi dissolvido em água e o módulo dinâmico apresentou-se semelhante a um gel.

Maiores valores de G' ocorrem devido ao maior contato das partículas e possibilitam maior resistência mecânica e melhoram atributos sensoriais e físicos. Em um estudo da cinética de formação e reologia de géis de alginato, elevados valores de G' foram encontrados devido ao aumento de contato das forças intermoleculares das partículas (interpartículas) com partículas grandes de uma suspensão e um elevado volume de fase particulada (FERNÁNDEZ FARRÉS; NORTON 2014). Resultados semelhantes foram reportados por Choudhary e Batia (2012) nas medidas reológicas de géis de alginato que

revelaram formação de uma rede fortemente reticulada com um módulo de elasticidade perto de 100 kPa.

5.5.2.5 Rampas de aquecimento-resfriamento

As rampas de aquecimento-resfriamento da solução pura de alginato de sódio no pH 3,5 apresentaram características reológicas interessantes. No entanto, a amostra já apresentava característica de gel a 25°C, pois diferentemente de outros polissacarídeos alimentares, a gelificação do alginato ocorre à temperatura ambiente, o que é muito atraente para aplicações alimentares (NUSSINOVITCH 1997; ONSØYEN 1999). Além disso o pH 3,5 potencializou a obtenção do gel pelo fato que na ausência de íons, géis de ácido algínico podem ser obtidos por acidificação que induz a formação de zonas de junção por ligações de hidrogênio entre monômeros de ácido manurônico (DRAGET, SKJÅK-BRÆK, STOKKE, 2006).

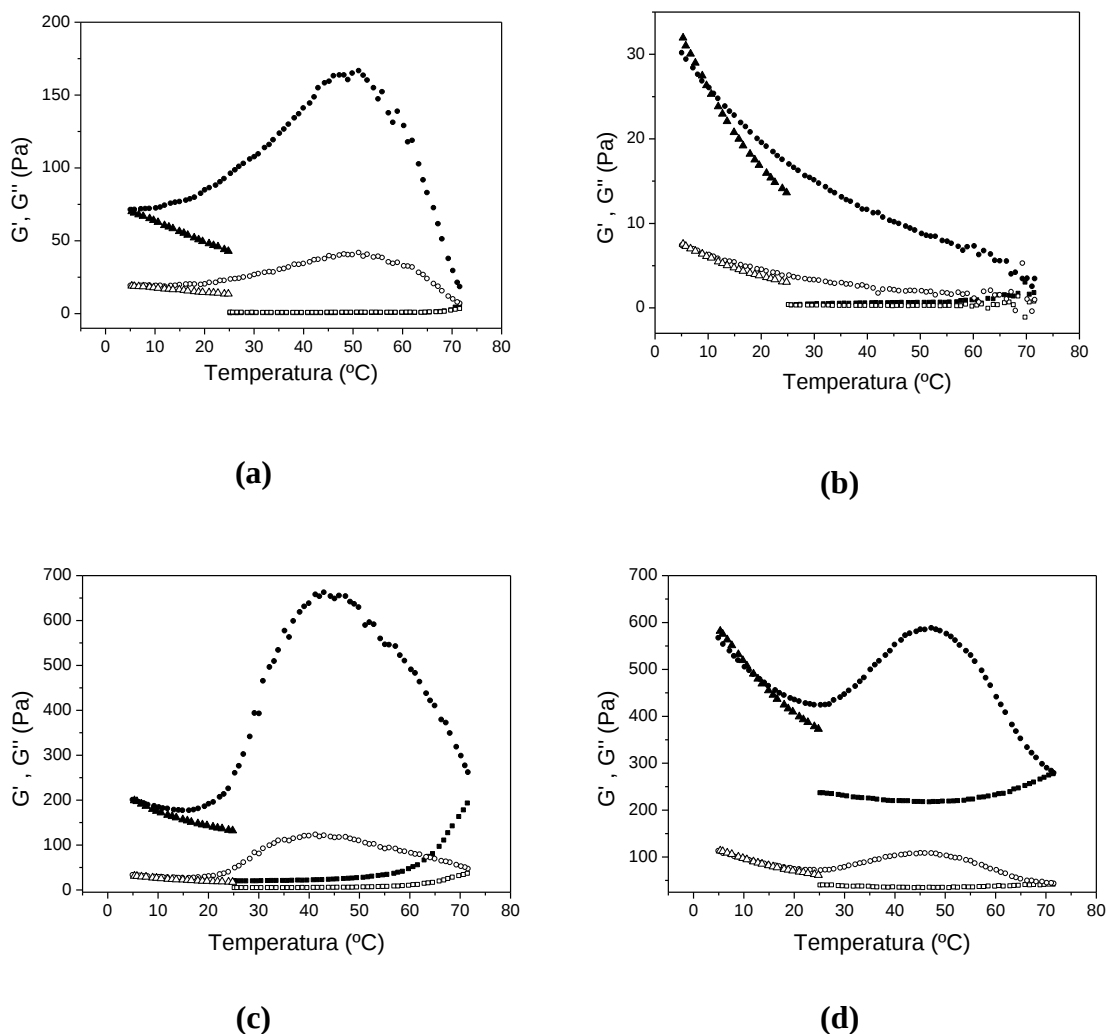
O gel, quando submetido às rampas de temperatura apresentou G' e G'' sobrepostos e constantes na primeira rampa (Figura 5.49a), porém nas rampas seguintes o módulo de armazenamento (G') foi superior ao módulo de dissipação (G''), indicando a formação de um gel mais resistente e estruturado. Em seguida, na rampa de resfriamento houve aumento progressivo de G' abaixo de 70°C com pico em 50° C seguido por um decréscimo em menores temperaturas, o que indica que a elevação da temperatura próxima de 50°C potencializou a estrutura e resistência do gel. Na terceira rampa houve decréscimo de G' , porém apresentou valores intermediários em relação às rampas anteriores, caracterizando comportamento de gel irreversível com a temperatura. Os géis de ácido algínico são termoestáveis e o comportamento térmico dos géis de alginato é uma propriedade funcional importante desse polissacarídeo (NUSSINOVITCH 1997; ONSØYEN 1999), pois apresentam pouca ou nenhuma sinérese, não são termo reversíveis e não necessitam de refrigeração, podendo ser usados como géis de sobremesas que não fundem, mesmo em altas temperaturas ambiente (BEMILLER; HUBER, 2010).

Os parâmetros reológicos obtidos permitem caracterizar o gel de alginato como semissólido viscoelástico, pois a estrutura da rede tridimensional apresenta resistência suficiente para se comportar de forma similar a um sólido elástico, quando submetida a uma força maior. Entretanto, a fase líquida contínua, na qual as moléculas são completamente móveis, torna o gel menos rígido do que um sólido comum, levando-o a comportar-se, em certos aspectos, como um líquido viscoso (BEMILLER; HUBER, 2010).

Para o SPI (Figura 5.49b) os módulos apresentaram predominância elástica com G' superior a G'' em todas as rampas, indicando a formação de um gel estruturado e resistente. Na primeira rampa a predominância de G' foi discreta, havendo elevação de G' a partir de 65° C, possivelmente devido à gelificação da proteína ocasionada pela desnaturação parcial. Em seguida, houve um aumento progressivo e acentuado de G' com a redução da temperatura, seguido por um leve aumento de G' e posterior redução suave na terceira rampa. Assim, pode se concluir que o aquecimento e o posterior resfriamento do isolado proteico de soja resultaram em um gel irreversível ocasionado pela desnaturação da fração 7S (β -conglucina) a 65°C, pois segundo alguns autores a desnaturação da fração 7S se inicia entre 60-75°C (RENKEMA et al. 2002; NAGANO, AKASAKA; NISHINARI, 1994) e a precipitação das proteínas pelo calor causa desnaturação irreversível na maioria dos casos (YASUMATSU et al.,1972). A gelificação proteica refere-se à transformação de uma proteína do estado de “sol” para o estado “pró-gel”, essa conversão é irreversível, pois ocorrem muitas interações proteína-proteína entre as moléculas desdobradas. Quando o pró-gel é resfriado à temperatura ambiente ou refrigeração, a diminuição da energia térmica facilita a formação de ligações não covalentes estáveis entre grupos funcionais expostos das diversas moléculas, sendo isso o que constitui a gelificação (DAMODARAN, 2010). Além disso, é relevante abordar que a desnaturação do isolado proteico de soja puro e das emulsões SPI:ALG ocorreu parcialmente, por haver desnaturação somente da fração 7S (β -conglucina) aproximadamente em 65°C, pois as rampas de aquecimento não atingiram temperaturas $\geq 80^\circ\text{C}$, na qual a fração 11S (glicina) irá desnaturar conforme encontrado por Puppo et al. 2004 (86,7°C), Bikbov et al. (1981) (84.5 °C), Nagano; Akasaka e Nishinari (1994) (80°C) e Nagano; Mori e Nishinari (1994) (85°C), o que torna a aplicação do SPI e dos cremes obtidos pelo complexo SPI:ALG altamente favoráveis por serem mais estáveis, possivelmente por não afetar sua solubilidade e manter suas propriedades funcionais. Do ponto de vista nutricional, a desnaturação parcial das proteínas costuma melhorar a digestibilidade e a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, além de inativar enzimas que conferem odor indesejável (DAMODARAN 2010). Jaramillo; Roberts e Coupland, (2011) avaliaram o efeito da temperatura na solubilidade de complexos de SPI com pectina e constataram que a adição de pectina aumentou a solubilidade do SPI próximo do ponto isoelétrico (pH 4 e 5) e alegam que algum nível de rearranjo estrutural ocorreu no sistema. Demais estudos demonstraram que complexos proteína:polissacarídeo foram estabilizados

por aquecimento em outros pH's (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2009; GENTES et al., 2010).

Figura 5.49: Rampas de aquecimento-resfriamento oscilatório: rampa 1 de 25 a 72 °C (■); Rampa 2 de 72 a 5 °C (○); rampa 3 de 5 a 25 °C (▲) do alginato de sódio (a), do SPI (b) puros e da emulsão na proporção 1:1 (c) e 4:1 (d) com 15% de óleo de soja. Módulos de armazenamento, G' (símbolos fechados), e módulo de dissipação, G'' (símbolos abertos).



Ao avaliar o comportamento reológico das emulsões é perceptível a semelhança com o alginato e o SPI devido ao comportamento característico predominante, além do que nas duas proporções avaliadas G' excedeu G'' em toda faixa de temperatura, o que torna esses cremes ainda mais interessantes devido suas características de géis estruturados. Feng et al. (2017b) determinaram os módulos de armazenamento de misturas de géis de alginato com quitosana e cálcio e também constataram que G' excedeu G'' .

Para os cremes da proporção SPI:ALG 1:1 (Figura 5.49c), na primeira rampa de aquecimento G' aumentou discretamente em 40 Pa até 60°C, acima dessa temperatura houve um aumento progressivo ocasionado possivelmente pela desnaturação 7S do SPI (conforme discutido anteriormente), em seguida, ao resfriar, houve comportamento característico observado no alginato de sódio com pico em aproximadamente 50°C atingindo valores para G' de 650 Pa e finalmente na terceira rampa, ocorreu decréscimo de G' para 200 Pa com valores intermediários em relação às rampas anteriores, caracterizando comportamento de gel irreversível, que foi observado nos dois biopolímeros puros.

Na proporção SPI:ALG 4:1 (Figura 5.49d) algumas diferenças importantes foram observadas. Devido ao maior teor de proteína nesse sistema, houve maior predominância de comportamento do SPI em comparação ao sistema 1:1. Inicialmente G' apresentou maiores valores em torno de 230 Pa. Ao continuar o aquecimento em 72°C a curva de G' encontrou com a curva de G' da segunda rampa, o que pode estar relacionado com uma maior gelificação da proteína devido ao aumento da concentração. A gelificação ocorre apenas se a concentração de proteína estiver acima de um valor crítico e se as condições ambientais (pH, força iônica) forem adequadas (KUHN; PICONE; CUNHA, 2012). Em seguida, ao resfriar, o pico em 50°C característico do alginato ocorreu com G' de 590 Pa; ao atingir 25 °C reduziu para aproximadamente 420 Pa e ao continuar o resfriamento até 5 °C atingiu 565 Pa, indicando que maiores concentrações e menores temperaturas favoreceram a gelificação proteica e a estrutura do gel, intensificando G' . Proteína de soja preparada a frio apresentou maior módulo de armazenamento com o aumento da concentração proteica (MALTAIS et al. 2005). Finalmente, na terceira rampa houve comportamento característico do SPI com um leve aumento de G' e posterior redução suave na terceira rampa.

É importante destacar que na proporção 4:1 os cremes apresentaram maior empacotamento das gotas e menor teor de água, conforme discutido nos itens 5.5.2.1 e 5.5.2.2, o que também favoreceu maiores valores de G' .

