



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

MARLY SAYURI KATSUDA

**ESTABILIDADE FÍSICA E OXIDATIVA DE EMULSÕES DE
ÓLEO DE PEIXE EM MEMBRANAS DE PECTINAS E
PROTEÍNAS DE LEITE**

Londrina
2007

MARLY SAYURI KATSUDA

**ESTABILIDADE FÍSICA E OXIDATIVA DE EMULSÕES DE
ÓLEO DE PEIXE EM MEMBRANAS DE PECTINAS E
PROTEÍNAS DE LEITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dr^a. Lúcia H. S. Miglioranza

Londrina
2007

MARLY SAYURI KATSUDA

**ESTABILIDADE FÍSICA E OXIDATIVA DE EMULSÕES DE
ÓLEO DE PEIXE EM MEMBRANAS DE PECTINAS E
PROTEÍNAS DE LEITE**

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lúcia Helena S. Miglioranza
(Universidade Estadual de Londrina)

Dra. Luciana Oliveira Fariña
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná)

Dra. Adriana Lourenço Soares
(Universidade Estadual de Londrina)

Dra. Rúbia Casagrande
(Universidade Estadual de Londrina)

Dra. Sandra H. P. Ferreira
(Universidade Estadual de Londrina)

Londrina, 26 de julho de 2007.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família e meus mentores.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lucia Helena S. Miglioranza pela amizade, incentivo, orientação e apoio incondicional ao longo da realização do meu trabalho.

Ao professor Dr. Raul J.H.C. Gómez pela amizade, apoio técnico e suporte durante a realização do trabalho.

Ao Programa de doutorado no Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela formação e acolhimento dos professores e funcionários.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio e financiamento ao estágio de doutorado no exterior.

Ao Dr. Eric A. Decker e Dr. David J. McClements pela amizade e orientação durante a realização da pesquisa no Department of Food Science na University of Massachusetts nos Estados Unidos.

À minha mãe e irmão pelo apoio, paciência e suporte espiritual durante toda a minha vida.

Aos meus amigos Milton, Melícia, Denis e Vanessa pela amizade e cumplicidade ao longo da minha trajetória no programa de doutorado. Mas acima de tudo agradeço a eles pela paciência e pelos momentos de descontração.

Aos amigos e colegas do Department of Food Science na University of Massachusetts nos Estados Unidos, especialmente Jean, Young-Hee, Ricard, Maria, Caitlin, Owen, Stefanie e Selma & Décio pela ternura, amizade e momentos inesquecíveis que tivemos juntos.

Finalmente agradeço a Deus pela iluminação e orientação durante toda minha jornada.

KATSUDA, Marly Sayuri. **Estabilidade física e oxidativa de emulsões de óleo de peixe em membranas de pectinas e proteínas de leite.** 2007. 100f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

O estudo consistiu inicialmente na avaliação da estabilidade física das membranas de caseína e pectinas em diferentes concentrações e pH entre 3 e 7. A emulsão secundária apresentou a seguinte composição 0,1% de caseína, 1% de óleo de peixe e pectina cítrica ou de beterraba em concentrações entre 0,025 a 0,4% m/m, em solução tampão fosfato 5 mM, pH 3. As amostras foram submetidas à análise do diâmetro médio da partícula, potencial zeta e índice de cremificação após 24 h. Para fins de ensaio preliminar definiu-se a concentração de 0,2% de pectina cítrica ou de beterraba para estudar a estabilidade em diferentes níveis de pH (entre 3 e 7). Em pH superior a 3,5, a estabilidade das emulsões foi afetada pela tendência à agregação apresentada pela caseína na proximidade de seu ponto isoelétrico. No entanto, as emulsões secundárias apresentaram-se instáveis em pH inferior a 3,5. Esse resultado levou a concluir que, nas condições estudadas, as membranas formadas pela caseína e pectinas avaliadas não proporcionaram estabilidade física às emulsões. O estudo da estabilidade oxidativa foi realizada pela membrana de β -lactoglobulina com pectina cítrica ou de beterraba, aplicada a uma emulsão de óleo de peixe em pH 3,5. A emulsão era composta de β -lactoglobulina e pectina, na seguinte proporção: 1% de óleo, 0,05% de β -lactoglobulina, 0,06% de pectina e 5 mM de solução tampão fosfato. O estudo incluiu a avaliação do diâmetro médio da partícula e potencial zeta para estabilidade física, e avaliação da concentração de hidroperóxidos lipídicos e propanal para oxidação lipídica, durante 16 dias à temperatura de 37°C. Dentre as pectinas estudadas, a membrana formada de pectina cítrica e β -lactoglobulina foi a que promoveu maior ação contra os agentes pró-oxidantes, tendo como consequência, maior estabilidade oxidativa. A pectina de beterraba, no entanto, apesar de possuir ácido ferúlico em sua composição, não teve a esperada atividade antioxidante, provavelmente por apresentar teor de ferro 15 vezes maior do que a pectina cítrica, limitando sua funcionalidade no sistema estudado.

Palavras-chave: Oxidação lipídica. Estabilidade física. Antioxidante. Pectina de beterraba. Pectina cítrica. Caseína e β -lactoglobulina.

KATSUDA, Marly Sayuri. **Physical and oxidative stability of fish oil emulsion in pectins and milk proteins membranes.** 2007. 100f. Thesis (Doctor's Degree in Science Food and Technology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The study consisted initially on physical stability evaluation of casein and pectins membrane in different concentrations and in pH 3 to 7. Secondary emulsion contained 0,1% casein, 1% fish oil and citric or sugar beet pectin on concentration from 0,025 to 0,4% w/w in buffer phosphate solution 5mM, pH 3. Physical stability evaluation was assessed by measuring particle size, zeta potential and creaming index after 24 h. For preliminary assay it was defined 0,2% w/w citric or sugar beet pectin concentration for stability study in different pH (3 to7). Above pH 3,5, the emulsion stability was affected by aggregation tendency presented by casein next to isoelectric point. However the secondary emulsion was unstable on pH lower than 3,5. The results indicated that, in this studied condition, the casein and pectin membranes evaluated did not guarantee emulsion physical stability. The oxidative stability study was performed using β -lactoglobulin with citrus or beet pectin membrane in fish oil emulsion at pH 3,5. The emulsion composed by β -lactoglobulin with pectins contained 1% fish oil, 0,05% β -lactoglobulin, 0,06% pectin and buffer phosphate solution 5 mM. This study has included mean particle diameter and zeta potential for physical stability analysis, hydroperoxides and propanal for lipid oxidation analysis during 16 days at 37°C. Between the studied pectins, β -lactoglobulin with citrus pectin membrane has promoted greater activity against prooxidant agents, consequently greater oxidative stability. Despite beet pectin has ferulic acid in its composition; it did not have antioxidant activity, maybe because it had 15 times more iron than citrus pectin, limiting its functionality in the studied system.

Keywords: Lipid oxidation. Antioxidant. Sugar beet pectin. Citrus pectin. Casein. β -lactoglobulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)	17
Figura 2 – Esquema de reação oxidativa em lipídeos. Mn^{+n+} e Mn^{+n+1} são metais de transição em seu estado reduzido e oxidado respectivamente; RH é o ácido graxo insaturado, ROOH é o hidroperóxido lipídico e AOH é o antioxidante. $R\bullet$ é o radical alquil, $RO\bullet$ é o radical alcoxil, $ROO\bullet$ é o radical peroxil e 1O_2 é o oxigênio singlet e LOX é a lipoxigenase.....	19
Figura 3 – Esquema dos diferentes fatores presentes em emulsões óleo/água e potencial localização dos reagentes na oxidação lipídica promovida pelos metais de transição. Mn^{+n+} e Mn^{+n+1} são metais de transição em seu estado reduzido e oxidado respectivamente; ROOH é o hidroperóxido lipídico e $RO\bullet$ é o radical alcoxil	21
Figura 4 – Carga dos resíduos de aminoácidos em caseínas no pH natural do leite	26
Figura 5 – Diagrama tridimensional da estrutura da β -lactoglobulina com as posições relativas dos resíduos de cisteína e palmitado.....	28
Figura 6 – Fenômeno de instabilidade de emulsões	34
Figura 7 – Efeito da adsorção de polímeros na interface das partículas em emulsão em função da concentração do hidrocolóide e da natureza de interação. (a) emulsão estericamente estável, (b) gel de emulsão (excesso de polímero) e (c) floculação por ponteamto.....	35
Figura 8 – Influência da adição do cálcio na emulsão formada por caseína. O ponteamto do íon cálcio diminui a carga da molécula de proteína (perda de estabilidade eletrostática) e diminui a espessura da camada adsorvida (perda de estabilidade estérica)	37
Figura 9 – Ilustração do processo de elaboração de membrana interfacial multicamada de proteína e polissacarídeo	38
ARTIGO 1	
Figura 1 – Diagrama do delineamento experimental.....	48
Figura 2 – Distribuição do tamanho de partículas em diferentes proporções de caseína e óleo de peixe em emulsões no pH 7	53

Figura 3 – Influência da concentração de pectina cítrica (▲) e de beterraba (◆) em emulsões secundárias (1% de óleo de peixe, 0,1% de caseína, 5mM de tampão fosfato de sódio) sobre o diâmetro médio das partículas (d_{43}) em pH 3	56
Figura 4 – Influência da concentração de pectina cítrica (▲) e de beterraba (◆) em emulsões secundárias (1% de óleo de peixe, 0,1% de caseína, 5mM de tampão fosfato de sódio) sobre o potencial zeta em pH 3.....	57
Figura 5 – Emulsões de óleo de peixe com caseína e pectina em pH 3, após 24h de elaboração. A - caseína e pectina cítrica e B - caseína e pectina de beterraba. Concentrações de pectina da esquerda para a direita 0; 0,025; 0,050; 0,075; 0,10, 0,15, 0,20 e 0,4% m/m.....	59
Figura 6 – Influência do pH sobre o potencial zeta. Emulsão primária (■), emulsão secundária com pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com pectina cítrica (▲), solução de pectina de beterraba (◇), solução de pectina cítrica (△).....	60
Figura 7 – Influência do pH sobre o diâmetro médio das partículas (d_{43}). Emulsão primária (■), emulsão secundária com pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com pectina cítrica (▲).....	62
Figura 8 – Influência do pH sobre o índice de cremificação. Emulsão primária (■), emulsão secundária com pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com pectina cítrica (▲).....	63

ARTIGO 2

Figura 1 – Influência de diferentes concentrações de pectina cítrica e de beterraba sobre o diâmetro médio das partículas (d_{43}). Emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (◆) e emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica (▲).....	78
Figura 2 – Influência de diferentes concentrações de pectina cítrica e de beterraba sobre o potencial zeta. Emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (◆) e emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica (▲).....	79

- Figura 3** – Diâmetro médio das partículas (d_{43} e d_{32}) das emulsões nos tempos 0 e 16 dias em pH 3,5 incubadas a 37°C. Blg – Emulsão primária com β -lactoglobulina, BPBlg – emulsão secundária com pectina de beterraba, CPBlg - emulsão secundária com pectina cítrica, Tw – emulsão com Tween, BPTw – emulsão com Tween e pectina de beterraba e CPTw - emulsão com Tween e pectina cítrica..... 81
- Figura 4** – Potencial zeta das emulsões nos tempos 0 e 16 dias em pH 3,5 incubadas a 37°C. Blg – Emulsão primária com β -lactoglobulina, BPBlg – emulsão secundária com pectina de beterraba, CPBlg - emulsão secundária com pectina cítrica, Tw – emulsão estabilizada por Tween, BPTw – emulsão com Tween e pectina de beterraba e CPTw - emulsão com Tween e solução de pectina cítrica. 82
- Figura 5** – Efeito da membrana de β -lactoglobulina e pectina cítrica ou de beterraba, na produção de hidroperóxidos em emulsões de óleo de peixe durante estocagem à 37°C. Emulsão com β -lactoglobulina (■), emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica (▲). 83
- Figura 6** – Influência da membrana de β -lactoglobulina e pectina na produção de propanal em emulsões de óleo de peixe, durante estocagem à 37°C. Emulsão primária com β -lactoglobulina (■), emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica (▲)..... 84
- Figura 7** – Efeito das pectinas na produção de hidroperóxidos em emulsões de óleo de peixe durante estocagem à 37°C. Emulsão primária com Tween 20 (-x-), emulsão secundária com Tween 20 e pectina de beterraba (◇) e emulsão secundária com Tween 20 e pectina cítrica (△)..... 86
- Figura 8** – Efeito das pectinas na produção de propanal em emulsões de óleo de peixe durante estocagem à 37°C. Emulsão primária com Tween 20 (-x-), emulsão secundária com Tween 20 e pectina de beterraba (◇) e emulsão secundária com Tween 20 e pectina cítrica (△). 87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO LITERÁRIA	16
3.1 ÓLEO DE PEIXE	16
3.1.1 Característica e aspecto nutricional	16
3.1.2 Fatores que afetam a estabilidade oxidativa	18
3.1.3 Estudos para aumentar a estabilidade oxidativa de emulsões óleo/água.....	21
3.2 PROTEÍNAS DO LEITE	24
3.2.1 Caseína.....	24
3.2.2 β -lactoglobulina.....	27
3.3 PECTINA	29
3.3.1 Pectina cítrica	30
3.3.2 Pectina de beterraba.....	31
3.4 EMULSÕES	32
3.4.1 Emulsão multicamada.....	37
4 ARTIGO 1: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE ESTABILIZADA POR MEMBRANA DE CASEÍNA E PECTINA	41
Resumo	42
Abstract.....	43
4.1 Introdução.....	44
4.2 Material e métodos	47
4.2.1 Material.....	47
4.2.2 Métodos	47
4.2.2.1 Delineamento Experimental	47
4.2.2.2 Elaboração da emulsão estoque.....	48
4.2.2.3 Elaboração da emulsão primária.....	49

4.2.2.4	Elaboração da emulsão secundária.....	49
4.2.2.5	Padronização da concentração de caseína para estabilizar a emulsão estoque	50
4.2.2.6	Determinação do tempo de estabilização do pH na emulsão primária.....	50
4.2.2.7	Determinação da concentração das pectinas cítricas e de beterraba na emulsão secundária.....	50
4.2.2.8	Influência do pH na estabilidade da emulsão com membrana de caseína e pectina cítrica ou de beterraba	51
4.2.2.9	Diâmetro médio das partículas	51
4.2.2.10	Potencial zeta (ζ)	51
4.2.2.11	Avaliação da cremificação.....	52
4.2.2.12	Análise estatística	52
4.3	Resultados e discussão	53
4.3.1	Padronização da concentração de caseína para estabilizar a emulsão estoque	53
4.3.2	Determinação do tempo de estabilização do pH na emulsão primária.....	54
4.3.3	Determinação da concentração de pectina cítrica ou de beterraba na emulsão secundária em pH 3	55
4.3.4	Influência do pH na estabilidade da emulsão de óleo de peixe com caseína e pectina cítrica ou de beterraba	60
4.4	Referências	64

5 ARTIGO 2: ESTABILIDADE FÍSICA E OXIDATIVA DE ÓLEO DE PEIXE EM EMULSÃO COM MEMBRANA DE β -LACTOGLOBULINA E PECTINA ..

	Resumo	68
	Abstract.....	69
5.1	Introdução.....	70
5.2	Material e métodos	72
5.2.1	Material.....	72
5.2.2	Métodos	73
5.2.2.1	Preparo da emulsão estoque	73
5.2.2.2	Avaliação da estabilidade física da emulsão	74
5.2.2.2.1	Potencial zeta (ζ)	74
5.2.2.2.2	Determinação do tamanho de partículas.....	75
5.2.2.3	Avaliação da oxidação lipídica	75

5.2.2.3.1 Hidroperóxidos	75
5.2.2.3.2 Propanal	76
5.2.2.4 Avaliação da composição de metais nas amostras de pectinas	76
5.2.2.5 Análise estatística	77
5.3 Resultados e discussão	77
5.3.1 Ensaio Preliminares	77
5.3.2 Avaliação da estabilidade física das emulsões de óleo de peixe em membrana de β - lactoglobulina e pectina cítrica ou de beterraba durante a estocagem	80
5.3.3 Avaliação da oxidação lipídica em emulsão de óleo de peixe com membrana de β - lactoglobulina e pectina cítrica ou de beterraba	83
5.3.4 Avaliação da atividade antioxidante de pectinas livres na emulsão.....	85
5.4 Agradecimentos	88
5.5 Referências	89
6 CONCLUSÃO	92
7 SUGESTÕES	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A mudança do hábito alimentar nos últimos anos tem proporcionado um desequilíbrio do consumo de ácidos graxos poliinsaturados (AGP) ômega-6 e ômega-3. Antigamente, a razão de consumo de ômega-6 para ômega-3 era de 2:1 e atualmente, com a mudança do estilo de vida e alimentação, essa proporção passou a 20 ou 30:1. Vários estudos tem demonstrado que a ingestão em grandes quantidades de ômega-6 desencadeia problemas fisiológicos, tais como protrombose e agregação plaquetária devido ao aumento da viscosidade do sangue, vasospasmo e vasoconstrição, diminuindo o tempo de sangramento. Por outro lado, os ácidos graxos ômega-3 têm propriedade antiinflamatória, antitrombótica, antiarrítmica, hipolipidêmica e vasodilatadora. Conseqüentemente, estes efeitos benéficos têm demonstrado que podem prevenir eventos como hipertensão, doenças coronárias, diabete tipo 2 e algumas doenças renais (SIMOPOULOS, 1999).

O óleo de peixe é excelente fonte de ácidos graxos ômega-3, especialmente dos ácidos graxos eicosapentaenóico (AEP, C20:5 ômega-3) e docosahexaenóico (ADH, C22:6 ômega-3). Esses são susceptíveis a oxidação por conterem várias insaturações na cadeia carbônica, as quais comprometem a integridade das duplas ligações, concentração e funcionalidade dos ácidos graxos e qualidade sensorial, além de promoverem efeito tóxico à saúde humana (CONNOR, 2000, KULAS *et al*, 2003). A susceptibilidade oxidativa depende da composição do produto e da presença de pró-oxidantes ou antioxidantes. Os metais de transição (tais como ferro e cobre) são reconhecidos como agentes pró-oxidantes na degradação de produtos de oxidação primária, por exemplo, hidroperóxidos lipídicos. Esses íons estão presentes naturalmente nos alimentos e podem ser provenientes de matéria-prima ou de ingredientes, equipamentos, embalagens, etc. (NAWAR, 1996; McCLEMENTS, 2005).

A oxidação lipídica pode ser reduzida pela adição de antioxidantes ou microencapsulação do óleo. A estabilidade oxidativa do óleo emulsificado pode ser aumentada pelo controle do tipo de emulsificante e concentração. Por exemplo quando partículas de emulsões óleo e água são estabilizadas por emulsificante catiônicos, os metais pró-oxidantes são repelidos e a taxa de oxidação lipídica diminui (MANCUSO *et al*, 1999, HU *et al*, 2003b).

Estudos recentes têm demonstrado que a tecnologia da engenharia interfacial, baseada no princípio da deposição de biopolímeros sobre a superfície da partícula carregada formando uma membrana multicamada, proporciona uma emulsão estável ao

estresse físico, e possui propriedade de encapsular e liberar compostos (GU *et.al.*, 2004; OGAWA *et.al.*, 2003a,b). As membranas multicamadas são produzidas por deposição de um biopolímero carregado em uma emulsão com partículas revestidas por um emulsificante com carga oposta. Por outro lado, é importante selecionar o biopolímero compatível com o emulsificante para desenvolver emulsões estáveis e com características físico-químicas desejáveis. Emulsões estabilizadas por multicamadas ou membranas contendo proteínas do leite e biopolímeros, por exemplo a pectina, foram utilizadas em diversos estudos, uma vez que a pectina cítrica possui pKa 3,5, tornando-se conveniente na elaboração de emulsões com pH inferior ao ponto isoelétrico das proteínas, condição em que essas apresentam cargas positivas (DALGLEISH e HOLLOCOU, 1997; DICKINSON *et.al.*, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade física e oxidativa da emulsão de óleo de peixe em membranas de pectinas e proteínas de leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estabilidade física das emulsões formadas por membranas de caseína ou β -lactoglobulina e pectina de beterraba ou cítrica em condições ácidas.

- Avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de peixe em membranas formadas por β -lactoglobulina e pectinas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÓLEO DE PEIXE

3.1.1 Característica e aspecto nutricional

Os óleos marinhos são provenientes de fígado de peixes brancos com carne magra (tais como bacalhau), de óleo de peixe (tais como cavala) e gordura de mamíferos marinhos (foca). Estes óleos consistem em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI). Há duas classes de AGPI cada uma representada por um ácido essencial: ácido linoléico (C18:2, família ômega-6) e o ácido alfa-linolênico (C18:3, família ômega-3), os quais são diferenciados entre si baseado na localização e número da dupla ligação do grupo metila das moléculas de ácidos graxos (YONGMANICHAH e WARD, 1989; SIMOUPoulos, 1999). O ômega-3 também pode ser obtido de óleos de plantas, sementes, vegetais com folhas verdes, feijões e castanhas. O ômega-6 é encontrado em grãos, carnes e sementes de muitas plantas. Esses ácidos graxos dão origem a outros ácidos essenciais de cadeias mais longas, chamados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL) (ZATSICK e MAYKET, 2007).

Diferente dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, os AGPI não são produzidos pelos humanos, portanto são obtidos através da ingestão de alguns alimentos. Os vegetais terrestres e marinhos podem sintetizar ácidos graxos a partir de precursores mais simples e os peixes e outros animais podem alongar e insaturar estes ácidos graxos transformando-os em AGPI (SIMOUPoulos, 1999). Já os mamíferos apesar de possuírem a capacidade de alongar e insaturar os ácidos graxos, necessitam de precursores que devem estar presentes na sua dieta (BRENNER, 1987).