Assim, esses cremes tornam-se materiais de forte interesse devido sua resistência e estrutura em diferentes temperaturas, o que permite sua aplicação em diferentes produtos alimentícios submetidos ou não ao tratamento térmico moderado, como a pasteurização a 72°C (QI, et al., 2015), possibilitando a melhoria dos atributos sensoriais, dentre eles a textura. Levando em consideração que o ácido algínico, ou seja, uma solução de alginato cujo pH foi diminuído, com e sem adição de íons cálcio, já é empregado na preparação de géis macios, tixotrópicos e que não fundem (BEMILLER; HUBER, 2010) e a proteína de soja é a proteína

de leguminosa mais importante devido ao seu elevado nível de proteína e composição de aminoácidos bem equilibrada (VAN VLIET et al. 2002). Diante disso, a combinação dos dois biopolímeros possibilita o desenvolvimento e a melhoria de vários produtos submetidos ao tratamento térmico industrial.

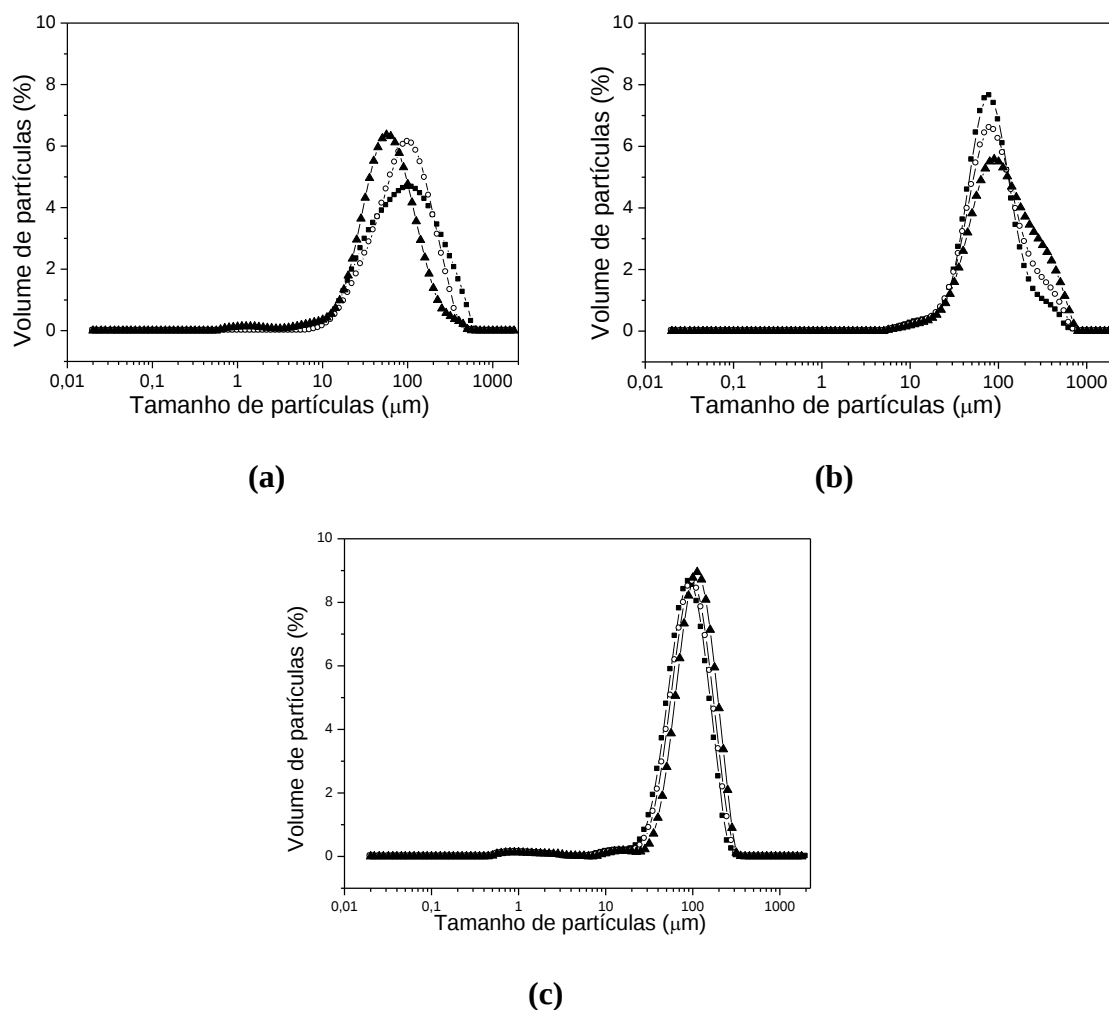
5.5.2.6 Distribuição de tamanho de gotas

Os cremes das emulsões sonicadas SPI:ALG 1:1 (Figura 5.50a) apresentaram maiores tamanhos de gotas, como esperado devido à instabilidade das emulsões, com comportamento monomodal predominante. Menores teores de óleo apresentaram maior volume de gotículas, com tamanho médio de 56 μm para 15 % de óleo e 100,2 μm para 20 e 25 % de óleo, porém 25 % de óleo apresentou maior amplitude na faixa de distribuição do tamanho de gotas o que ocasionou um menor volume de gotas com 100,2 μm , ao contrário de 20 % que apresentou uma faixa mais estreita proporcionando maior volume de gotas no mesmo tamanho, comportamento comprovado pelos valores de diâmetro médio ($D_{3,2}$) de 30, 59 e 63 μm para 15, 20 e 25 % de óleo, respectivamente.

Porém, uma leve proeminência de gotas foi observada em 1,2 μm , indicando presença de menores gotículas, possivelmente geradas pela aplicação do ultrassom e por haver maior concentração de alginato nesta proporção, o que pode ter impedido a floculação total das gotas. Pongsawatmanit; Harnsilawat; McClements (2006) avaliaram o efeito da sonicação na estabilidade de emulsões com diferentes concentrações de alginato no pH 3 e observaram que houve cremeação, mas a sonicação melhorou a estabilidade da emulsão em maiores concentrações de alginato.

A proporção 4:1 (Figura 5.50b) apresentou distribuição monomodal com maiores tamanhos de gotas em relação à proporção 1:1, mas nesse caso maiores teores de óleo ocasionaram maior volume de gotículas sendo 79 μm para 20 e 25 % de óleo e 89 μm para 15 % de óleo, estando de acordo com os valores de $D_{3,2}$ obtidos com 80, 71 e 67 μm para 15, 20 e 25 % de óleo, respectivamente. Tamanhos distintos de partículas e com poucos agregados também foram encontrados por Pan et al. (2015) ao avaliarem diferentes proporções de co-misturas SPI:ALG.

Figura 5.50: Distribuição de tamanho de gotículas em emulsões O / W sonicadas nas proporções SPI:ALG (a) 1: 1 e (b) 4: 1 e emulsões submetidas à alta pressão 1:1 (c) com 15% (▲), 20% (○) e 25% (■) de óleo de soja.



Entretanto, em 4:1 foi observada uma tendência à distribuição bimodal nas amostras nos diferentes teores de óleo com presença de gotas grandes com tamanho médio aproximado de 355 μm, principalmente em menores teores de óleo que apresentou maior amplitude da faixa. Esses dados coincidem com a microscopia confocal (Figura 5.45) e avaliação visual (Figura 5.42) que constatou a instabilidade com maior cremeação ocasionada por floculação e coalescência acentuadas para menores concentrações de alginato. Pongsawatmanit; Harnsilawat; McClements (2006) constataram que no pH 5 o diâmetro médio das partículas das emulsões foi relativamente elevado na ausência de alginato, e diminuiu ligeiramente quando o alginato foi adicionado. Além disso, formou-se uma camada de soro transparente nas emulsões após o armazenamento, cuja altura diminuiu com o aumento da concentração de alginato.

Dessa forma, isso justifica a tendência à estabilidade das emulsões na proporção 1:1 (menores $D_{3,2}$ e cremeação) indicando que a maior concentração de alginato possibilitou maior interação eletrostática atrativa com as cargas da proteína, evitando maior agregação das gotas pela formação da rede contínua. A adição de alginato de sódio às emulsões provocou uma ligeira melhoria na sua estabilidade à floculação de gotículas, provavelmente porque as moléculas de alginato adsorveram as superfícies das gotículas e aumentaram a repulsão eletrostática e o impedimento estérico entre elas (PONGSAWATMANIT; HARNSILAWAT; McCLEMENTS, 2006).

As amostras SPI:ALG 1:1 homogeneizadas a alta pressão apresentaram uma distribuição monomodal com um pico de 100 μm para todos os teores de óleo analisados e pequeno volume em 1,5 % para todos os teores de óleo. Embora o ultrassom ocasione a redução do tamanho das gotas, nesse caso o homogeneizador a alta pressão foi altamente eficiente, proporcionando uma redução significativa no tamanho das gotículas, comprovado pelos baixos valores $D_{3,2}$ de aproximadamente 38 μm , que combinado com a maior concentração de alginato impediu a floculação das gotas, promovendo a estabilização das emulsões.

CONCLUSÕES PARCIAIS SPI-ALGINATO

O sistema SPI-alginato foi muito semelhante ao sistema WPC-alginato, com algumas diferenças consideráveis. Houve forte complexação do SPI com o alginato que foi comprovado pela avaliação visual com forte separação de fases, complexos este que foram reduzidos com a aplicação de ultrassom, fato comprovado pelas imagens de microestrutura, que mostrou um sistema mais homogêneo e compacto. Menores proporções dos complexos (1:1 e 2:1) e não permitiram ensaios oscilatórios por apresentarem comportamento tendendo ao newtoniano. Nas demais proporções os complexos apresentaram bom ajuste da Lei da Potência com comportamento pseudoplástico com leve tixotropia e um material estruturado ($G' > G''$) em maiores concentrações de proteína. Os módulos de G' foram mais acentuados para as amostras não sonicadas devido à forte homogeneidade e compactação do sistema onde o ultrassom gerou maior compactação dos complexos causando redução dos valores de G' . Emulsões sonicadas apresentaram separação de fases em todas proporções e teores de óleo avaliados. Sistemas 1:1 tiveram tendência à estabilidade, apresentando fase aquosa

turva que foi comprovado pela análise de composição química havendo efeito significativo das proteínas, indicando que as proteínas adsorveram nas gotículas de óleo e não foram alojadas somente na fase superior, ao contrário dos sistemas 4:1 que tiveram separação de fases bem definida com fase inferior translúcida, onde nenhum dos componentes das emulsões apresentaram efeito significativo, indicando que os biopolímeros e o óleo foram alojados principalmente na fase creme. As imagens de microestrutura mostraram que as emulsões sonicadas foram instáveis devido à floculação e coalescência das gotas, principalmente em 4:1 com tendência à distribuição bimodal do tamanho de gotas com diâmetro médio aproximadamente de 70 μm , e 50 μm nos sistemas 1:1. Amostras 1:1 quando tratadas com alta pressão tornaram-se estáveis com distribuição monomodal e presença de pequenas gotículas com diâmetro de 38 μm , comprovando o efeito positivo da alta pressão na estabilização de emulsões. O comportamento reológico de todas as emulsões sonicadas mostrou-se pseudoplástico com bom ajuste da Lei da Potência, porém menores valores de viscosidade aparente foram obtidos para as amostras preparadas com alta pressão. Rampas de aquecimento mostraram a influência do biopolímero predominante nos sistemas, possibilitando distintas aplicações, desde produtos resfriados até produtos consumidos quentes, devido às suas características reológicas observadas e principalmente indicaram ocorrer desnaturação parcial do SPI, o que é de suma importância por não afetar as propriedades funcionais desta proteína, como a solubilidade. Todos os cremes sonicados mostraram ser um material estruturado por formarem uma rede rígida devido à forte interação atrativa entre o SPI e o alginato, possibilitando sua aplicação na indústria de alimentos na melhoria de formulações, na microencapsulação de compostos ativos ou ainda no desenvolvimento de novos produtos.

6- CONCLUSÕES GERAIS

Com os resultados obtidos foi possível encontrar uma faixa restrita de interação entre pH 3 e 4,0, de forma que o pH 3,5 foi adotado para todos os pares de biopolímeros avaliados. A turbidimetria comprovou a complexação no pH 3,5 e indicou que a aplicação de ultrassom ocasionou a diminuição das partículas dos complexos formados dispersas no meio aquoso em todos os sistemas e, embora a técnica de FTIR não identifique a interação entre os biopolímeros, a técnica foi fundamental para encontrar os grupos estruturais presentes nas proteínas e polissacarídeos, grupos estes que podem interagir e formar a complexação. Em contrapartida, a avaliação visual confirmou a complexação dos sistemas avaliados apresentando separação de fases associativa com a formação de complexos coacervados para os pares contendo alginato e comportamento denominado miscibilidade para os pares com pectina.