Os humanos podem converter o ácido linoléico (ômega-6) em ácido araquidônico (C20:4, ômega-6) e ácido alfa-linoléico (ômega-3) em AGPICL, tais como, ácido eicosapentaenóico (AEP, C20:5 ômega-3), ácido docosaheptaenóico (ADH, C22:6 ômega-3) e em menor quantidade ácido docosapentaenóico (ADP, C22:5 ômega-3) (YONGMANICHAH e WARD, 1989).

A família omega-6 produz eicosanóides inflamatórios e cancerígenos, aumentando o risco de situações como: câncer, morte súbita, protrombose e agregação plaquetária, doenças cardíacas, vasospasmo e vasoconstricção, aumento da pressão arterial, elevação da taxa de triglicerídeos, artrite, depressão entre outras doenças inflamatórias. Por outro lado, os ácidos graxos ômega-3 tem propriedades antiinflamatórias, antitrombóticas, antiarrítmicas, hipolipidêmicas e vasodilatadoras. Conseqüentemente, estes efeitos benéficos têm demonstrado que podem prevenir eventos como hipertensão, doenças cardíacas, diabetes tipo 2 e algumas doenças renais (SIMOPOULOS, 1999).

Vários estudos tem relacionado as doenças degenerativas, tais como diabetes, artrite e o câncer, com o consumo desproporcional de ácidos ômega-6 e ômega-3 devido a alteração dos hábitos alimentares. Antigamente, a razão de consumo de ômega-6 para ômega-3 era de 2:1 e atualmente, com a mudança do estilo de vida e alimentação, essa proporção passou a 20 ou 30:1. Deste modo, alguns pesquisadores estão propondo a redução do consumo de AGPI ômega-6 das dietas o aumento da concentração de ácidos ômega-3 (SIMOPOULOS, 1999).

O óleo de peixe é excelente fonte de ácidos graxos ômega-3, especialmente AEP e ADH (Figura 1). Estes ácidos graxos são considerados benéficos para o crescimento e desenvolvimento por todo o ciclo da vida e tem um papel importante na prevenção e tratamento de doenças coronárias arteriais (arterosclerose), hipertensão, tumorogênese de mama, cólon e próstrata, artrite e desordem na imunidade. O ADH é importante no desenvolvimento do sistema nervoso central e dos olhos em crianças e é considerado, portanto, um nutriente promissor pelos efeitos benéficos à retina e ao cérebro (SIMOPOULOS, 1999).

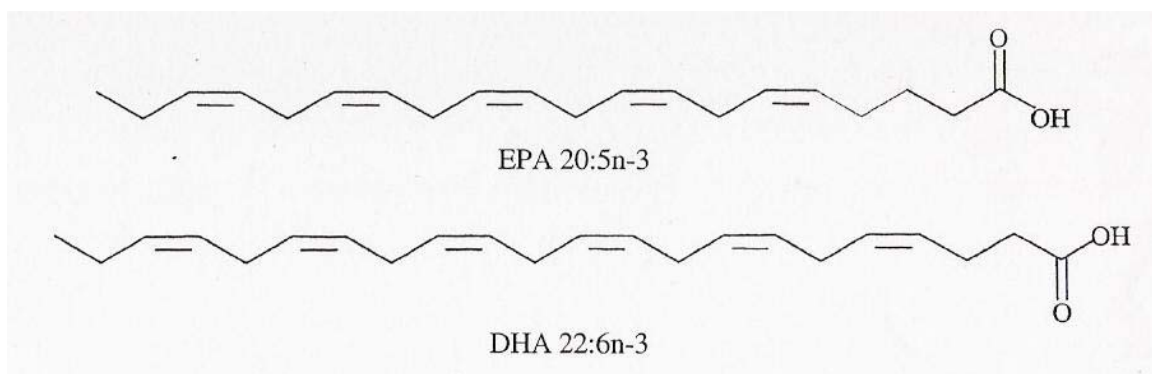


Figura 1 – Estrutura do ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (KULAS *et al*, 2003).

3.1.2 Fatores que afetam a estabilidade oxidativa

Os óleos ricos em ácidos graxos ômega-3, tal como óleo de peixe, são susceptíveis a oxidação por conterem várias insaturações na cadeia carbônica. Os processos oxidativos comprometem a integridade das duplas ligações, concentração e funcionalidade dos ácidos graxos AEP e ADH e qualidade sensorial, além de promoverem efeito tóxico à saúde humana (CONNOR, 2000; KULAS *et al.*, 2003).

Os lípidos alimentares possuem uma estabilidade inerente à oxidação que é influenciada pela presença de antioxidantes ou pró-oxidantes. Após um período de relativa estabilidade (período de indução), a oxidação lipídica torna-se autocatalítica e ocorre a rancificação. A indução consiste numa fase lag, seguida de um tempo de percurso de auto-oxidação que ocorre um rápido acúmulo de hidroperóxidos que atingem uma concentração máxima, decrescendo à medida que as reações de decomposição dos hidroperóxidos se tornam mais importantes. Quanto mais longo o período de indução, mais estável é o produto alimentar à oxidação (FOX, 1995).

Os hidroperóxidos são os primeiros produtos da autooxidação lipídica e são relativamente instáveis. Estes, por sua vez, participam de inúmeras reações complexas, envolvendo degradações de substrato e permitindo interações que resultam em compostos com diversos pesos moleculares e aromas (NAWAR, 1996). Os hidroperóxidos geralmente se decompõem durante a oxidação lipídica para formar moléculas pequenas e voláteis que proporcionam o odor não característico associado a rancidez oxidativa. Os produtos de oxidação secundária (voláteis) formados a partir da decomposição de hidroperóxidos provenientes do AEP são os aldeídos voláteis, dos quais destaca-se o propanal (KULAS *et al.*, 2003).

A oxidação de lipídeos normalmente é catalisada pelos agentes pró-oxidantes. Alguns pró-oxidantes, dentre eles lipoxigenase e geradores de oxigênio singlete são responsáveis pela iniciação do processo de oxidação dos lipídeos através da interação direta com ácidos graxos insaturados para formar hidroperóxidos lipídicos (Figura 2).

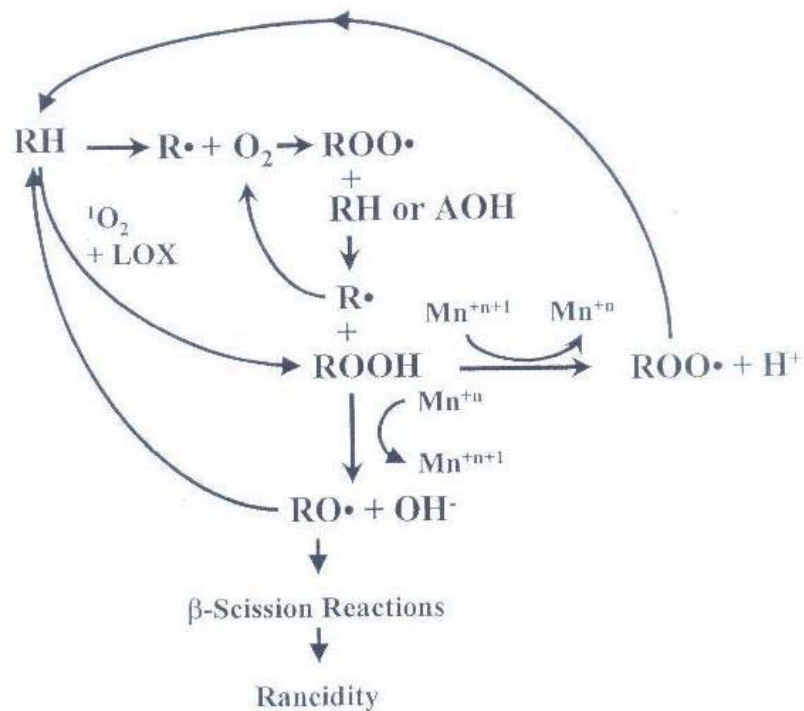


Figura 2 – Esquema de reação oxidativa em lipídeos. Mn^{+n} e Mn^{+n+1} são metais de transição em seu estado reduzido e oxidado respectivamente; RH é o ácido graxo insaturado, ROOH é o hidroperóxido lipídico e AOH é o antioxidante. $\text{R}\cdot$ é o radical alquil, $\text{RO}\cdot$ é o radical alcoxil, $\text{ROO}\cdot$ é o radical peroxil e $^1\text{O}_2$ é o oxigênio singlet e LOX é a lipoxigenase (Decker *et al.*, 2002).

Os pró-oxidantes geralmente exercem efeitos no processo da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos para radicais livres, frequentemente catalisada pelos metais de transição. Esses metais aceleram a reação de oxidação lipídica pela abstração do hidrogênio e decomposição do peróxido resultando na formação do radical livre. Inicialmente ocorre a abstração do hidrogênio do ácido graxo insaturado resultando na formação de radical alquil. Este por sua vez recebe o oxigênio para formar o radical peroxil e com subsequente abstração do hidrogênio de um outro ácido graxo insaturado ou antioxidante formando o hidroperóxido lipídico (Figura 2). Esta reação não é suficiente para ocasionar o aumento exponencial na reação de oxidação. Deste modo, o metal de transição atua como o catalisador da decomposição dos hidroperóxidos para a formação de radicais livres (tais como, alcoxil e peroxil), aumentando exponencialmente a taxa de oxidação de ácidos graxos insaturados. A partir dos radicais livres esses são induzidos a clivagem dos radicais alcoxil pela cisão β -hemolítica gerando um produto de oxidação secundária de cadeia curta (DECKER *et al.*,

2002). Esses radicais devem reagir com hidrogênio ou radicais hidroxil formando compostos aromáticos, tais como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas (FRANKEL, 1998).

A taxa da quebra do hidroperóxidos depende da concentração, do estado químico e o tipo do metal. Os metais de transição estão presentes naturalmente nos alimentos e podem ser provenientes de matéria-prima ou ingredientes, equipamentos, embalagens, etc. O cobre e o ferro são metais de transição comumente encontrados em alimentos e geralmente participam nestas reações, embora o ferro prevaleça mais do que o cobre. Estudos têm comprovado que o ferro é um pró-oxidante primário. Quando se adicionou transferrina (agente quelante do ferro) à emulsão de óleo de salmão, houve inibição da oxidação lipídica, demonstrada pela oxidação que ocorreu na emulsão sem o agente quelante (MANCUSO *et al.*, 1999).

O estado redox do metal também é importante, pois o Fe^{2+} decompõe o peróxido de hidrogênio 10^5 vezes mais rápido do que Fe^{3+} , bem como é mais solúvel do que o Fe^{3+} em pH entre 3 e 7, encontrando-se apto para promover a decomposição do hidroperóxido em alimentos (DECKER *et al.*, 2002). Deste modo, pode-se concluir que os hidroperóxidos e metais de transição em alimentos permitem a interação entre os compostos para produzirem radicais livres, sendo considerado um mecanismo importante para a deterioração oxidativa nos alimentos (MANCUSO *et al.*, 1999). Para garantir a estabilidade oxidativa, alguns pesquisadores sugerem monitorar o teor de metais em óleos, ou seja, recomendam-se concentrações inferiores a 0,1 ppm de ferro e 0,02 ppm de cobre (FLIDER e ORTHOEFER, 1981).