Com relação ao comportamento reológico, os modelos lei da Potência, Newton e Sisko ajustaram-se bem aos dados reológicos ($R^2 > 0,9$) dos sistemas estudados (complexos e emulsões), onde os pares com alginato e SPI:PEC 4:1 apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$), enquanto os demais sistemas que tiveram como base a pectina tiveram comportamento newtoniano. Além disso, na avaliação de microestrutura dos sistemas (complexos e emulsões) com alginato, G' foi maior que G'' em toda faixa de frequência aplicada, indicando ser um material estruturado e resistente, mostrando pouca dependência da frequência aplicada. Os dados reológicos dos complexos foram confirmados pela microscopia ótica que também confirmou as imagens obtidas na avaliação visual, indicando que a intensidade da formação de complexos foi mais acentuada com o aumento da proporção de proteína no sistema, confirmando também que a aplicação do ultrassom potencializou a obtenção de partículas menores para todos os pares.

Quanto às emulsões, a avaliação visual permitiu observar que os sistemas SPI:ALG, WPC:ALG e SPI:PEC 4:1 apresentaram mudanças físicas à medida que a quantidade de óleo aumentou em relação à solução total, possivelmente por aumentar a área de contato e ocasionar maior adsorção dos biopolímeros, enquanto, emulsões dos pares WPC:PEC e SPI:PEC 1:1 indicaram ser sistemas totalmente estáveis em baixas porcentagens de óleo. Esses distintos comportamentos foram atribuídos à influência dos componentes na instabilidade das emulsões, que foi comprovada pela análise de composição química. Ademais, a microscopia confocal comprovou a adsorção da proteína nas gotas e seu

aprisionamento em uma rede tridimensional formada pelo polissacarídeo e permitiu identificar a forma física e a distribuição das gotas para cada sistema, o que foi comprovado pela análise de tamanho de gotas que apresentou pequenas gotículas para sistemas com pectina e maiores gotas nos sistemas com alginato.

Os dados obtidos comprovaram que o ultrassom foi altamente eficiente na estabilização de emulsões para os pares SPI:PEC 1:1 e WPC:PEC 1:1 e 4:1 e embora, emulsões SPI:PEC 4:1 tenham apresentado separação de fases, tiveram menores tamanhos de gotas em relação aos pares com alginato, mostrando os diferentes efeitos de cada polissacarídeo.

Na microestrutura dos sistemas SPI:ALG e WPC:ALG o creme formado foi estável no decorrer dos 7 dias. Mesmo com separação de fases, esses pares são de interesse por sua estabilidade de creme e características reológicas interessantes possibilitando distintas aplicações na indústria, como melhoria de textura em molhos, sopas, sobremesas, assim como podem ser utilizados como material encapsulante de compostos bioativos. Além disso, esses sistemas (4:1) ainda podem ser melhorados em pesquisas posteriores com aplicação de homogeneizador a alta pressão, pois mesmo que a separação de fases tenha ocorrido para alguns sistemas sonicados (WPC:ALG, SPI:ALG), no geral apresentaram um bom resultado com baixos índices de cremação, inferiores a 40,9 %. A aplicação do homogeneizador a alta pressão nos sistemas WPC:ALG e SPI:ALG 1:1 foi fundamental para garantir a estabilização das emulsões, ocasionada pela redução do tamanho de gotículas e maior homogeneização do sistema, indicando o efeito positivo da alta pressão na estabilização de emulsões.

Assim é possível concluir que este trabalho foi de suma importância para entender e encontrar os diferentes efeitos ocasionados por distintos fatores como proporção de biopolímeros, teor de óleo, temperatura, tipo de polissacarídeo e proteína e os fortes efeitos dos processos de homogeneização utilizados no preparo das emulsões para sua estabilização. Assim como, permitiu encontrar que emulsões estáveis foram obtidas e, apesar disso não ter sido verificado, pois qualquer substituição de ingrediente mesmo que verificada na reologia deve ser comparada em relação ao sistema tradicional e ratificado pela avaliação sensorial, essas emulsões permitem sua aplicação como possíveis substitutos de gordura devido ao baixo teor de lipídeos, da mesma forma, os cremes são uma alternativa na melhoria de produtos alimentícios devido suas características reológicas apresentadas, podendo também ser aplicados como sistemas de microencapsulação e melhoradores de textura.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-GHAFFAR, M.A.; HASHEM, M.S.; EL-AWADY, M.K.; RABIE, A.M. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. **Carbohydrate Polymers** v.89, p. 667– 675, 2012.
- AGUILERA, J. M. Microstructure and Food Product Engineering. **Food Technology**. v. 54, n. 11, p. 56-55, 2000.
- AGUILERA, J. M. Why food microstructure? **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 3-11, 2005.
- AGUILERA, J. M., RADEMACHER, B. Protein gels. In Yada, R. Y. (ed.), **Protein in Food processing**, pp.468-482. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- ALBANO, K. M.; FRANCO, C.M. L.; TELIS, V.R.N. Rheological behavior of Peruvian carrot starch gels as affected by temperature and concentration, *Food Hydrocolloid*. 40 (2014) 30-43.
- ANDRADE, C. T.; NASSER, R. O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 25(2), p. 315-321, 2005.
- ANDRADE, C. T.; ROJAS, E. G. A. Biopolymers (pp. 17-68). In: Telis, V. R. N. (Ed.), **Biopolymer engineering in food processing**. CRC Press: New York, US., 2012; 398 pp.
- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 184–193, 2008.
- ANTONOV, Y. A.; ZUBOVA, O. M. Phase state of aqueous gelatin–polysaccharide (1) polysaccharide (2) systems, **Int J. Biol.** v.29, p.67-71, 2001.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg, Md.: AOAC International, 2005.
- ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of sodium alginate incorporation procedure on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v.70, p.191-200, 2017.
- ARZENI, C.; MARTÍNEZ, K.; ZEMA, P.; ARIAS, A.; PÉREZ, O. E.; PILOSOFF, A.M.R. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 463-472, 2012.

ASHOKKUMAR, M.; BHASKARCHARYA, R.; KENTISH, S.; LEE, J.; PALMER, M.; ZISU, B. The ultrasonic processing of dairy products – an overview, **Dairy Science Technology**, v. 90(2-3), p. 147-168, 2009a.

ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S.; LEE, J.; ZISU, B.; PALMER, M.; AUGUSTIN, M. A. Processing of dairy ingredients by ultrasonication, *PCT Int. Appl.*, WO2009/079691 A1. 2009b.

ASHOKKUMAR, M.; LEE, J.; ZISU, B.; BHASKARCHARYA, R.; PALMER, M.; KENTISH, S. Sonication increases the heat stability of whey proteins, **Journal of Dairy Science**, v.92, p. 353–5356, 2009c.

AUSTIN SUTHANTHIRARAJ, S.; KUMAR, R.; JOSEPH PAUL, B. FT-IR spectroscopic investigation of ionic interactions in PPG 4000: AgCF3SO3 polymer electrolyte *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **Spectrochimica Acta Part A**, v. 71, p. 2012–2015, 2009.

BAEZA, R.I.; CARP, D. J.; PÉREZ, O. E.; PILOSOFF, A. M. R. **Lwt-Food Science Technology**. v. 35(8) p.741–747, 2002.

BAJPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, p.645-658, 2006.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. F. R. S. 1^a ed. **An introduction to rheology**. Amsterdam, The Netherlands Elsevier, 1989.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, 2011.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 813p. 1988.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. (Eds.), **Química de Alimentos de Fennema** (pp76-130). 4ed. Porto Alegre, Brazil: Artmed, 2010.

BERTRAN, M.E.; TURGEON, S.L. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 21(2), p. 159–166, 2007.

BIKBOV, T. M.; GRINBERG, V. Y.; SCHMANDKE, H.; CHAIKA, T. S.; VAINTRAUB, I. A.; TOLSTOGUZOV, V. B. A study on gelation of soybean globulin solutions, **Colloid and Polymer Science**, v. 259(5), p. 536-547, 1981.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p.686-689. 1999.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, v. 37(8), p. 911-917, 1959.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 231p. 1989.

BOWERS, J. **Food Theory and Applications**. 2ª Ed. New York: Macmillan Publishing Company, 411p. 1992.

BRYANT, C. M., McCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science and Technology**, v.9, p. 143-151, 1998.

BRYANT, C.M., MCCLEMENTS, D.J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat desaturated whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.383-390, 2000.

BUNGENBERG DE JONG, H. G.; KRUYT, H. R. Coacervation (partial miscibility in colloid systems). **Proc K Ned Akad Wet** v.32, p.849–856, 1929.

BURGESS, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 140, n.1, p. 227-238, 1990.

CAMILO, K. F. B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados**. 2007. Dissertação para obtenção do título de Doutor, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP. 147p.

CAMINO, N. A.; PÉREZ, O. E.; PILOSOFF, A. M. R. Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1089-1095, 2009.

CAPRON, I.; COSTEUX, S.; DJABOUROV, M. Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions. **Rheologica Acta**, v. 40, p. 441-456, 2001.

CASAROTTI, S. N.; JORGE, N. Aspectos tecnológicos dos substitutos de gordura e suas aplicações em produtos lácteos. **Nutrire:rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 35 (3), 163-181, 2010.

CAVALLIERI, A. L. F. **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos**. 2007. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor, Universidade de Campinas, Campinas, SP. 236p.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p. 975-983, 2012.

CHEE, K. S.; WILLIAMS, P.A.. Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin. **J Agric Food Chem**. v. 56 p.4164–4171, 2008.

CHEE, K. S.; WILLIAMS, P.A.; CUI, S.; WANG, Q.. Characterization of the surface active components of sugar beet pectin and the hydrodynamic thickness of the adsorbed pectin layer. **J Agric Food Chem** 2008 v. 56, p. 8111–8120, 2008.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL H. **Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 333p. 1976.

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

CHEN, B.; LI, H.; DING, Y.; SUO, H. Formation and microstructural characterization of whey protein isolate/beet pectin coacervations by laccase catalyzed cross-linking. **LWT - Food Science and Technology**, v.47, p.31-38, 2012.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, p.272–283, 2006.

CHEN, W. S.; SOUCIE, W. G. The ionic modification of the surface charge and isoelectric point of soy protein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, p. 1346-1350, 1986.

CHO S. Y.; PARK J. W.; BATT H. P.; THOMAS R. L. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. **LWT**, v. 40, p. 418-423, 2007.

CHO, Y-H.; McCLEMENTS, D. J.Theoretical Stability Maps for Guiding Preparation of Emulsions Stabilized by Protein-Polysaccharide Interfacial Complexes. **Langmuir**, 25(12), p.6649–6657, 2009.

CHOUDHARY, S.; BATIA, S. R.Rheology and nanostructure of hydrophobically modified alginate (HMA) gels and solutions. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.524– 530, 2012.

CHUNG, C.; DEGNER, B.; McCLEMENTS, D. J. Designing reduced-fat food emulsions: Locust bean gum-fat droplet interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p.263-270, 2013.

CHUNG, C.; DEGNER, B.; McCLEMENTS, D. J. Rheology and microstructure of bimodal particulate dispersions: Model for foods containing fat droplets and starch granules. **Food Research International**, v. 48, p.641-649, 2012.

COELHO, M. T. **Pectina: Características e Aplicações em Alimentos**. Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 32p. 2008.

COMUNIAN, T.A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52(1), p. 373–379, 2013.

CONSIDINE, T.; NOISUWAN, A.; HEMAR, Y.; WILKINSON, B.; BRONLUND, J.; KASAPIS, S. Rheological investigations of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 2008-2017, 2011.

COOPER, C.L.; DUBIN, P.; KAYITMAZER, A.B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte protein complexes. **Curr Opin Colloid Interface Science** v. 10, n. 1-2, p.52–78, 2005.

COSTA, B. S. **Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja**. 2014. Dissertação para obtenção do título de Mestre, Universidade de Campinas, Campinas, SP, 143 p.

CRISTENSEN, S.H. Pectins. In: GLICKSMAN, Martin (Ed.). **Food Hydrocolloids**. Boca Raton: CRC Press. v.3. p.205-230, 1986.

DAMODARAN S. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. (Eds.), **Química de Alimentos de Fennema** (pp179-262). 4ed. Porto Alegre, Brazil: Artmed, 2010.

DAMODARAN, S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 36(2), p. 262-269, 1988.

DAMODARAN, S., PARAF, A. **Food Protein and their Applications** In: NAKAI, S.; MODLER, H.W (ed). New York: VCH Publishers, Inc., 1997.

DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.555-563, 2001.

DE KRUIF, C.G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.9, n.5, p.340–349, 2004.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.

DE WIT, J. N. Thermal behaviour of bovine [beta]-lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 1, p. 27-34, 2009.