Muitos compostos são capazes de quelar metais, entretanto nem todos os quelantes são capazes de inibir a oxidação lipídica. Os quelantes podem aumentar a solubilidade e alterar o potencial redox dos metais, podem atuar como antioxidantes em reações catalizadas por metais desde que apresentem as seguintes propriedades: não alterar o potencial redox, ocupação de alguns sítios de coordenação dos metais, formação de um complexo insolúvel e impedimento estérico da interação entre metais e lipídeos ou intermediários da oxidação (GRAF e EATON, 1990). Muitos agentes quelantes possuem múltiplos ácidos carboxílicos (por ex. EDTA e ácido cítrico) ou grupamentos fosfatos (polifosfatos e fitatos). A atividade pró-oxidante dos metais é também controlada em sistemas biológicos por compostos protéicos. Proteínas, peptídeos e aminoácidos que quelam pró-oxidantes metálicos incluem soro albumina (Cu), transferrina (Fe), lactoferrina (Fe), ferritina (Fe), carnosina (Cu) e histidina (Cu). As proteínas normalmente quelam metais no seu estado oxidado, embora os agentes redutores, tais como, ascorbato e ânion superóxido podem causar

a liberação do ferro ligado à proteína e acelerar as reações de oxidação (DECKER e WELCH, 1990).

3.1.3 Estudos para aumentar a estabilidade oxidativa de emulsões óleo/água

Os lipídeos são comumente encontrados nos alimentos na forma dispersa. Nos últimos anos tem havido um aumento de demanda por alimentos formulados e por alimentos funcionais. Este aumento corresponde a uma grande demanda por produtos convenientes, sabor agradável e com a vida útil estendida. Os alimentos emulsionados contêm vários fatores que influenciam física e quimicamente as partículas compostas por lipídeos, devido a possíveis interações entre a membrana das partículas e a fase aquosa. Esses fatores consistem na concentração de oxigênio, metais de transição, concentração de hidroperóxidos lipídicos, etc. Pesquisas nessa área vem sendo desenvolvidas com a finalidade de compreender os mecanismos da oxidação lipídica sob várias condições bem como os produtos resultantes da reação (DECKER *et al.*, 2002).

As propriedades físicas das interfaces das emulsões de lipídeos em água ou ar pode influenciar nas reações oxidativas. A carga interfacial dos lipídeos dispersos influencia na taxa de oxidação na presença de metais de transição (Figura 3).

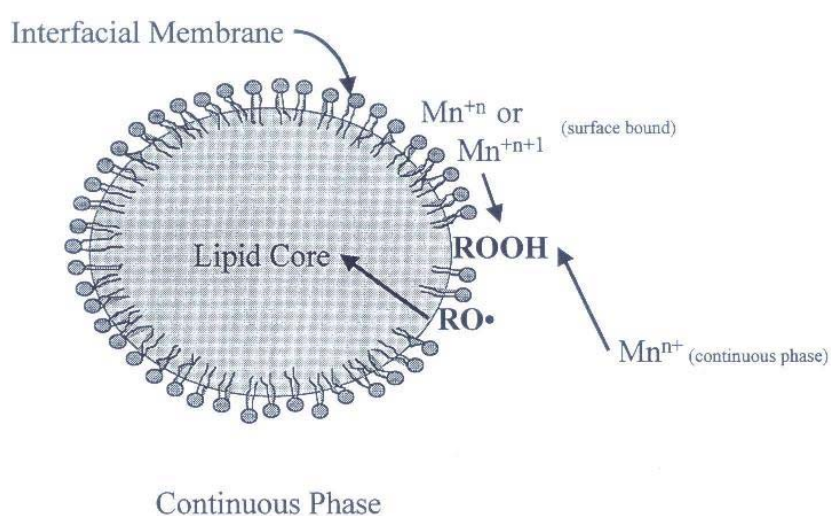


Figura 3 - Esquema dos diferentes fatores presentes em emulsões óleo/água e potencial localização dos reagentes na oxidação lipídica promovida pelos metais de transição. Mn^{n+} e Mn^{n+1} são metais de transição em seu estado reduzido e oxidado respectivamente; $ROOH$ é o hidroperóxido lipídico e $RO\bullet$ é o radical alcoxil (Decker *et al.*, 2002).

A oxidação lipídica pode ser controlada por engenharia das propriedades da membrana das partículas, por exemplo, pela alteração da carga ou permeabilidade. Esse controle pode ocorrer com as interações específicas entre as moléculas das membranas, por meio de complexação com metais ou alteração do potencial redox dos mesmos. Um dos métodos propostos para controle de oxidação lipídica em sistema coloidal é a alteração da carga elétrica da membrana. Outro método é alterar a efetividade do empacotamento de moléculas emulsificantes na membrana da partícula, ou seja, o uso de agentes emulsionantes em excesso na elaboração da emulsões aumenta a estabilidade oxidativa, aumentando a espessura e a barreira aos agentes pró-oxidantes. Além disso, alguns compostos podem apresentar capacidade de sequestrar radicais livres ou agentes pró-oxidantes, retardando a oxidação lipídica. Certos aminoácidos e açúcares possuem capacidade de sequestrar radicais livres. Muitas moléculas de emulsificantes (por exemplo, Tween) contêm tais açúcares e aminoácidos (COUPLAND e McCLEMENTS, 1996).

Estudos realizados com emulsões óleo/água acrescidas de agentes emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico, em pH 3, apresentaram oxidação lipídica em presença de ferro, na seguinte ordem: aniônico > não-iônico > catiônico. Na pior condição, ou seja, em emulsões adicionadas de surfactantes aniônicos, houve intensa atividade oxidativa do metal. A associação do ferro com as partículas negativamente carregadas pode ser observada medindo-se o potencial zeta da emulsão. Em pH 3 os íons férrico e ferroso associaram-se às partículas na presença de surfactantes negativos, não sendo observada essa associação na presença de emulsificantes catiônicos e não-iônicos (MEI *et al.*, 1998).

Quando a carga da superfície das partículas de óleos em sistemas emulsionados apresenta-se negativa, a taxa de oxidação é muito maior comparada com partículas carregadas positivamente. Isto se deve à capacidade do ferro de se ligar à interface dos lipídeos dispersos. Os agentes emulsificantes com cargas positivas são muito raros, entretanto a proteína em pH inferior ao ponto isoelétrico (pI) produz carga positiva em emulsões com lipídeos, aumentando a estabilidade contra a oxidação lipídica catalizada por ferro (MANCUSO *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2003).

As proteínas são largamente usadas como agentes emulsificantes na indústria de alimentos. As proteínas são moléculas anfifílicas, capazes de se concentrarem nas interfaces óleo-água por causa da sua superfície ativa. Estas não só produzem emulsões óleo/água (O/A) estáveis, como podem inibir a oxidação lipídica. (COUPLAND e McCLEMENTS, 1996). Os aminoácidos, peptídeos e proteínas retardam a oxidação lipídica em certos sistemas alimentícios, e estes podem ser obtidos naturalmente em diversos

produtos. As proteínas do leite tais como a caseína, as proteínas do soro e seus hidrolizados, apresentam atividade antioxidante em alimentos por sua capacidade de sequestrar os agentes pró-oxidantes (FARAJI *et al.*, 2004; DIAZ e DECKER, 2004; ELIAS *et al.*, 2005).

Quando aderidas à superfície das partículas na emulsão, as proteínas do soro inibem a oxidação lipídica pela produção de uma superfície catiônica, cuja carga repele os metais de transição, em pH inferior ao pI. Estudos realizados com emulsão de óleo de salmão estabilizada em água por frações de proteínas do soro, em pH 3, demonstraram que a estabilidade oxidativa ocorreu na seguinte ordem: β -lactoglobulina \geq α -lactalbumina \geq isolados protéicos de soro. (TONG *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2003; DJORDJEVIC *et al.* 2004; FARAJI *et al.*, 2004).

Em estudos de oxidação lipídica em emulsões é importante caracterizar as propriedades físicas do sistema usado. As propriedades mais importantes são: o tamanho, concentração e o estado físico das partículas das emulsões, a natureza da membrana do emulsificante (ou seja, espessura, carga elétrica, grau de empacotamento, composição), e a extensão da interação partícula-partícula. A concentração e a distribuição do tamanho de partículas podem ser medidas usando a técnica tradicional como o microscópio eletrônico ou por métodos modernos usando a técnica dispersão estática ou dinâmica de luz a laser, condutividade elétrica ou ressonância magnética nuclear (COUPLAND e McCLEMENTS, 1996).

Em ensaios de oxidação lipídica é importante que a emulsão seja estável ao longo do tempo de estudo (resistente a cremificação, flocculação e/ou coalescência), estocada em temperaturas inferiores a 60°C. A amostragem durante o processo de oxidação deve ocorrer sempre no mesmo período (cada 6 – 24 h dependendo da estabilidade do óleo). A temperatura de estocagem deve ser reduzida se a taxa de oxidação estiver ocorrendo muito rápido ou se a emulsão se tornar estável. A oxidação lipídica nesses sistemas normalmente é monitorada através da concentração de produtos de oxidação primária (hidroperóxidos) e produtos de oxidação secundária, usando técnicas de análises de compostos voláteis por cromatografia gasosa (DECKER *et al.*, 2005).

3.2 PROTEÍNAS DO LEITE

O leite é composto em sua maioria pelas proteínas α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactalbumina. Este também contém plasmina e plasminogênio do sangue que levam à formação de peptídeos curtos referidos como proteose-peptona e peptídeos longos conhecidos como γ -caseína. A principal proteína do leite é a caseína, compondo cerca de 80% do peso total, enquanto que a lactalbumina e a lactoglobulina, conhecidas como proteínas do soro, compõem os 20% restantes. O teor de proteína em leite desnatado é de 45 a 56% de α_{s1} -caseína, 8-15% de κ -caseína, 25-35% de β -caseína, 3-7% de γ -caseína, 2-5% de lactalbumina, 7-12% de β -lactoglobulina, 0,7 – 1,3% de soro albumina do sangue, 1-2% de imunoglobulina IgG1 e 0,2-0,5% imunoglobulina IgG2, 0,1-0,2% de imunoglobulina IgM, 0,05-0,1% de imunoglobulina IgA e 2-6% como frações de proteose-peptonas. As frações de proteínas do leite incluem também as enzimas do leite e proteínas menores (GORDON e KALAN, 1980).

As proteínas do soro são substâncias nitrogenadas que não se precipitam quando o pH atinge pI da caseína, e são denominadas proteínas solúveis (VEISSEYRE, 1988). Em leite bovino essa fração apresenta excelente qualidade nutricional, e é constituída de aminoácidos essenciais com valor biológico superior a caseína. Também são ricas em aminoácidos sulfurados que são responsáveis pela baixa estabilidade ao calor. As principais e maiores frações componentes das proteínas do soro são: β -lactoglobulina, α -lactalbumina e soro albumina bovina. E contém em menores proporções: imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrinas e lisozimas. Estas proteínas apresentam estruturas globulares com limitado número de pontes de dissulfetos. Comparadas à caseína, as proteínas do soro são mais sensíveis ao calor e menos sensíveis ao cálcio (AMIOT, 1991).