- DESRUMAUX, A., MARCAND, J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. **International Journal of Food Science and Technology** v.37, n.3, p. 263–269, 2002.
- DEVI, A. F.; BUCKOW, R.; HEMAR, Y.; KASAPIS, S. Modification of the structural and rheological properties of whey protein/gelatin mixtures through high pressure processing. **Food Chemistry**, v.156, p. 243–249, 2014.
- DICKINSON, E. **An introduction to food hydrocolloids**, Oxford, UK: University Press chapter 1, 1992.
- DICKINSON, E. Colloidal aggregation: mechanisms and implications. In E. DICKINSON, T. VANVLIET (Eds). **Food colloids, biopolymers and materials**, p.68-83, 2003
- DICKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilisers. **Food Hydrocolloids**, v. 23. p.1473–1482, 2009.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v.17, p. 25-39, 2003.
- DICKINSON, E.; PAWLOWSKY, K. Effect of i-carrageenan on flocculation, creaming, and rheology of a protein-stabilized emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.45, p. 3799–3806, 1997.
- DOI, E. Gels and gelling of globular proteins, Trends Food Sci Tech. v. 4(1), p.1-5, 1993.
- DONSI, F.; SENATORE, B.; HUANG, Q. R.; FERRARI G. Development of novel pea protein-based nanoemulsions for delivery of nutraceuticals. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 10653-10660, 2010.
- DOUBLIER, J.-L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.5, p. 202-214, 2000.
- DRAGET, K. I. Alginates. In: Phillips. G. O.; Williams, P. A. (Eds.). Handbook of hydrocolloids, Boca Raton. FL: CRC Press, p. 379-395, 2000.
- DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; STOKKE, B. T. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. **Food Hydrocolloids**. v.20 (2-3), p.170-175, 2006.
- DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the

microencapsulation of oil droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2004.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v. 42, n.4, p.136-148, 1988.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z. The effect of ultrasound on the structure and properties of the water-soluble corn hull heteroxylan. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.4, n.4, p.305-309, 1997.

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. p. 329-340, 2005.

EVANS, M.; RATCLIFFE, I.; WILLIAMS, P.A.; Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science** v. 18, p. 272–282, 2013.

FELLAH, A.; ANJUKANDI, P.; WATERLAND, M.R.; WILLIAMS, M.A.K. Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.847–853, 2009.

FENG, L.; CAO, Y.; XU, D.; WANG, S.; ZHANG, J. Molecular weight distribution, rheological property and structural changes of sodium alginate induced by ultrasound **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 609–615, 2017a.

FENG, L.; CAO, Y.; XU, D.; YOU, S.; HAN, F. Influence of sodium alginate pretreated by ultrasound on papain properties: Activity, structure, conformation and molecular weight and distribution, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 224-230, 2016.

FENG, Y.; KOPPLIN, G.; SATO, K.; DRAGET, K. I.; VÅRUM, K. M. Alginate gels with a combination of calcium and chitosan oligomermixtures as crosslinkers **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p.490–497, 2017b.

FENNEMA, O. R. Food Chemistry. 3. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1069p. 1996.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**, 4ª Ed., Artmed, 2010.

FERNÁNDEZ FARRÉS, I.; NORTON, I. T. Formation kinetics and rheology of alginate fluid gels produced by in-situ calcium release. **Food Hydrocolloids**, v.40, p.76-84, 2014.

- FIORAMONTI, S. A.; MARTINEZ, M.J.; PILOSO, A. M. R.; RUBIOLO, A. C.; SANTIAGO, L. G. Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil microencapsulation: Effect of pH and alginate concentration. **Food Hydrocolloids**, v.43, p.8-17, 2015.
- FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 5, p. 151-159, 2002.
- FOX, P. F.; KELLY, A. L. Developments in the chemistry and technology of milk proteins 1. Overview of major milk proteins. **Food Australia**, v. 55, n. 3, p. 104- 108, 2003.
- FREITAS, M. L. F., ALBANO, K. M. , TELIS, V. R. N. Characterization of biopolymers and soy protein isolate-high-methoxyl pectin complex. **Polímeros**, v. 27(1), p. 62-67, 2017..
- FRIBERG, S.; LARSSON, K.; SJOBLOM J. **Food Emulsions**, New York, U.S.: Marcel Dekker, 2004.
- FRITH, W. J. Mixed biopolymer aqueous solutions – phase behavior and rheology. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 161, p. 48–60, 2010.
- FUNAMI, T.; ZHANG, G. M.; HIROE, M.; NODA, S.; NAKAUMA, M.; ASAI, I., et al. Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin. **Food Hydrocolloids**, V. 21 p.1319–1329, 2007.
- GALAZKA, V. B.; SMITH, D.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E. Complexes of bovine serum albumin with sulfated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. **Food Chemistry**, v.64, p.303- 310, 1999.
- GALAZKA, V.B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D.A. Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 182-187, 2000.
- GARTI, N., LESER, M.E. Emulsification properties of hydrocolloids. **Polymers for Advanced Technologies**, v.12, p.123-135, 2001.
- GAVA, A. J. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.
- GENTES, M. C.; ST-GELAIS, D.; TURGEON, S. L. Stabilization of whey protein isolate–pectin complexes by heat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58(11), p. 7051–7058, 2010.
- GERMAN, B.; DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. *Effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin* **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 30(5) 807–811, 1982.

GIRALDO-ZUÑIGA, A.D.; COIMBRA, J.S.R.; GOMES, J.C.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 325 (57), p. 35-46, 2002

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low and high methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 585-591, 2002.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n.3, p. 267-285, 1998.

GORDON, L.; PILOSO, A. M. R. Application of high-intensity ultrasounds to control the size of whey proteins particles. **Food Biophysics**, v. 5, p. 203-210, 2010.

GRINBERG, V.YA., TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v.11, p.145-158, 1997.

GUZEY, D.; McCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Adv Colloid Interface Sci** v.128–130, p.227–248, 2006.

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; McCLEMENTS, D. J. Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**. v. 20, p. 577-585, 2006a.

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; MCCLEMENTS, D. J. Stabilization of Model Beverage Cloud Emulsions Using Protein-Polysaccharide Electrostatic Complexes Formed at the Oil-Water Interface. **J. Agric. Food Chem**, v.54, p. 5540-5547, 2006b.

HILL, S.E. Emulsions. In G.M.Hall, **Methods of testing protein functionality**, New York: Blackie, 1996.

HOFFMANN, M. A. M.; VAN MIL, P. J. J. M. Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2942-2948, 1997.

HOSSEINI, S. M. H.; DJOMEH, Z. E.; RAZAVI, S. H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; SABOURY, A. A.; ATRI, M. S.; MEEREN, P. V. β -Lactoglobulin-sodium alginate interaction as affected by polysaccharide depolymerization using high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 235-244, 2013.

HSIEH, T.-T.; TIU, C.; SIMON, G. P.; WU, R.Y. Rheology and miscibility of thermotropic liquid crystalline polymer blends. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**. 86 p. 15-35, 1999.

HU, H.; CHEUNG, I.W.Y.; PAN, S.; LI-CHAN, E. C. Y. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean b-conglycinin and glycinin. **Food Hydrocolloids**, v.45, p. 102-110, 2015.

HU, H.; WU, J.; LI-CHAN, E. C. Y.; ZHU, L.; ZHANG, F.; XU, X.; FAN, G.; WANG, L.; HUANG, X.; PAN, S. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. **Food Hydrocolloids** v.30, p. 647-655, 2013.

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

IQBAL S.; HAMEED, G.; BALOCH, M. K.; MCCLEMENTS, D. J. Structuring of lipid phases using controlled heteroaggregation of protein microspheres in water-in-oil emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 115 (3) p. 314–321, 2013.

JABEEN, S.; MASWAL, M.; CHAT, O. A.; RATHER, G. M.; DAR, A. A. Rheological behavior and Ibuprofen delivery applications of pH responsive composite alginate hydrogels **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.139, p. 211–218, 2016.

JAMBRAK, A. R.; LELAS, V.; MASON, T. J.; KREŠIĆ, G.; BADANJAK, M. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. **Journal of Food Engineering**, v.93, p. 386–393, 2009.

JAMBRAK, A.R.; MASON, T.J.; LELAS, V.; KRESIC, G. Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. **LWT – Food Science and Technology** , v. 43, p. 254–262, 2010.

JARAMILLO, D. P.; ROBERTS, R. F.; COUPLAND, J.N. Effect of pH on the properties of soy protein-pectin complexes. **Food Research International**, v. 44, p. 911-916, 2011.

JARVIS, M. C. Plant cell walls: Supramolecular assemblies. **Food Hydrocolloids**, v.25 (2), p.257–262, 2011.

JENA, S.; DAS, H. Modeling of particle size distribution of sonicated coconut milk emulsion: effect of emulsifiers and sonication time. **Food Research International**, v.39, p.606–611, 2006.

JONES, O. G.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23(5), p. 1312–1321, 2009.

JONES, O. G.; LESMES, U.; DUBIN, P.; MCCLEMENTS, D. J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. **Food Hydrocolloids**. v.24 (4) 374–383, 2010.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer nanoparticles from heat-treated electrostatic protein-polysaccharide complexes: Factors affecting particle characteristics. **Journal of Food Science**, 75, N36–N43, 2010b.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 374-397, 2010a.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167 p. 49-62, 2011.

JONES, O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Thermal analysis of b-lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. **Food Hydrocolloids**, v.24, p.239–248, 2010.

JOURDAIN, L.; LESER, M.E.; SCHMITT, C.; MICHEL, M.; DICKINSON, E. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulphate: relationship to complexation. **Food Hydrocolloids** v.22, p. 647–659, 2008.

KAL TSA, O.; MICHON, C.; YANNIOTIS, S.; MANDALA, I. Ultrasonic energy input influence on the production of sub-micron o/w emulsions containing whey protein and common stabilizers. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 881-891, 2013.

KAL TSA, O.; PAXIMADA, P.; MANDALA, I.; SCHOLTEN, E. Physical characteristics of submicron emulsions upon partial displacement of whey protein by a small molecular weight surfactant and pectin addition. **Food Research International**, v.66, p. 401–408, 2014.

KAZMIERSKI, M.; WICKER, K.; CORREDIG, M. Interactions of β -Lactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. **Journal of Food Science**, v.68, p. 1673–1679, 2003.

KELLY, R.; GUDO, E.S.; MITCHELL, J.R.; HARDING, S.E. Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with alginate and a pectin. **Carbohydrate Polymer**, v.23, p.115-120, 1994.

KINSELA, J. E.; Functional Properties of Soy Proteins, **Journal of American Oil Chemistry Society**, V. 56, 242-258, 1979.

KITABATAKE, N.; TAHARA, M.; DOI, E. Thermal Denaturation of Soybean Protein at Low Water Contents, **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54(9), p. 2205–2212, 1990.

KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, v.33 (2), p. 295-300, 2010.

KRESIC, G.; LELAS, V.; JAMBRAK, A. R.; HERCEG, Z.; BRNIC, S. R. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. **Science Direct**, v. 87, p. 64-73, 2008.

KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. **Advances Protein Chemistry**, v. 38, p. 181-364, 1986.

KUHN, K. R.; PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Food Gels (pp. 111-144). In: Telis, V. R. N. (Ed.), Biopolymer engineering in food processing. CRC Press: New York, US., 398 pp., 2012.

KUHN, K.R.; CUNHA, R.L. Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*. v. 111 (2), p. 449–457, 2012.

KUMAR, R.; CHOUDHARY V.; MISHRA S.; VARMA I.K., MATTIASSON B.; Adhesives and Plastics Based on Soy Protein Products, **Industrial Crops and Products**, v. 16, p. 155-172, 2002.

KUNERT, R. **Processamento primário de petróleo**. Universidade Petrobras, Escola de Ciências e Tecnologias E&P, 54p. 2007.

KYOMUGASHO, C.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E.; FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices **Food Chemistry**, v.176, p.82–90, 2015.

LAKEMON, C. M. M.; DE JOUNG, H. H. J.; HESSING, M.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 (6) p.1985–1990, 2000.

LAM, M.; PAULSEN, P.; CORREDIG, M. Interactions of soy protein fractions with high-methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4726-4735, 2008.

LAM, M.; SHEN, R.; PAULSEN, P.; CORREDIG, M. Pectin stabilization of soy protein isolates at low pH. **Science Direct**, v. 40, p. 101-110, 2007.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.F.; LEHR, C.M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for $\dot{U} - 3$ unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **Journal of Microencapsulation**, v.18, n.3, p.347-357, 2001.

LAMPRECHT, A.; SHÄFER, U.F.; LEHR, C.-M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 1 - 9, 2000.

LANEUVILLE, S.I., PAQUIN, P., TURGEON, S.L. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.305-314, 2000.

LE HÉNAFF, S. Microparticules de complexes de protéines de lactosérum et de xanthane comme substitut de matière grasse. Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec, 1996.

LEE, S. H.; LEFEVRE, T.; SUBIRADE, M.; PAQUIN, P. Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. **Food Chemistry**, v.113, p.191–195, 2009

LERTSUTTHIWONG, P. et al. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 209-214, 2008.

LI, K.; ZHONG, Q. Aggregation and gelation properties of preheated whey protein and pectin mixtures at pH 1.0-4.0. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 11-20, 2016.

LITTOZ, F.; McCLEMENTS, D. J. Biomimetic approach to improving emulsion stability: crosslinking adsorbed beet pectin layers using lacasse. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.1203–1211, 2008.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. An Aspen Ed. Maryland (USA), 477p. 1999.

LU, Y.; RIYANTO, N.; WEAVERS, L. K. Sonolysis of synthetic sediment particles: particle characteristics affecting particle dissolution and size reduction **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9(4), p. 181–188, 2002.

LY, M. H.; AGUEDO, M.; GOUDOT, S.; LE, M. E.; CAYOT, P.; TEIXEIRA, J.A.; LE, T.M; BELIN, J.M; WACHE, Y. Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.742-751, 2008.

MADADLOU, A.; MOUSAVI, M. E.; EMAM-DJOMEH, Z.; EHSANI, M.; SHEEHAN, D. Comparison of pH-dependent sonodisruption of re-assembled casein micelles by 35 and 130 kHz ultrasounds. **Journal of Food Engineering**, v.95, p. 505-509, 2009.

MAHENDRAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G.O; AL-ASSAF, S. Soluble polysaccharide–protein complexes as novel emulsifiers. **Foods Food Ing J Jpn** v. 213, p. 271–274, 2008.

MALTAIS, A.; REMONDETTO, G. E.; GONZALEZ, R.; SUBIRADE, M. Formation of soy protein isolate cold-set gels: Protein and salt effects. **Journal of Food Science** v.70, p. C67-C73, 2005.

MANION, B.; CORREDIG, M. Interactions between Whey Protein Isolate and Soy Protein Fractions at Oil–Water Interfaces: Effects of Heat and Concentration of Protein in the Aqueous Phase. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 8, p. 343-349, 2006.

MAO, Y.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication of viscous and paste-like materials by controlled heteroaggregation of oppositely charged lipid droplets. **Food Chemistry**, v. 134, p. 872-879, 2012.

MARFIL, P. H. M. **Estudo reológico de sistemas gelatina/colágeno/amido para obtenção de géis e aplicação dietéticas de gelatina**. 2010. Dissertação para obtenção do título de mestre IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 127p.

MARFIL, P. H. M. **Microencapsulação de óleo de palma por coacervação complexa em matrizes de gelatina/goma arábica e gelatina/alginato**. 2014. Tese apresentada para obtenção do título de doutor IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 135p.

MARFIL, P. H. M.; TELIS-ROMERO, J.; TELIS, V. R. N. Rheological Behavior of Biopolymer Suspensions in: TELIS, V. R. N (Ed.). **Biopolymer Engineering in Food Processing**, CRC Press, USA, p.69-110, 2012.

MARTINI, S.; POTTER, R.; WALSH, M.K. Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions. **Food Research International**, v. 43, p.2444–2451, 2010.

MASON, T. J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.3, n.3, p.S253-S260, 1996.

McCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. CRC series in contemporary food science. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press; 2004.

McCLEMENTS, D. J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, 24, p. 621–625, 2006.

McCLEMENTS, D. J. Theoretical Analysis of Factors Affecting the Formation and Stability of Multilayered Colloidal Dispersions, **Langmuir**, v. 21(21), p. 9777-9785, 2005b.

McCLEMENTS, D.J. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.173-177, 2000.

McCLEMENTS, D.J. Food emulsions. Boca Raton: CRC Press; 111–124, 1999b.

McCLEMENTS, D.J. Food emulsions. Boca Raton: CRC Press; 226–229, 1999a.

McCLEMENTS, D.J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. Washington: CRC Press, 2005a.

McCLEMENTS, D. J. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47 (7), p.611–649, 2007.

MCKENNA, B.M., LYNG, J.G. Introduction to food rheology and its measurements. In: **Texture in Food, Volume 1: Semi-solid foods**, McKenna, B.M., Ed, CRC Press, Boca Raton, cap. 6, 2003.

MEINDERS, M. B. J.; VAN VLIET, T. The role interfacial rheological properties on Ostwald ripening in emulsions. **Advances Colloid Interface Science.**, v.108-109, p.119-126, 2004.

MISHRA, S., MANN, B., JOSHI, V.K. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. **Food Hydrocolloids** v.15, p. 9-15, 2001.

MOHAMMADI, A.; JAFARIA, S. M.; ASSADPOURC, E.; FARIDI ESFANJAN, F. Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC–pectin complexes and evaluating their release rate. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 82, p.816–822, 2016.

MONGENOT, N.; CHARRIER, S.; CHALIER, P. Effect of ultrasound emulsification on cheese aroma encapsulation by carbohydrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 861–867, 2000.

MONTALVO, M. E. D.A. Escoamento de emulsões em água através de micro-capilares. In: Montalvo, M. E. D.A.; Basante, V. A.; Carvalho M. S. (Eds.) **Análise experimental do escoamento de emulsões óleo em água através de micro-capilares com garganta**. (PUC, Rio de Janeiro), p.25-39, 2008.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre, , Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 158p.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, reagentes e solventes**. Blucher: 2º Ed. 2007, 724p.

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

- MORRIS, V.J. Gelation of polysaccharides, in: Hill, S.E. D.A. Ledward, J.R. Mitchell (Eds.), **Functional Properties of Food Macromolecules**, second ed., Aspen Publishers, Inc., Maryland, p. 143–226. 1998.
- MOSCHAKIS, T.; MURRAY, B.S.; DICKINSON, E. Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilized by sodium caseinate and xanthan gum. **Journal Colloid Interface Science**, v. 284, p.714–728, 2005.
- MU, L.; ZHAO, M.; YANG, B.; ZHAO, H.; CUI, C.; ZHAO, Q. Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4494–4499, 2010.
- MUKAI-CORREA, R. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe: Estudos em Sistema-Modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e Testes *in vivo***. 2008. Dissertação para obtenção do título de doutor, Universidade de Campinas, Campinas, SP. 151 p.
- NAGANO, T.; AKASAKA, T.; NISHINARI, K. Dynamic viscoelastic properties of glycinin and beta-conglycinin gels from soybeans. **Biopolymers**, v. 34(10), p. 1303–1309, 1994.
- NAGANO, T.; MORI, H.; NISHINARI, K. Effect of heating and cooling on the gelation kinetics of 7S globulin from soybeans **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 42(7), p.1415–1419, 1994.
- NEHIR EL, S.; SIMSEK, S. Food technological applications for optimal nutrition: An overview of opportunities for the food industry. **Institute of Food Technologists**, v. 11, p. 2–12, 2011.
- NEIRINCK, N.; VAN DER MEEREN, P.; LUKASZEWICZ-LAUSECKER, M.; COCQUYT, J.; VERBEKEN, D.; DEWETTINCK, K. Influence of pH and biopolymer ratio on whey protein–pectin interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 298 (1-2), 99–107, 2007.
- NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C. [beta]-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1945–1962, 2011.
- NINDO, C. I.; Tanga, J.; Powers, J. R.; Takhar, P. S. Rheological properties of blueberry puree for processing applications. **LWT**, v. 40, (1), p. 292–299, 2007.
- NISHINARI, K.; FANG, S.; GUO, Y.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification, **Food Hydrocolloids**, v.39, 301–318, 2014.

NOELLO, C.; CARVALHO, A. G. S.; SILVA, V. M.; HUBINGER, M. D. Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition, **Food Research International**, v. 89, p. 549–557, 2016.

NOGUEIRA, G. F. **Produção e caracterização de micropartículas com multicamadas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática**. 2013. Dissertação para obtenção do título de Mestre, Universidade de Campinas, Campinas, SP, 173 p.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, p. 429-435, 2011.

NORTON, I. T.; FRITH, W. J. Microstructure design in mixed biopolymer composites. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 543-553, 2001.

NUSSINOVITCH, A. **Hydro colloids applications. Gum technology in the food and other industries**. London: Chapman & Hall, 1997.

OLIVEIRA, C. P.; **Propriedades reológicas e estabilidade de emulsões obtidas por interações eletrostáticas entre isolado proteico de soja e alginato de sódio com aplicação de ultrassom**. 2016. Relatório final em nível de iniciação IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 60p.

ONSØYEN, E. Alginates. In Imeson, A. (ed.), **Tchikening and gelling agents for food**, pp. 45-59. New York: Aspen Publishers, 1999.

ORTEGA, F. S., PILEGGI R. G., PANDOLFELLI, V. C. Análise da relação entre distância de separação entre partículas (IPS) e viscosidade de suspensões. **Cerâmica**, v. 45(295), p. 155-159 1999.

ORTIZ, S.E.M.; MAURI, A., MONTERREY-QUINTERO, E.S.; TRINDADE, M.A.; SANTANA, A.S.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 919–923, 2009.

OSPINA-E, J. C.; SIERRA-C, A.; OCHOA, O.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Substitution of Saturated Fat in Processed Meat Products: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p.113–122, 2012.

PAL, R.; YAN, Y.; MASLIYAH, J. Rheology of Emulsions In: SCHRAMM, L.L. **Emulsions – Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry**. Washington DC: American Chemical Society, 428p. p.131-170, 1992.

PAN, H.; XU, X.; TIANA, Y.; JIAO, A.; JIANG, B.; CHEN, J.; JIN, Z. Impact of phase separation of soy protein isolate/sodium alginate co-blending mixtures on gelation dynamics and gels properties. **Carbohydrate Polymers**, vol. 125, p. 169-179, 2015.

PATIST, A., BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.9, n.2, p.147-154, 2008.

PEARSON, A.M. Soy proteins. In: HUDSON, B.J.F. **Developments in food proteins** – 2 London: Appllied Science Publishier LTD, v. 1, cap.2, p. 339, 1983.

PEREZ, A. A.; SÁNCHEZ, C. C.; PATINO, J. M. R.; RUBIOLO, A. C.; SANTIAGO, L. G. Surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air–water interface saturation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.85. p. 306-315, 2011.

PEREZ, A.A.; CARRARA, C.R.; CARRERA, C.; SANTIAGO, L.G., RODRÍGUEZ PATINO, J.M. Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. **Food Hydrocolloids**, v.23, p. 1253-1262, 2009.

PEREZ, A.A.; CARRARA, C.R.; CARRERA, C.; SANTIAGO, L.G.; RODRÍGUEZ PATINO, J.M., Interfacial and Foaming Characteristics of Milk Whey Protein and Polysaccharide Mixed Systems. **AIChE J.**, v.56, p.1107-1117, 2010b.

PEREZ, A.A.; CARRARA, C.R.; SANCHES, C. C.; RODRÍGUEZ PATINO, J.M.; SANTIAGO, L.G. Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. **Food Chemistry**, v. 116 (1), p. 104–113, 2009a.

PEREZ, A.A.; CARRERA, C.; RODRÍGUEZ PATINO, J.M.; RUBIOL, A.C.; SANTIAGO, L.G. Milk whey proteins and xanthan gum interactions in solution and at the air–water interface: A rheokinetic study. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v.81, p.50-57, 2010a.

PERRECHIL, F. A. **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**. 2008. Dissertação para obtenção do título de mestre, Universidade de Campinas, Campinas, SP. 137p.

PERRECHIL, F.A.; CUNHA, R.L. 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 (4), p. 441–448, 2010.

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

- PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Introduction to food proteins. In: Phillips GO, WilliamsPA, editors. **Handbook of food proteins**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.. p. 1–12, 2001.
- PIAZZA, L.; DURR-AUSTER, N.; GIGLI, J.; WINDHAB, E. J.; FISCHER, P. Interfacial rheology of soy proteins – high methoxyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, v.23, p. 2125-2131, 2009.
- PINGRET, D., FABIANO-TIXIER, A.-S., PETITCOLAS, E., CANSÉLIER, J.-P., CHEMAT, F. First investigation on ultrasound-assisted preparation of food products: sensory and physicochemical characteristics. **Journal of Food Science**, v.76, n.2, C287-C292, 2011.
- PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A. S. A.; CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, v. 31, p. 593-606, 2013.
- PINHEIRO, M. V. S.; PENA, A. L. B. Substitutos de gordura: Tipos e aplicações em produtos lácteos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 175-186, 2004.
- PIRIYAPRASARTH, S.; JUTTULAPA, M.; SRIAMORNSAK, P. Stability of rice bran oil-in-water emulsions stabilized by pectin-zeincomplexes: Effect of composition and order of mixing. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 589-598, 2016.
- PONGSAWATMANIT, R. HARNSILAWAT, T. McCLEMENTS, D. J. Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by α -lactoglobulin. **Science Direct**, v. 287, p. 59-67, 2006.
- PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. 2006. Tese apresentada para obtenção título de Doutor, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 267p.
- PUPPO, C.; CHAPLEAU, N.; SPERONI, F.; LAMBALLERIE-ANTON, M. DE.; MICHEL, F.; AÑON, C.; ANTON, M. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean proteins isolates. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.52(6), p. 1564-1571, 2004.
- PURWANTI, N.; SMIDDY, M.; JAN VAN DER GOOT, A.; DE VRIES, R.; ALTING, A.; BOOM, R. Modulation of rheological properties by heat-induced aggregation of whey protein solution. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1482-1489, 2011.
- QI, P. X.; REN, D.; XIAO, Y.; TOMASULA, P. M. Effect of homogenization and pasteurization on the structure and stability of whey protein in milk, **J Dairy Sci**. v. 98, p. 2884–2897, 2015.