3.2.1 Caseína

A caseína é composta de uma mistura de 4 principais proteínas de estrutura primária: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína. As formas monoméricas da caseína têm peso molecular relativamente baixo (15000-26000 Da) (GORDON e KALAN, 1980). A caseína está presente

no leite na forma de um grande complexo de proteínas incorporadas de sais do leite, particularmente cálcio, formando um complexo fosfo-paracaseinato de cálcio. A estrutura nativa deste complexo de proteínas é resultante da interação de todas as caseínas, formando uma grande estrutura conhecida como micela de caseína (FOX, 1992). Em pH próximo ao seu pI (4,6), a caseína é completamente insolúvel, enquanto que em pH superior a 5,5, esta é convertida em sais catiônicos (Na, K, NH_3) e é completamente solúvel. Em pH inferior a 3,5, a caseína ainda apresenta-se solúvel, é mais viscosa do que em pH neutro, com formação de gel (GORDON e KALAN, 1980; FOX, 1992).

As micelas de caseínas são extremamente estáveis ao calor, pois o caseinato é capaz de resistir por 60 min a 140°C. A κ -caseína é a fração insensível ao cálcio, e é conhecido como ‘colóide protetor’ por estabilizar a micela. A fração sensível ao cálcio é composta por α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína e β -caseína. Isto se deve à presença de grupos de resíduos de fosfoserina nas caseínas. Uma preponderância de resíduos de prolina e a completa ausência de cisteína levam cada proteína a adotar uma configuração desdobrada flexível em solução com uma estrutura secundária um pouco ordenada. As α_{s2} -caseínas são as mais hidrofílicas e possuem a maior frequência de carga, enquanto que as β -caseínas são significativamente mais hidrofóbicas do que as outras caseínas (FOX, 1992). Os resíduos hidrofóbicos e com cargas não apresentam uma distribuição uniforme na sequência das caseínas (Figura 4).

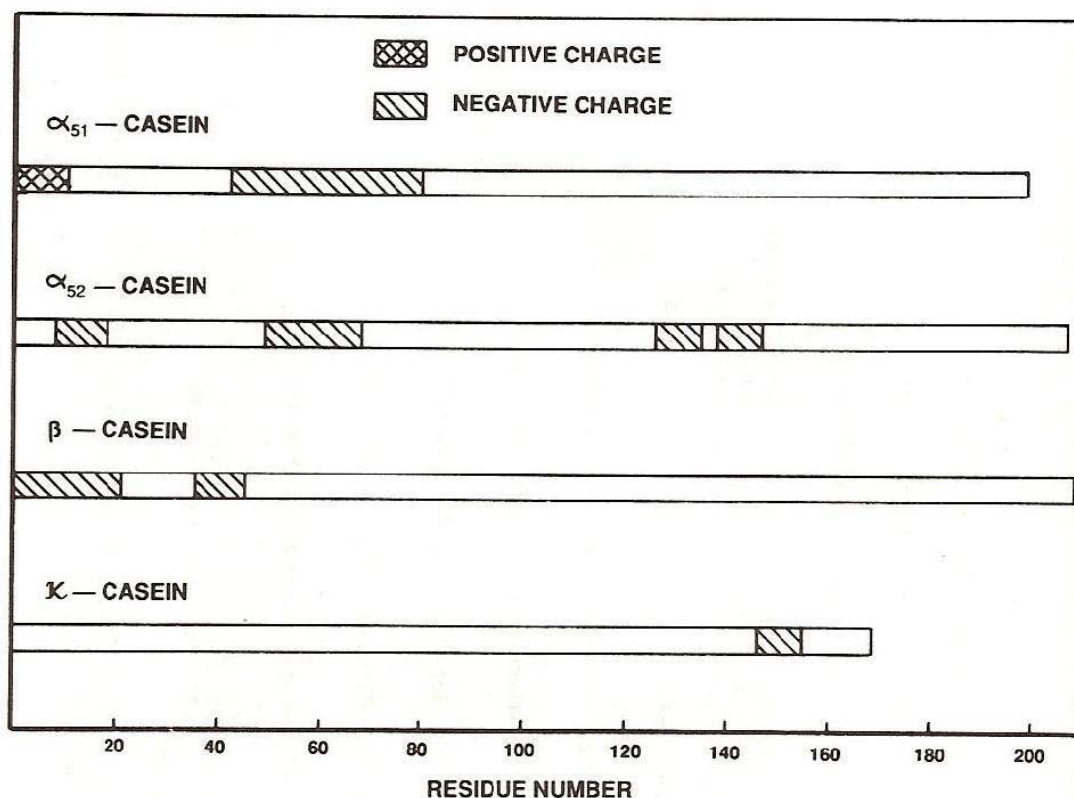


Figura 4 – Cargas dos resíduos de aminoácidos em caseínas no pH natural do leite. (Figura adaptado de FOX, 1992).

Diferente de outras caseínas, a β -caseína não tem ligações covalentes cruzadas e nenhuma tendência para polimerizar através de pontes dissulfeto intermoleculares. Sua distribuição não uniforme de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos produz uma estrutura molecular anfifílica distinta. Esta molécula se estrutura na forma ligeiramente esférica. Em água, as β -caseínas se associam entre si devido à interação hidrofóbica e sua agregação depende do aumento da temperatura ou concentração de íons em solução (FOX, 1992).

A presença de resíduos hidrofóbicos no final da molécula da α_{S1} -caseína tem influência na sua adsorção e na sua conformação (auto-montagem). Diferente da β -caseína, a α_{S1} -caseína tem a forma de um agregado de cadeia longa. Esta associação é regida pela combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (FOX, 1992).

O pH determina o tipo de carga e sua distribuição na molécula da proteína. O limite e a intensidade das interações eletrostáticas são dependentes da força iônica da solução. As forças eletrostáticas possuem um papel importante na determinação da estabilidade estrutural e na interação com outras moléculas. A interação eletrostática da estrutura da proteína e a interação intermolecular podem ser investigadas pela variação do pH

ou concentração de sais. A conformação da proteína é estável quando está próxima do pI por causa da atração eletrostática entre grupos de cargas opostas. Em valores superiores ou inferiores ao pI da proteína ocorre comportamento característico devido à repulsão eletrostática entre os grupamentos carregados (DICKINSON e McCLEMENTS, 1996).

Todas as caseínas, exceto a κ -caseína, mostram uma forte tendência em adsorver fluidos nas interfaces (óleo e água e ar-água), e portanto são importantes estabilizantes de emulsões. As propriedades estabilizantes de emulsões da caseína são conferidas pela estrutura de α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína. As β -caseínas e α_{s1} - caseínas compõem mais de 75% da proteína total, e são responsáveis pela excelente propriedade emulsificante. Observou-se que nas emulsões elaboradas por isolados de β -caseína houve maior adsorção competitiva nas interfaces das partículas, quando comparadas às emulsões com α_{s1} -caseína. A β -caseína demonstrou ter maior atividade superficial em relação às outras caseínas (FANG e DALGLEISH, 1993; DICKINSON, 1994).

A caseína pode ser obtida pela precipitação ácida ou enzimática do leite desnatado. Porém, o caseinato de sódio normalmente é elaborado apenas por precipitação ácida seguida de neutralização com hidróxido de sódio (grau alimentício) e desidratado em secadores tipo *spray*. Este tratamento resulta na remoção de fosfato de cálcio coloidal, que mantém a interação entre as caseínas responsáveis pela formação das micelas. Esse produto apresenta um elevado grau de pureza contendo entre 90 e 94% de proteína (GORDON e KALAN, 1980).

3.2.2 β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina é a maior proteína do soro e é a mais caracterizada e descrita de todas as proteínas dos alimentos. Possui uma estrutura consideravelmente organizada e uma estrutura terciária compacta. Em pH neutro, a β -lactoglobulina é composta por um dímero mantido por interação eletrostática entre os ácidos aspártico (asp^{130}) e glutâmico (glu^{134}) de um dos monômeros, com o resíduo de lisina do outro monômero. Cada monômero contém 2 ligações dissulfeto intramoleculares, cisteína ($\text{cys}^{66} - \text{cys}^{160}$) e ($\text{cys}^{106} - \text{cys}^{119}$) e um grupo tiol, cys^{121} (Figura 5) (KINSELLA e WHITEHEAD, 1996).

A desnaturação da β -lactoglobulina envolve a dissociação do dímero para monômero, com mudança na conformação da cadeia do polipeptídeo e, como consequência, a agregação. Os agentes desnaturantes podem ser os álcalis, o tratamento térmico, compostos orgânicos e íons de metais pesados. A temperatura de desnaturação da β -lactoglobulina ocorre acima de 65°C , embora seja dependente do pH. Estudos de desnaturação protéica utilizando calorímetro de varredura diferencial revelaram que, em pH 6,5, a temperatura de desnaturação foi de 80°C , enquanto que, em pH 8, a temperatura foi de 60°C . Dependendo do binômio tempo e temperatura acontece intensa transição conformacional (expansão molecular) que expõe os grupos nucleofílicos nas regiões hidrofóbicas (FOX, 1992).

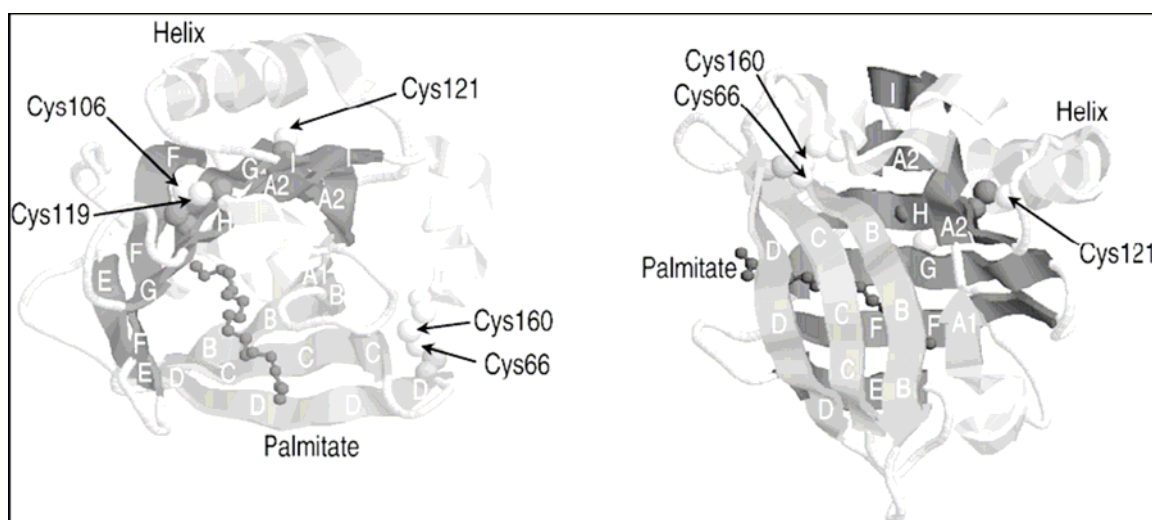


Figura 5 - Diagrama tridimensional da estrutura da β -lactoglobulina com as posições relativas dos resíduos de cisteína e palmitato. (Conisidine *et al.*, 2007)

Em pH neutro, o tratamento térmico pode promover dissociação, parcial desnaturação ou agregação da β -lactoglobulina. A intensidade e a forma de alteração são dependentes da concentração da proteína, pH, temperatura e outros fatores. Os dois maiores fatores de agregação estão relacionados à associação hidrofóbica e às reações de trocas de pontes dissulfeto. Em soluções neutras e em temperaturas moderadas, entre 45 e 60°C , pode haver mudança na conformação e desnaturação parcial da estrutura terciária da β -lactoglobulina, com agregação e perda de solubilidade. Nesta faixa de temperatura ocorrem algumas reações envolvendo pontes dissulfeto que são irreversíveis, e essas reações são importantes para manutenção da estrutura nativa (FOX, 1992).

O pH do sistema influencia na carga das proteínas do soro. As proteínas podem apresentar carga negativa ou positiva em pH abaixo ou acima do seu pI respectivamente. Na proximidade do pI as proteínas geralmente se apresentam insolúveis devido a falta de repulsão eletrostática que conseqüentemente promove a agregação e precipitação. O mesmo não é observado com a β -lactoglobulina, por causa de sua alta solubilidade no pI (5,2). Isto se deve a maior proporção de resíduos hidrofílicos na superfície de grupos apolares dessa proteína. Acima do pH 6,5, os dímeros encontram-se individualizados por causa da repulsão eletrostática (FOX, 1992; DAMODARAN, 1996; SGARBIERI, 1996).

A força iônica afeta a solubilidade das proteínas de acordo com as espécies de sais e sua valência. Concentrações de sais acima de 0,1 M aumentam a solubilidade, mas acima de 0,15M podem reduzi-lo. As soluções de íons exercem influência sobre a carga da proteína, sobre a hidratação e interação eletrostática. Na oxidação lipídica pode ocorrer ligação cruzada das proteínas e perda de funcionalidade (KINSELLA e WHITEHEAD, 1996).

3.3 PECTINA

As pectinas são importantes agentes geleificantes ou estabilizantes em alimentos com baixo pH, tais como bebidas lácteas acidificadas e iogurtes. A pectina é um polissacarídeo associado com a celulose e hemicelulose, conferindo firmeza e estrutura aos tecidos. Estes carboidratos estão presentes nas paredes das células de todos os tecidos de plantas superiores. A composição e as propriedades dessas pectinas variam com a fonte, com os processos e subseqüentes tratamentos usados na extração. Esses polissacarídeos geralmente apresentam caráter aniônico (BEMILLER e WHISTLER, 1996; KAZMIERI *et al.*, 2003).

Vários estudos clínicos vêm comprovando os efeitos benéficos nutricionais e fisiológicos da pectina na saúde humana. Algumas dessas funções são determinadas pela estrutura química, enquanto que outras são mais relacionadas às propriedades físicas. A pectina é uma fibra dietética, pois não é digerida pelas enzimas produzidas pelos humanos. Embora não digerida e absorvida no trato gastrointestinal superior, a pectina pode ser fermentada pela microbiota colônica no cólon para produzir CO₂, CH₄, H₂, ácidos graxos de cadeia curta, principalmente acetatos, propionatos e butiratos. Esses ácidos graxos são fontes

energéticas potenciais do cólon, proporcionando energia e efeitos metabólicos adicionais. Os efeitos clínicos da pectina estão relacionados: ao metabolismo de carboidratos, (favorecendo o controle glicêmico em diabéticos), ao metabolismo de lipídeos (reduz a absorção do colesterol total e outras frações), efeito benéfico contra o câncer do cólon (quando associado ao óleo de peixe é potencializado) e efeito na absorção de nutrientes. Alguns estudos têm demonstrado que a pectina pode absorver metais e minerais (Zn, Ca, Mg, Fe), bem como pode interferir na absorção de vitaminas (KIM *et al.*, 1996, WANG *et al.*, 2002).

3.3.1 Pectina cítrica

As duas principais fontes de pectina são provenientes de algumas variedades de maçãs e os bagaços de laranja após extração do suco. As substâncias pécnicas existem em frutas e vegetais como protopectinas, pectinatos e pectatos. A protopectina é encontrada em maior concentração nos tecidos em crescimento. Em tecidos de plantas, durante o crescimento e maturação, existem ácidos pectínicos que, ao serem hidrolizados por enzimas, convertem-se em ácido pécnicos. Por meio da reação de qualquer cátion disponível acontece a desesterificação e, por conseqüência, formam-se os pectinatos. Os pectinatos consistem de uma mistura heterogênea de unidades de pectinas com diferentes graus de polimerização e metilação, com ligações cruzadas aleatórias, por meio de cátions polivalentes. A extração ocorre por hidrólise ácida, seguida de clarificação, precipitação alcoólica ou salina e neutralização alcalina. O concentrado é filtrado, prensado e desidratado (BAKER, 1970).

São substâncias pécnicas, os polímeros em que o ácido galacturônico se encontra metil-esterificado (pectinas), os polímeros em que este se encontra desesterificado (ácidos pécnicos) e os polissacarídeos neutros que, apesar de não possuírem uma cadeia de ácido galacturônico, se encontram geralmente em associação com as pectinas (arabinanas, galactanas e arabinogalactanas). As pectinas são cadeias lineares compostas por resíduos de ácido D-galacturônico, com as ligações α - (1→4) interrompidas pontualmente por resíduos de L-ramnose com ligação α - (1→2). A pectina pode ser desesterificada mediante a ação de ácidos, álcalis ou processos enzimáticos, resultando em ácidos pécnicos e polímeros de ácido α -D-galacturônico (BEMILLER e WHISTLER, 1996).

A qualidade da pectina pode ser monitorada por viscosidade. A viscosidade em solução aquosa é dependente de vários fatores, principalmente concentração, pH, grau de polimerização, grau de metilação e tipo de cátion capaz de formar sal com ácidos pécticos. A geleificação é consequência da formação de uma fase tridimensional contínua, formada pelas ligações cruzadas entre os polímeros das moléculas. As pectinas são solúveis em álcool, em água e parcialmente solúveis em xarope. Os ácidos pécticos são solúveis somente na forma de sais de sódio e potássio. As pectinas comerciais são classificadas de acordo com o grau de metoxilação e pelo conteúdo de ácidos pécticos: pectina com alto grau de metoxilação ($\geq 50\%$ de grupos carboxílicos), com formação de gel na presença de açúcar e pH menor ou igual a 3,5, e pectina com baixo grau de metoxilação ($< 50\%$ de grupos carboxílicos), com formação de gel na presença de cálcio e em pH menor que 6 (BEMILLER e WHISTLER, 1996; KAZMIERI *et al*, 2003).

3.3.2 Pectina de Beterraba

A pectina da beterraba (*Beta vulgaris*), é extraída do resíduo da polpa de beterraba, e encontra aplicação na nutrição animal. Esta pectina não é muito utilizada industrialmente porque apresenta baixa capacidade geleificante, limitação funcional que é atribuída principalmente à presença do grupo éster acetila e ao reduzido tamanho da molécula (PEPPEN *et al.*, 1950; MICHEL *et al.*, 1985). A polpa de beterraba consiste em 23% de celulose, 21% de arabinana, 19% de pectina, 14% de outros açúcares, 6% de proteínas, 5% de ligninas, 1% de gordura e 12% de cinzas. A pectina de beterraba pode ser extraída com água quente seguida de agentes sequestrante ou álcalis, mas este método fornece pequena concentração de ramnogalacturonana e galacturoana. Por outro lado, a extração ácida permitiu bom rendimento de pectina de beterraba, com elevado conteúdo de galacturonana (GUILLON e THIBAUT, 1988).

A pectina de beterraba é formada por uma região de homogalacturonana (“região lisa”) com um resíduo de ácido galacturônico de ligação α -(1,4). Esta estrutura também possui ramificação (“região cabeluda”), que é composta de açúcares neutros, particularmente D-galactose, L-arabinose, L-ramnose, e ácido D-galacturônico. A pectina de beterraba difere de outras pectinas devido à maior proporção de “região cabeluda”, contendo ácido acético na posição C2 e C3 do resíduo de ácido galacturônico, e também ésteres

fenólicos (ácido ferúlico) ligados ao resíduo de galactose e arabinose na cadeia lateral. Parte dos grupos ácido-galacturônicos tem substituição dos grupamente acetilas. As pectinas também contêm uma pequena porcentagem de proteína, sendo significativamente maior na pectina de beterraba (10,4 %) quando comparada à pectina de maçã (1,6%) e à pectina cítrica (3-3,3%) (THIBAUT *et al*, 1993).

Os tecidos imaturos contêm quantidades traços de compostos fenólicos, tais como os ácidos p-cumárico, ferúlico e p-hidroxibenzóico, que podem desempenhar funções de ligações cruzadas entre os polissacarídeos. Na parede celular de algumas plantas pertencentes à família Amaranthaceae (*Cariophyllales*), tais como beterraba (*Beta vulgaris*), espinafre (*Spinacia oleraceae*) e outras, existem polímeros de ácidos pécticos ligados a algum composto fenólico, geralmente ácido ferúlico (FRY, 1983). O ácido ferúlico é um ácido fenólico de baixa toxicidade que pode ser absorvido e facilmente metabolizado no corpo humano. O ácido ferúlico tem sido reportado por exercer diversas funções fisiológicas, incluindo antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, além de atividades anti-trombose e anti-carcinogênica. Este também protege contra doenças coronárias, reduz o índice de colesterol e aumenta a viabilidade no esperma (OU e KWOK, 2004).

3.4 EMULSÕES

A emulsão é definida como um mistura heterogênea de dois líquidos imicíveis, onde um está disperso no outro sob a forma de glóbulos ou gotículas, com diâmetro em geral maior do que 0,1 μm . Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, o que geralmente exige inclusão de aditivos tais como estabilizantes, incorporação de sólidos, polímeros, entre outros (MYERS, 1991).

As emulsões são termodinamicamente instáveis e vários processos levam a mudança na distribuição do tamanho e na estrutura da emulsão. A estabilidade das emulsões depende de fatores, tais como: tamanho das partículas, viscosidade do meio, quantidade insuficiente de estabilizantes, forças inter-atômicas (atração e repulsão por cargas na superfície das partículas), pH do meio, etc. (DALGLEISH, 1997).

A estabilidade da emulsão pode ser definida como a capacidade de resistir à mudança nas suas propriedades ao longo do tempo. Quanto mais estável a emulsão, mais lentamente suas propriedades mudam. Uma emulsão pode tornar-se instável devido a

diferentes tipos de processos físicos e químicos. Os fenômenos de instabilidade física possíveis de ocorrerem em emulsões são: coalescência partícula-partícula, floculação, inversão de fase, cremificação e maturação de Ostwald. A oxidação e a hidrólise são exemplos de instabilidade química (McCLEMENTS, 2005).