RALET, M. C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAUT, J. F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. **Carbohydrate Research**, v. 336, p. 117-125, 2001.

RAO, M. A. R. **Rheology of fluid and semisolid foods**, ed. Aspen Publication, Gaithersburg Maryland, 433 p.1999.

RAO, M. A. Rheology of liquid foods - A review. **Journal of Texture Studies**, v. 8, p. 135-168, 1977.

RELKIN, P.; LAUNAY, B.; LIU, T.-X. Heat- and cold-setting of β -lactoglobulin solutions. A DSC and TEM study. **Thermochimica Acta**, v. 308, p. 69-74, 1998.

RENARD, D.; VAN DE VELDE, F.; VISSCHERS, R. W. The gap between food gel structure, texture and perception. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p.423-431, 2006.

RENARD, R.; LEFEBVRE, J.; BOUÉ, F. Solution and Gelation Properties of Protein-Polysaccharide Mixtures: Signature by Small-Angle Neutron Scattering and Rheology (pp.189–201). In: Williams, P. A.; Philips, G. O. (Eds.), **Gums and Stabilisers for the Food Industry** 9, 433 pp. 1998.

RENKEMA, J. M. S., GRUPPEN, H., VAN VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6064– 6071, 2002.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. **Química de Alimentos**, Blucher, Mauá, 2007.

RU, Q.; WANG, Y.; LEEB, J.; DING, Y.; HUANG, Q. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio, **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 838– 846, 2012.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food- grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v.43, p. 547-556, 2015.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Formulation of antimicrobial edible nanoemulsions with pseudo-ternary phase experimental design. **Food and Bioprocess Technology**, v.7 (10), p.3022-3032, 2014.

SANTANA, R. C. **Emulsões estabilizadas por colágeno: efeito da hidrólise térmica e do processo de homogeneização**. 2009. Dissertação para obtenção do título de Mestre, Universidade de Campinas, Campinas, SP. 129p.

SANTIPANICHWONG, R.; SUPHANTHARIKA, M.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Core-Shell Biopolymer Nanoparticles Produced by Electrostatic Deposition of Beet Pectin onto Heat-Denatured β -Lactoglobulin Aggregates. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. N23-N30, 2008.

SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 808-816, 2012.

SCHMELZ, T.; LESMES, U.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Modulation of physicochemical properties of lipid droplets using b-lactoglobulin and/or lactoferrin interfacial coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 25 (5), p.1181-1189, 2011.

SCHMIDT, U. S.; SCHMIDT, K.; KURZ, T.; ENDREß, H-U.; SCHUCHMANN, H. P. Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 59-66, 2015.

SCHMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, p. 25-31, 2005.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C., DESOBRY-BANON, S., HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between b-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v.13, p. 483-496, 1999.

SCHMITT, C.; TURGEON, S. L., Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, p. 63-70, 2011.

SEJERSEN, M. T.; SALOMONSEN, T.; IPSEN, R.; CLARK, R.; ROLIN, C.; ENGELSEN, S.B. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. **Int Dairy J. In Press**, 2006.

SEMENOVA, M.G.; BOLOTINA, V.S.; DMITROCHENKO, A.P.; LEONTIEV, A.L.; POLYAKOV, V.I.; BRAUDO, E.E.; TOLSTOGUZOV, V.B. The factors affecting the compatibility of serum albumin and pectinate in aqueous medium. **Carbohydrate Polymers**, v.15, n.4, p. 367-385, 1991.

SESSLER, T.; WEISS, J.; VODOVOTZ, Y. Influence of pH and soy protein isolate addition on the physicochemical properties of functional grape pectin confections. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 294-302, 2013.

SHIH, X.; CARUSO, F. Release Behavior of Thin-Walled Microcapsules Composed of Polyelectrolyte Multilayers. **Langmuir**, v. 17, p. 2036-2042, 2001.

SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FIGUEIREDO, I. V.; GONCALVES, A. R.; VEIGA, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, p. 1-10, 2006.

SIMO, O. K.; MAO, Y.; TOKLE, T.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Novel strategies for fabricating reduced fat foods: Heteroaggregation of lipid droplets with polysaccharides. **Food Research International**, v. 48, p. 337-345, 2012.

SIMSEK-EGE, F. A.; GILLIAN, M.; BOND, G. M.; STRINGER, J. Polyelectrolyte Complex Formation between Alginate and Chitosan as a Function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, p. 346-351, 2003.

SINGH, M.; MOHAMED, A. Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 353-360, 2007.

SINGH, O. N.; BURGESS, D. J. Characterisation of albumin-alginic acid complex coacervation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, p. 670-673, 1989.

SINGH, P.; KUMAR, R.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Functional and edible uses of soy protein products. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 7 (1), 14-28, 2008.

SITTIKIYOTHIN, W.; SAMPAIO, P.; GONÇALVES, M. P. Heat-induced gelation of β -lactoglobulin at varying pH: Effect of tara gum on the rheological and structural properties of the gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1046-1055, 2007.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano emulsions. *Current Opinion. Colloid & Interface Science*, v. 10 (3-4), p. 102-110, 2005.

SOSA-HERRERA, M. G.; LOZANO-ESQUIVEL, I. E.; PONCE DE LEÓN-RAMÍREZ, Y. R.; MARTÍNEZ-PADILLA, L. P. Effect of added calcium chloride on the physicochemical and rheological properties of aqueous mixtures of sodium caseinate/sodium alginate and respective oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 175-184, 2012.

SOUZA, A. S. de. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados proteicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2000. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre (Universidade de Campinas, Campinas, 108 p.

SOUZA, F. N.; CORDEIRO, C. G. M. S.; RIBEIRO, M. C. E., CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International** v. 49, p. 560-566, 2012.

SPAGNUOLO, P.A., DALGLEISH, D.G., GOFF, H.D., MORRIS, E.R. Kapa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.371-377, 2005.

SPERBER, B. L. H. M.; SCHOLS, H. A.; STUART, C.; NORDE, W.; VORAGEN, A. G. J. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, 23, p. 765–772, 2009.

STAINSBY, G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. **Food Chemistry**. v. 6, p.3-14, 1980.

STEFFE, F. L. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, Freeman Press, East Lansing, 418 p. 1996.

STOKKE, B. T.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; YUGUCHI, Y.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. Ca-alginate gels. **Macromolecules**, v. 33(5), p.1853-1863, 2000.

STONE, A.K.; TEYMUROVA, A.; NICKERSON, M. T. Formation and Functional Attributes of Canola Protein Isolate—Gum Arabic Electrostatic Complexes. **Food Biophysics**, v. 9 (3), p. 203–212, 2014.

SYNYTSYA, A.; COPIKOVA, J., MATEJKA, P., MACHOVIC, V. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.97–106, 2003.

TADROS, F.T. **Emulsion Science and Technology**, first ed., Wiley-VCH, Weinheim, Chapter 1, 2009.

TAKEITI, C. Y.; SOUZA, A. S.; NETTO, F. M. Influência do tratamento térmico nas propriedades de solubilidade e de emulsificação de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7(1), p. 87-101, 2004.

TAN, M.C.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. A.; TAIPA, F. S.; ABDULLAH, J. Characterisation of improved foam aeration and rheological properties of ultrasonically treated whey protein suspension. **International Dairy Journal**, v.43, p.7-14, 2015.

TANG, C-H., MA, C-Y. Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.606–611, 2009.

TELIS, V. R. N. **Biopolymer engineering in food processing**. CRC Press: New York, US., 398 pp., 2012.

THIES, C. How to Make Microcapsules Lecture and Laboratory Manual. St. Louis, Missouri, Cap 2, p.28-31,1995.

TOLSTOGUZOV, V. Composition and phase diagrams for aqueous systems based on proteins and polysaccharides. **International Reviews of Cytology – A Survey of Cell Biology**, v.192, p.3-31, 1999.

TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 1-23, 2003.

TÖMÖSKÖZI, S.; LÁSZTITY, R.; HARASZI, R. BATICZ, O. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. **Nahrung**, Berlim, v. 45, n. 6, p. 399-401, 2001.

TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. **Food Research International**, v.44 (1), p. 282–289, 2011.

TORREZAN, R.. **Efeitos do processamento à alta pressão nas propriedades funcionais da proteína de soja e suas misturas com polissacarídeos**. 2007. Dissertação para obtenção do título de Doutor, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 311p.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 589-601, 2002.

TRAN, T.; ROUSSEAU, D. Stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**. v.30 (1), p.382-392, 2013.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio**. 2007. Dissertação para obtenção do título de mestre, Universidade de Campinas, Campinas, SP. 126p.

TURGEON, S. L., GAUTHIER, S. F., MOLLÉ, D., LÉONIL, J. Interfacial properties of tryptic peptides of β -lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 669-675, 1992.

TURGEON, S. L., SCHMITT, C., SANCHEZ, C. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), 166–178, 2007.

TURQUOIS, T.; RINAUDO, M.; TARAVEL, F.R.; HEYRAUD, A. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.255-262, 1999.

UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington, 1997.

VAN DER GOOT, A. J.; PEIGHAMBARDOUST, S. H.; AKKERMANS, C.; van OOSTEN-MANSKI, J. M. Creating novel structures in food materials: the role of well-defined shear flow. **Food Biophysics**, v.3, p.120-125, 2008.

VAN VLIET, T.; MARTIN, A.H.; BOS, M. A. Gelation and interfacial behavior of vegetable proteins. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.7, p. 462-468, 2002.

VIDAL, J. R. M. B. **Comportamento reológico da polpa de manga (*Mangífera indica* LKeitt)**. 2000. Tese apresentada para obtenção do título de doutor Universidade de Campinas, Campinas,) 159p.

VODJANI, F. Solubility. In: Hall, G. M. **Methods of testing protein functionality**. 1.ed. London: Chapman e Hall, p. 11-60, 1996.

WALKENSTROM, P.; HERMANSON, A. M. Mixed gels of gelatin and whey proteins, formed by combining temperature and high pressure. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 457- 470, 1997.

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

WALSTRA, P. Principles of emulsion formation. **Chemical Engineering Science**, v. 48(2), p. 333-349, 1993.

WANG, Q.; QVIST, K. B. Investigation of the composite system of β -lactoglobulin and pectin in aqueous solutions. **Food Research International**, v.33, p.683–690, 2000.

WANG, Z.; SUN, X.X.; LIAN, Z. X., WANG, X. X.; ZHOU, J. MA, Z. S. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the properties of soy protein isolate/microcrystalline wheat-bran cellulose film. **Journal of Food Engineering**, v.114, p.183–191, 2013.

WEINBRECK, F. DE VRIES, R. SCHROOYEN P., DE KRUIF C. G., Complex coacervation of whey proteins and gum arabic, **Biomacromolecules**, v.4, n.2, p. 293– 303, 2003.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers**, v. 9, p. 667–679, 2004.

WEINBRECK, F.; WIENTJES, R. H. W.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. G. Rheological properties of whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal of Rheology**, v. 48, p. 1215–1228, 2004.

WEINBRECK, F.; WIENTJES, R.H.W. Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates, **Journal of Rheology**, v. 48, p.1215– 1228, 2004.

WILLIAMS, P. A.; SAYERS, C.; VIEBKE, C.; SENAN, C.; MAZOYER, J.; BOULENGER, P. Elucidation of the emulsification properties of sugar beet pectin. **J Agric Food Chem** v. 53, p.3592–3597, 2005.

WINDHAB, E.J.; DRESSLER, M.; FEIGL, K.; FISCHER, P.; MEGIAS-ALGUACIL, D. Emulsion processing—from single-drop deformation to design of complex processes and products. **Chemical Engineering Science**, v. 60 p. 2101–2113, 2005.

WONG, D.W.S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoria**. Zaragoza: Acribia, 446p. 1995.

WOODWARD, N. C.; GUNNING, A. P.; WILDE, P. J.; CHU, B. S.; MORRIS, V. J. Engineering interfacial structures to moderate satiety. In: Phillips GO, Williams PA, editors. **Gums and stabilisers for the food industry**, 15. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishers. p. 367–76, 2010.

XIANG, N.; LYU, Y.; NARSIMHAN, G. Characterization of fish oil in water emulsion produced by layer by layer deposition of soy b-conglycinin and high methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v.52, p. 678–689, 2016.

XIAO, Q.; GU, X.; TAN, S. Drying process of sodium alginate films studied by two-dimensional correlation ATR-FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 164, p. 179–184, 2014.

YANG, Y.; CUI, W. S.; GONG, J.; GUO, Q.; WANG, Q.; HUA, Y. A soy protein-polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p.155–164, 2015.

YASUMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S.; MASARU, M.; TODA, J.; WADA, T.; ISHII, K. Whipping and emulsifying properties of soy bean products. **Agricultural Biological Chemistry**, v.36, (5), p.719–727, 1972.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications – A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n.3, p.406–415, 2008

YIN, B.; DENG, W.; XU, K.; HUANG, L.; YAO, P. Stable nano-sized emulsions produced from soy protein and soy polysaccharide complexes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 380, p. 51-59, 2012.

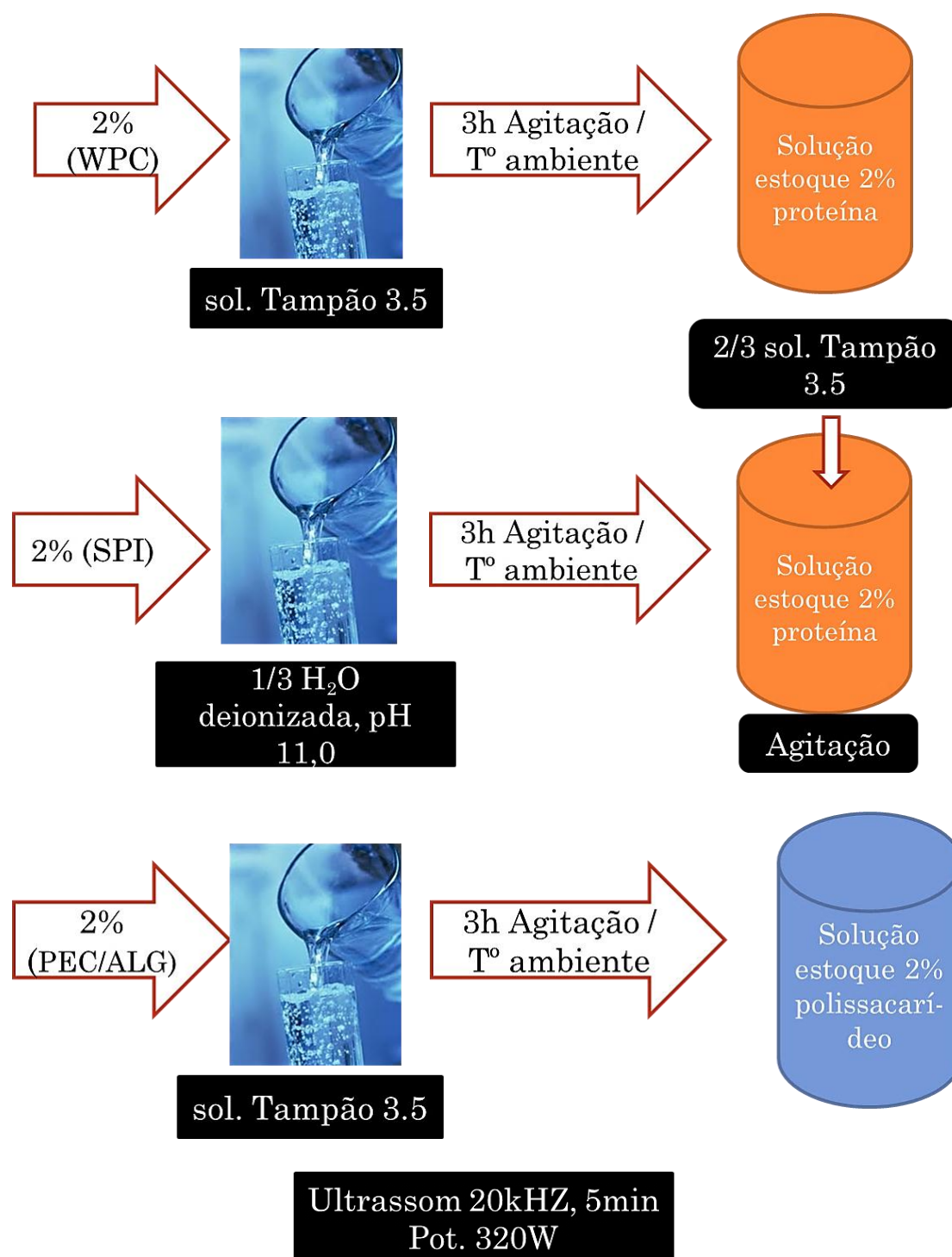
YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P. S.; LEE, H. G. Microencapsulation of alphasitosterol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, p. 25–30, 2006.

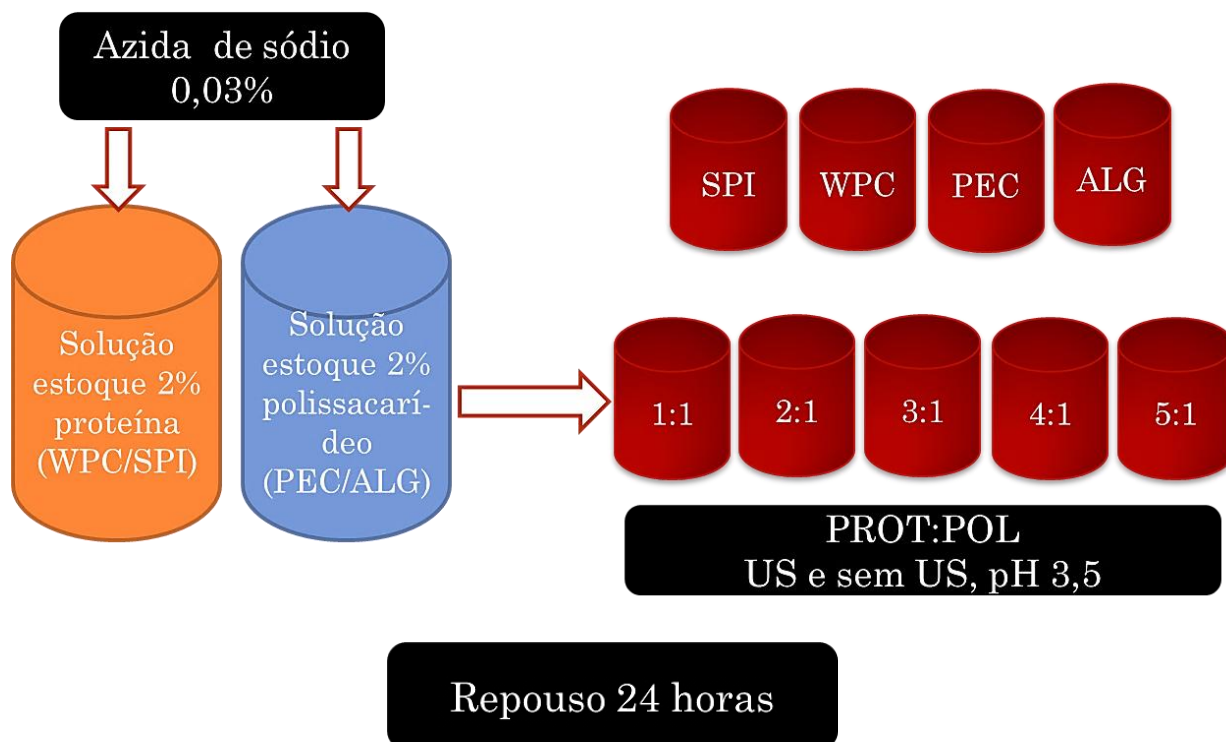
ZHANG, Y.; LI, D.; WANG, L.J.; ADHIKARI, B. Rheological and Microstructural Characteristics of Thermally Produced Flaxseed Gum–Whey Protein Isolate Mixed Solutions and Gels. **Drying Technology**: v.31, p. 1635–1642, 2013.

ZISU, B.; BHASKARACHARYA, R.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, p.1075–1081, 2010.

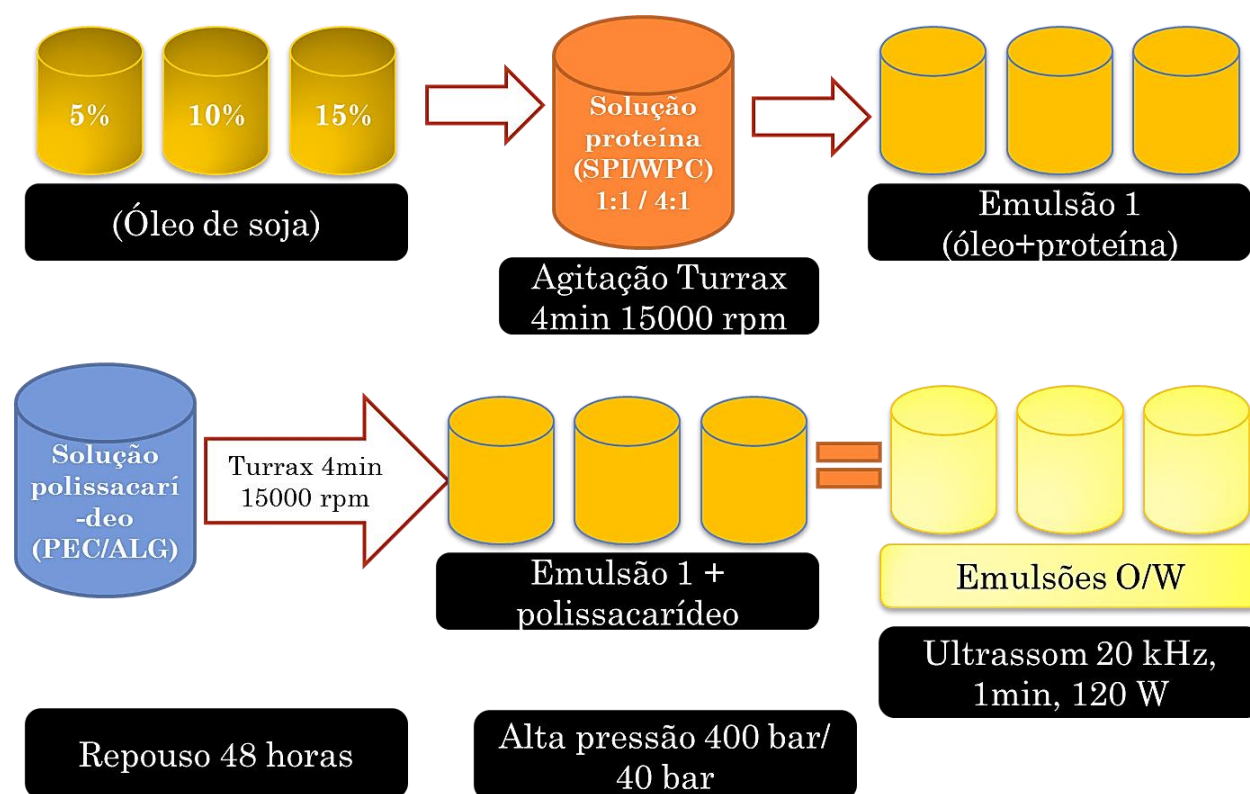
APÊNDICES

APÊNDICE A – Fluxograma do preparo das soluções estoque



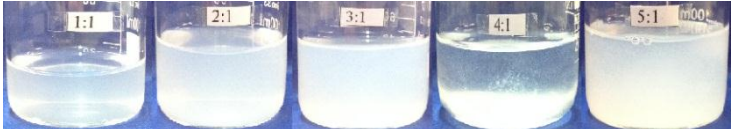
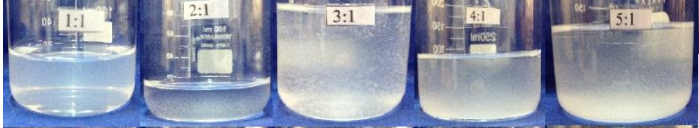
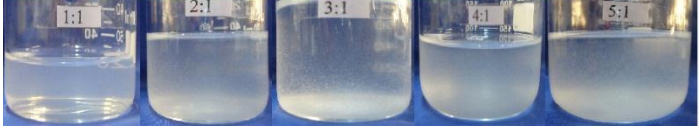
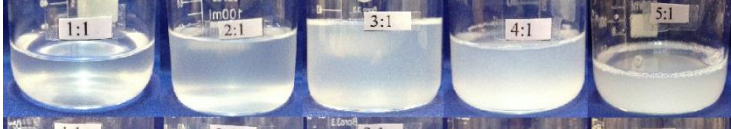
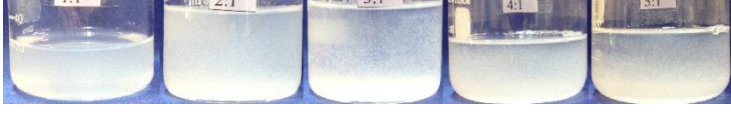
APÊNDICE B– Fluxograma do preparo das suspensões em diferentes proporções de biopolímeros