A coalescência é um processo pelo qual duas ou mais partículas se unem para formar uma única partícula grande. Este fenômeno pode ocorrer após a homogeneização devido a aproximação dos corpúsculos dispersos que formam uma partícula maior promovendo a formação de creme ou de sedimentos (Figura 6). A coalescência de lipídeos pode levar a formação de uma camada de creme na parte superior da emulsão. Este fenômeno é dependente da natureza do emulsificante usado para estabilizar o sistema (McCLEMENTS, 2005).

A floculação e a agregação ocorrem em emulsões com quantidade insuficiente de estabilizante ou, quando em excesso, o estabilizante promove atração eletrostática entre as partículas. A floculação é um processo resultante de uma aglomeração temporária, onde duas ou mais partículas associam-se entre si, mas as partículas mantêm sua individualidade. Esse fenômeno pode ser reversível (floculação fraca) ou irreversível (forte floculação ou coagulação). A floculação pode ser controlada desenvolvendo-se uma emulsão que apresente uma interação repulsiva entre as partículas maior do que a interação atrativa. Para controlar a floculação em um sistema, é interessante identificar o tipo de interação coloidal, por exemplo, força de Van-der-Waals, estérica, eletrostática, hidrofóbica ou depleção (McCLEMENTS, 2005). A agregação ocorre por forças intermoleculares de atração, resultando em material adsorvido. A camada de proteína adsorvida na superfície da partícula apresenta uma carga que mantém distância entre as partículas, porém com a redução do pH (próximo ao ponto elétrico), ocorre uma neutralização de cargas, favorecendo a agregação (DALGLEISH, 1997).

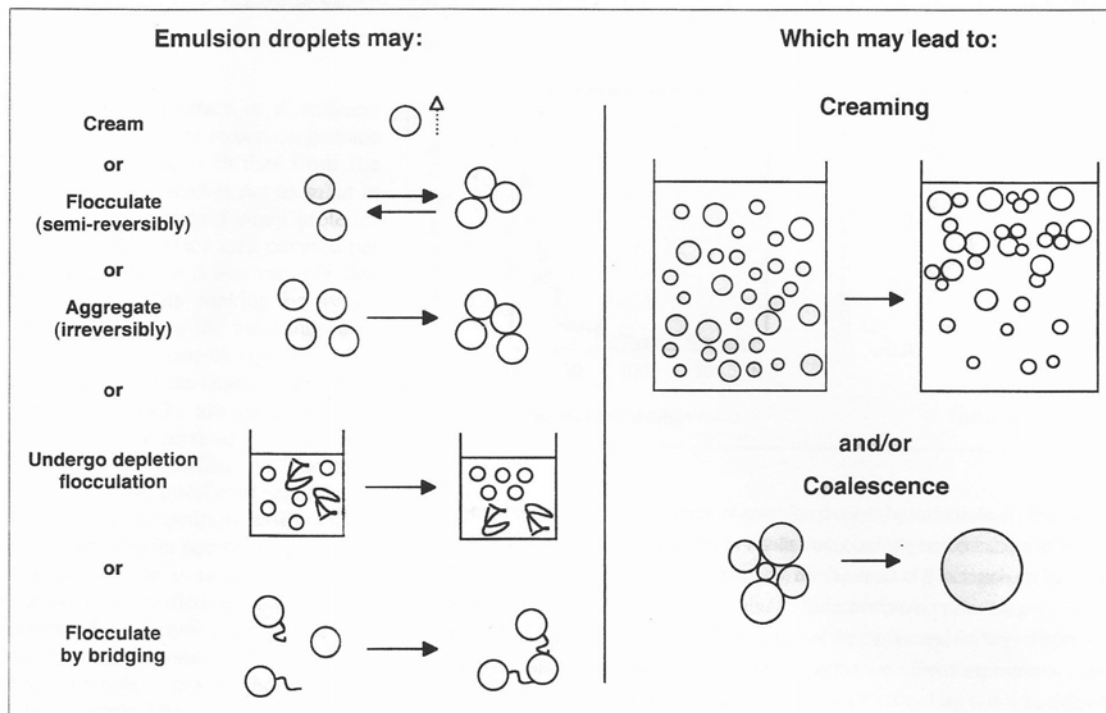


Figura 6 – Fenômeno de instabilidade de emulsões (DALGLEISH, 1997).

A estratégia empregada em muitas emulsões alimentícias é controlar a floculação através da repulsão eletrostática, gerada por emulsificantes carregados eletricamente. A estabilidade dessas emulsões depende das propriedades elétricas das partículas, do pH e da concentração de compostos iônicos em soluções aquosas. A carga e a constante de dissociação dos emulsificantes determinam o comportamento elétrico das partículas sob diferentes condições do meio. Deste modo, para cada tipo de produto é necessário selecionar um emulsificante com características elétricas apropriadas. Em emulsões estabilizadas por proteínas do leite, a carga elétrica das partículas vai de positiva, em pH abaixo do seu ponto isoelétrico, à negativa, em pH superior ao ponto isoelétrico. Esta carga na superfície da partícula influencia na estabilidade das emulsões formadas por proteínas (DEMETRIADES *et al.*, 1997).

Muitos tipos de biopolímeros promovem a floculação por formação de pontes entre duas ou mais partículas e o fenômeno pode ser denominado de floculação por pontamento (Figura 7). Os biopolímeros podem adsorver as superfícies das partículas sem emulsificante ou interagir com moléculas que formam a membrana interfacial. A interação que normalmente ocorre neste caso é hidrofóbica e eletrostática. Este tipo de floculação tende

a ocorrer quando um biopolímero é usado como emulsificante em baixa concentração, devido à limitação no recobrimento de toda a superfície da partícula. Este fenômeno também pode ocorrer quando um biopolímero na fase contínua tem uma carga elétrica oposta ao estabilizante presente na interface da partícula (DICKINSON, 2003)

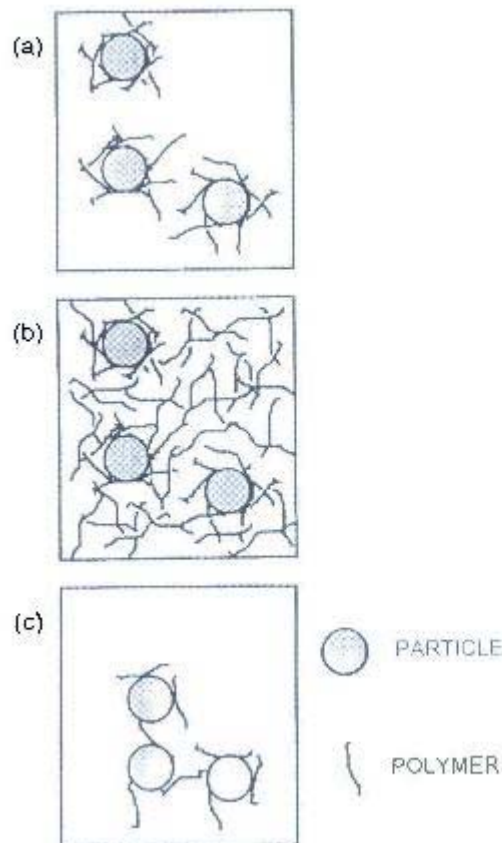


Figura 7 – Efeito da adsorção de polímeros na interface das partículas em emulsão em função da concentração do hidrocolóide e da natureza da interação. (a) emulsão estericamente estável, (b) gel de emulsão (excesso de polímero) e (c) floculação por ponteamto (DICKINSON, 2003)

A presença de partículas coloidais, tais como biopolímeros ou micelas de emulsificantes na fase contínua da emulsão, causa um aumento na força de atração entre as partículas devido ao efeito da pressão osmótica por exclusão de partículas coloidais na região circundada. A intensidade da força de atração é diretamente dependente do aumento da concentração das partículas coloidais dispersas em solução, ou seja, o tamanho da partícula aumenta devido ao acúmulo do emulsificante na superfície das partículas, superando as forças de repulsão e conseqüentemente ocorre a floculação (Figura 7). A concentração requerida para causar a floculação por depleção é referida como concentração de floculação crítica. Este

parâmetro é adotado para caracterizar o efeito dos sais na estabilidade de emulsões formadas por partículas carregadas eletrostaticamente. Concentrações abaixo do limite crítico para floculação apresentam um aumento no tamanho de partícula, devido a limitação do emulsificante para recobrir a superfície das partículas (McCLEMENTS, 2000).

Devido à tensão interfacial entre as duas fases, a emulsão sem adição de estabilizantes, sofre colapso com o tempo, resultando em separação de fases. O agente estabilizante apresenta caráter anfifílico, pois apresenta afinidade com as fases água e óleo. Este é absorvido na partícula e orienta a interface líquido-líquido, ou seja, o grupo lipofílico é orientado para a fase lipídica e o grupo hidrofílico é direcionado à fase aquosa. Esta orientação diminui a tensão interfacial entre as fases, estabilizando a emulsão ou espumas (DAMODORAN, 1990). Os emulsificantes normalmente utilizados na indústria alimentícia são emulsificantes de moléculas pequenas, biopolímeros anfifílicos e compostos com superfície ativa. Estes emulsificantes variam amplamente na sua capacidade de formar e estabilizar emulsões dependendo de sua característica físico-química e molecular. Os emulsificantes formam uma membrana interfacial que previne a agregação (floculação e/ou coalescência), sob condições do meio, tais como processamento, transporte, estocagem e utilização. A característica dos emulsificantes depende da natureza do grupo cabeça e cauda. Os grupos que compõem a cabeça podem ser aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos ou não-iônicos (MYERS, 1991). Os emulsificantes não-iônicos são os comumente aplicados na indústria de alimentos e são constituídos de monoglicerídeos, polisorbatos, spans, entre outros (McCLEMENTS, 2005).

Em pH neutro, a caseína adsorvida na superfície das partículas em emulsão proporciona excelente proteção contra a coalescência devido ao mecanismo de estabilização eletrostática e estérica. Em moderada concentração de caseína em emulsão não ocorre o problema de cremificação lenta, floculação, separação de fase e gelatinização (DICKINSON e GOLDING, 1997).

Os fatores que favorecem a floculação por depleção das emulsões estabilizadas por caseína são: cloreto de sódio, cálcio iônico (Figura 8), etanol, pH, temperatura elevada e competição com emulsificante aniônico e não-iônico (RADFORD e DICKINSON, 2004).