APÊNDICE C – Fluxograma do preparo das emulsões



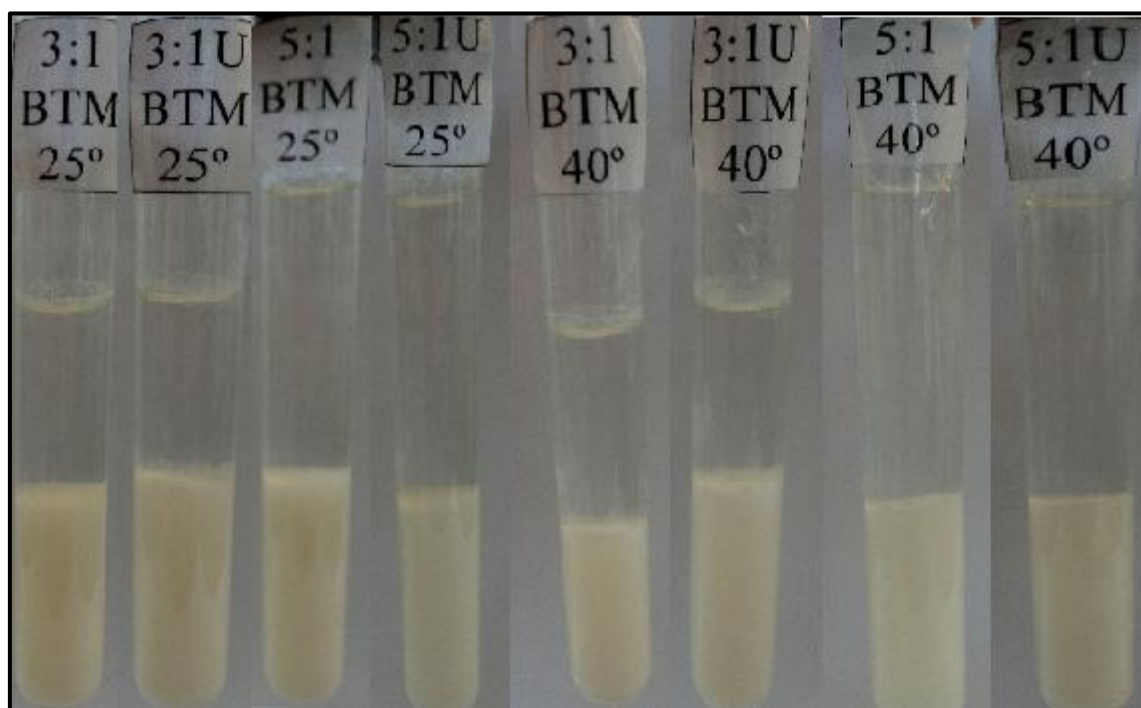
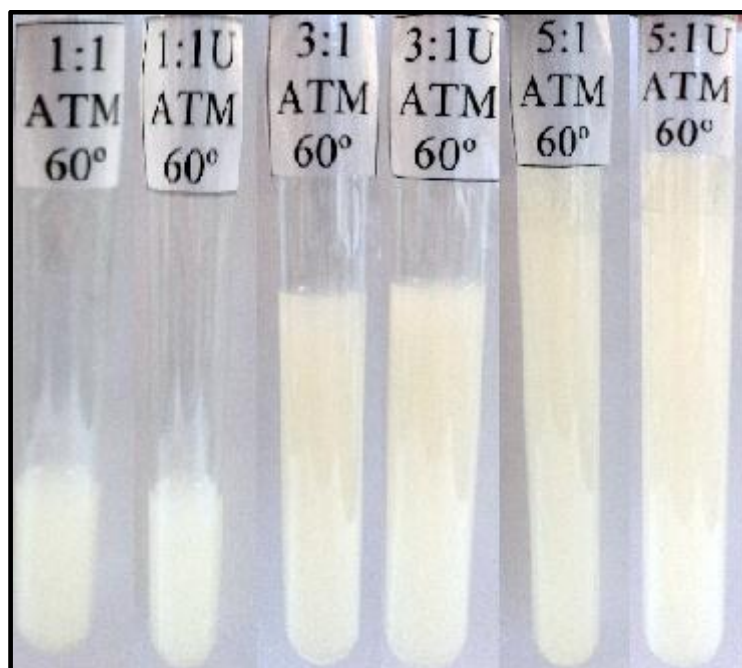
APÊNDICE D

Avaliação visual das amostras submetidas à leitura de absorbância com e sem aplicação de US no pH 3,5.

	Proteína: Polissacarídeo
	WPC:ALG
Sem ultrassom	
Com ultrassom	
	WPC:PEC
Sem ultrassom	
Com ultrassom	
	SPI:ALG
Sem ultrassom	
Com ultrassom	
	SPI:PEC
Sem ultrassom	
Com ultrassom	

APÊNDICE E

Avaliação visual das amostras preparadas no pH3,5 com pectina de alto teor de metoxilação (ATM) a 60°C e baixo teor de metoxilação (BTM) a 25 e 40°C submetidas ou não ao tratamento com ultrassom (U)



APÊNDICE F: Valores de viscosidade (μ), do índice de consistência (K), índice de comportamento (n) e coeficiente de determinação (R^2) na temperatura de 25 °C para os diferentes pares de biopolímeros em suas diferentes proporções com (U) e sem aplicação de ultrassom.

WPC:PEC	Rampa 1		Rampa 2	
	μ	R^2	μ	R^2
1:1	0,0104	0,998	0,0103	0,998
2:1	0,0043	0,999	0,0043	0,999
3:1	0,0025	0,999	0,0025	0,999
4:1	0,0019	1,000	0,0018	1,000
5:1	0,0016	0,999	0,0015	1,000
1:1U	0,0055	0,999	0,0055	1,000
2:1U	0,0031	0,999	0,0031	0,999
3:1U	0,0019	1,000	0,0019	1,000
4:1U	0,0015	0,999	0,0014	1,000
5:1U	0,0014	0,988	0,0014	0,998

SPI:PEC	Rampa 1			Rampa 2		
	K	n	R^2	K	n	R^2
1:1	0.006	0.934	0.999	0.005	0.965	0.999
2:1	0.004	0.943	0.999	0.004	0.970	0.999
3:1	0.004	0.896	0.999	0.004	0.925	0.999
4:1	0.006	0.862	0.996	0.007	0.851	0.995
5:1	0.016	0.849	0.999	0.016	0.859	0.999
1:1U	0.007	0.875	0.999	0.007	0.877	0.999
2:1U	0.006	0.794	0.997	0.008	0.757	0.996
3:1U	0.006	0.770	0.997	0.008	0.719	0.996
4:1U	0.003	0.874	0.999	0.003	0.878	0.999
5:1U	0.005	0.823	0.999	0.005	0.825	0.999

WPC:ALG	Rampa 1			Rampa 2		
	K	n	R^2	K	n	R^2
1:1	0.137	0.803	0.999	0.148	0.793	0.999
2:1	0.251	0.526	0.991	0.291	0.488	0.994
3:1	9.799	0.321	0.987	10,761	0.265	0.995
4:1	18.125	0.289	0.971	19,764	0.227	0.982
5:1	14.416	0.301	0.713	20.450	0.096	0.944
1:1U	0.028	0.872	0.999	0.029	0.870	0.999
2:1U	0.213	0.537	0.984	0.286	0.447	0.984
3:1U	13.292	0.303	0.933	15.746	0.167	0.975
4:1U	10.866	0.263	0.917	12.594	0.153	0.973
5:1U	17.713	0.170	0.838	19.864	0.059	0.836

SPI:ALG	Rampa 1			Rampa 2		
	K	n	R^2	K	n	R^2
1:1	0.219	0.661	0.992	0.262	0.609	0.994
2:1	1.092	0.364	0.977	1.186	0.312	0.990
3:1	4.057	0.248	0.932	4.226	0.200	0.967
4:1	14.327	0.166	0.899	14.524	0.103	0.936
5:1	14.550	0.178	0.941	14.167	0.067	0.972
1:1U	0.146	0.680	0.991	0.178	0.622	0.991
2:1U	0.470	0.354	0.941	0.567	0.284	0.957
3:1U	0.887	0.303	0.939	0.953	0.246	0.955
4:1U	3.302	0.235	0.904	3.477	0.182	0.946
5:1U	5.384	0.169	0.885	5.768	0.144	0.971

APÊNDICE G: Valores de viscosidade (μ), do índice de consistência (K), viscosidade infinita (η_{∞}), índice de comportamento (n) e coeficiente de determinação (R^2) na temperatura de 25 °C para as emulsões com aplicação de ultrassom ou alta pressão.

WPC:PEC	NEWTON (ULTRASSOM)							
	Rampa 1				Rampa 2			
	μ		R^2		μ		R^2	
1:1 5%	0,0096		0,999		0,0096		0,999	
1:1 10%	0,0116		0,998		0,0125		0,998	
1:1 15%	0,0179		0,997		0,0212		0,999	
4:1 5%	0,0023		0,998		0,0023		0,999	
4:1 10%	0,0024		1,000		0,0024		0,999	
4:1 15%	0,0033		0,999		0,0034		1,000	
SPI:PEC	NEWTON (ULTRASSOM)							
	Rampa 1				Rampa 2			
	μ		R^2		μ		R^2	
1:1 5%	0,0070		0,999		0,0073		0,999	
1:1 10%	0,0076		0,999		0,0080		0,999	
1:1 15%	0,0116		0,999		0,0131		0,999	
SPI:PEC	SISCO (ULTRASSOM)							
	Rampa 1				Rampa 2			
	K	n	η_{∞}	R^2	K	n	η_{∞}	R^2
4:1 5%	0,1104	0,1679	0,0143	0,999	0,1448	0,250	0,007	0,999
4:1 10%	0,2031	0,1477	0,0305	0,999	0,2307	0,176	0,022	0,999
4:1 15%	0,1696	0,2280	0,0559	0,997	0,2430	0,316	0,035	0,999
WPC:ALG	SISCO (ULTRASSOM)							
	Rampa 1				Rampa 2			
	K	n	η_{∞}	R^2	K	n	η_{∞}	R^2
1:1 5%	2,056	0,1652	0,209	0,999	2,177	0,18293	0,173	0,999
1:1 10%	2,394	0,15145	0,231	0,999	2,576	0,17455	0,187	0,999
1:1 15%	4,414	0,11893	0,291	0,999	4,994	0,16135	0,202	0,999
4:1 5%	5,957	0,21474	0,234	0,999	6,609	0,25118	0,128	0,999
4:1 10%	6,097	0,24688	0,215	0,999	6,771	0,28311	0,099	0,999
4:1 15%	7,202	0,2378	0,240	0,999	8,026	0,2756	0,081	0,999
WPC:ALG	POTÊNCIA (ALTA PRESSÃO)							
	Rampa 1				Rampa 2			
	K	n		R^2	K	n		R^2
1:1 5%	0,125	0,839		0,999	0,130	0,829		0,999
1:1 10%	0,228	0,793		0,996	0,236	0,784		0,999
1:1 15%	0,305	0,811		0,999	0,331	0,802		0,995
SPI:ALG	POTÊNCIA (ULTRASSOM)							
	Rampa 1				Rampa 2			
	K	n		R^2	K	n		R^2
1:1 5%	2,281	0,207		0,998	2,364	0,216		0,999
1:1 10%	2,638	0,191		0,999	2,776	0,205		0,999
1:1 15%	4,705	0,145		0,999	5,204	0,178		0,999
4:1 5%	8,168	0,067		0,999	8,806	0,090		0,999
4:1 10%	9,443	0,065		0,999	9,771	0,075		0,999
4:1 15%	8,555	0,062		0,999	8,977	0,076		0,999

APÊNDICE H: Índice de cremeação das emulsões em diferentes proporções de biopolímeros e teores de óleo.

Emulsões	WPC:ALG IC (%)	SPI:ALG IC (%)	Emulsões	WPC:PEC IC (%)	SPI:PEC IC (%)
1:1 15%	33,81	27,52	1:1 5%	0,00	0,00
1:1 20%	23,78	25,10	1:1 10%	0,00	0,00
1:1 25%	15,04	21,29	1:1 15%	0,00	0,00
4:1 15%	52,88	38,56	4:1 5%	0,00	46,25
4:1 20%	40,93	33,19	4:1 10%	0,00	38,56
4:1 25%	37,02	28,35	4:1 15%	0,00	37,51