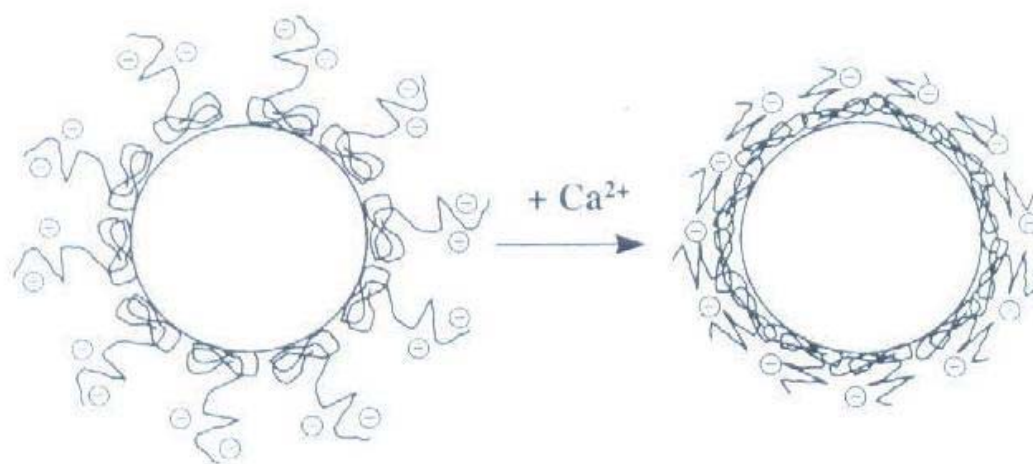


Figura 8 – Influência da adição de cálcio na emulsão formada por caseína. O ponteamto do íon cálcio diminui a carga da molécula de proteína (perda de estabilidade eletrostática) e diminui a espessura da camada adsorvida (perda de estabilidade estérica) (DICKINSON e DAVIES, 1999).

As emulsões produzidas em pH próximo ao pI (pH 4,6) da caseína têm demonstrado problemas de floculação. Isto se deve à redução da carga da molécula de proteína adsorvida na interface das partículas, levando à redução da densidade de carga na superfície e, conseqüentemente, à perda da estabilidade eletrostática. Deste modo, não acontece a repulsão entre as partículas, e ocorre a agregação (DICKINSON e McCLEMENTS, 1996).

3.4.1 Emulsão multicamada

A tecnologia da engenharia interfacial ou a produção de membrana interfacial multicamada baseia-se na deposição eletrostática de biopolímeros carregados na superfície de partículas com cargas opostas. Esta tecnologia pode ser aplicada em emulsões para aumentar a resistência ao estresse do meio ou proporcionar estabilidade ao material encapsulado com a propriedade de liberação de compostos. A emulsão formada por esta tecnologia consiste em recobrir a partícula de óleo com uma membrana interfacial multicamada, composta por uma camada de emulsificante e uma ou mais camadas de biopolímeros (OGAWA *et.al.*, 2003a, b; GU *et.al.*, 2004).

A membrana interfacial multicamada pode ser usada para controlar as características interfaciais, tais como: carga, espessura e composição, bem como pode ser usada para controlar as propriedades físico-químicas dos compostos em emulsão. Esta tecnologia poderia ser aplicada em encapsulação e liberação de compostos ativos (antimicrobianos ou enzimas), em resposta a atividade do meio, por ação do pH, sais, concentração e temperatura (GU *et.al*, 2005).

As membranas multicamadas podem ser produzidas por deposição de um biopolímero carregado, por exemplo, carragena (GU *et al.*, 2005), quitosana (OGAWA *et.al.*, 2003a) ou pectina (MUREAU *et al.*, 2003), em uma emulsão com partículas revestidas por um emulsificante com carga oposta (β -lactoglobulinas, caseínas, lecitinas). No entanto, é importante selecionar o biopolímero compatível com o emulsificante para a elaboração de emulsões estáveis e com características físico-químicas desejáveis. Emulsões estabilizadas por multicamadas ou membranas contendo proteínas do leite e biopolímeros (por exemplo, pectina) foram utilizadas em diversos estudos (Figura 9), uma vez que a pectina cítrica possui pKa 3,5, tornando-se conveniente na elaboração de emulsões de pH inferior ao ponto isoelétrico das proteínas, condição em que essas apresentam cargas positivas (DALGLEISH e HOLLOCOU, 1997; DICKINSON *et.al.*, 1998).

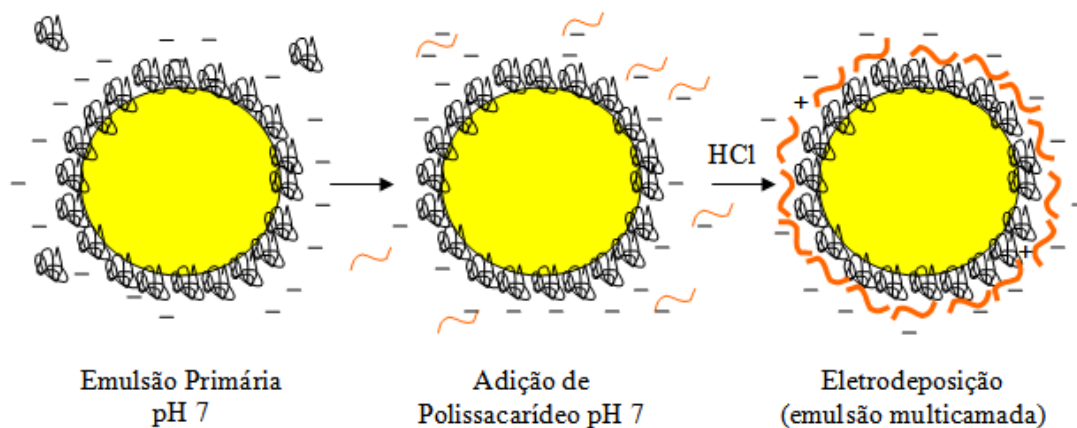


Figura 9 – Ilustração do processo de elaboração de membrana interfacial multicamada de proteína e polissacarídeo.

Estudos sobre o efeito do polissacarídeo na estabilidade de emulsões formadas por caseína demonstraram que concentrações muito baixas de pectina podem proteger as partículas envolvidas por caseinato de sódio contra a agregação, em pH inferior a 5, e que a pectina se liga à superfície da partícula ainda em valores superiores ao ponto

isoeletrico, onde ambas as moléculas estão carregadas negativamente. Estudos prévios têm demonstrado que a interação eletrostática ocorre entre moléculas de caseína e pectina sob condições parcialmente ácidas, ou seja, pH entre 3 e 5, devido à carga positiva da caseína (pH inferior ao pI) e negativa da pectina, quando o pH se encontra superior ao pKa (DALGLEISH e HOLLOCOU, 1997).

Suhr *et al.* (2005) avaliaram a influência do tipo de pectina (de elevada e de baixa metoxilação) na estabilidade física de emulsões de óleo de milho produzidas com caseína e observaram que houve agregação de partículas, de maneira irreversível, em pH inferior ao ponto isoeletrico (3,0 e 4,0), devido à neutralização das cargas, resultando em floculação por ponteamto. Segundo Dickinson & Golding (1997) o ponteamto (bridging) ocorre quando a concentração dos polissacarídeos não é suficiente para interagir com o emulsificante na membrana. Isto significa dizer que não há recobrimento da superfície das partículas, portanto não existe carga suficiente para promover a repulsão, ocasionando a neutralização das cargas, provocando uma floculação por ponteamto. Por outro lado, este problema pode ser solucionado utilizando-se maior concentração de polissacarídeo. No entanto, deve-se atentar sobre a concentração crítica de floculação, pois o excesso do polissacarídeo pode promover problemas de floculação por depleção. Este fenômeno é resultante da redução das forças de repulsão entre as partículas por saturação do polissacarídeo nas regiões entre as partículas, ocasionando a floculação (DICKINSON e GOLDING, 1997).

Moreau *et al.* (2003) caracterizou a emulsão de óleo de milho, estabilizada por β -lactoglobulina e pectina cítrica com elevado grau de metoxilação, em pH 3,0. Os pesquisadores concluíram que a pectina cítrica em concentrações superiores a 0,1% p/p apresentaram problemas de floculação por ponteamto, pois a técnica de elaboração da emulsão multicamada nesta pesquisa foi realizada pela adição da emulsão estabilizada por β -lactoglobulina na solução de pectina em pH 3,0. A estabilidade física das emulsões depende, portanto, da concentração dos emulsionantes, especialmente do polissacarídeo, pois este afeta a interação eletrostática.

Gancz *et al.* (2005 e 2006) investigaram a interação de isolado protéico do soro e pectina cítrica com elevado grau de metoxilação, em emulsão com pH 3,5, adotando ultrassom e espectroscopia. Neste estudo os pesquisadores identificaram que as emulsões adicionadas de 0,02 e 0,04% de pectina apresentaram-se estáveis, enquanto que, concentrações superiores a 0,06%, demonstraram problemas de floculação por ponteamto, levando à mudança no tamanho e distribuição das partículas.

Pongsawatmanit *et al.* (2006), avaliaram a influência do pH na estabilidade de emulsões formadas por β -lactoglobulina e alginato de sódio. Neste estudo, os autores concluíram que o alginato foi totalmente adsorvido na superfície das partículas recobertas com β -lactoglobulina em pH 3 e 5, embora tenham apresentado problemas de floculação e cremificação. Os pesquisadores sugeriram o uso de re-homogeneização por sonificação das amostras para aumentar a estabilidade à cremificação. Em elevado pH (6,0 e 7,0) não foi observado agregação, uma vez que, tanto a proteína como o alginato apresentaram cargas negativas, não ocorrendo a adsorção na superfície das partículas.

**4 ARTIGO 1:
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM
MEMBRANA DE CASEÍNA E PECTINA.**

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM MEMBRANA DE CASEÍNA E PECTINA.

Resumo

O estudo consistiu na avaliação da estabilidade física das membranas de caseína e pectinas em diferentes concentrações e pH entre 3 e 7. A emulsão estoque, formada por 1% de caseína e 10% de óleo de peixe, foi adicionada em soluções de pectinas cítricas ou de beterraba em concentrações entre 0,025 a 0,4% m/m, em 5 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7. Essa emulsão foi diluída na proporção de 1:10 m/m e acidificada até pH desejado com solução 1,0 e 0,1N de HCl, resultando na emulsão secundária. As amostras foram submetidas à análise do diâmetro médio da partícula, potencial zeta e índice de cremificação. Definiu-se, para fins de ensaio preliminar, a concentração de 0,2% de pectina cítrica ou de beterraba para estudar a estabilidade em diferentes níveis de pH. O estudo da influência do pH (entre 3 e 7) na estabilidade física dessas emulsões consistiu na avaliação do diâmetro médio das partículas, potencial zeta e índice de cremificação em emulsões secundárias. Em pH acima de 3,5, a estabilidade das emulsões foi afetada pela tendência à agregação apresentada pela caseína na proximidade de seu ponto isoelétrico. No entanto, as emulsões secundárias apresentaram-se instáveis em pH inferior a 3,5 devido ao pKa das pectinas. Esse resultado levou a concluir que, nas condições estudadas, as membranas formadas pela caseína e pectinas avaliadas não proporcionaram estabilidade física às emulsões.

PALAVRAS CHAVES: Estabilidade física, caseinato de sódio, pectina cítrica, pectina de beterraba, floculação por ponteamto, floculação por depleção.

Abstract

The study consisted of casein and citric or sugar beet pectin membrane physical stability evaluation in different concentration and pH 3 to 7. Stock emulsion was made by 1% casein and 10% fish oil, it was diluted in 1:10 w/w proportion at pectin solution concentration between 0,025 to 0,4% w/w in 5 mM sodium buffer phosphate, pH 7. This emulsion was acidified until defined pH with 1,0 and 0,1 N HCl. The sample was analyzed using zeta (ζ) potential, particle size and creaming stability measurements. It was established 0,2% w/w pectin (citrus or sugar beet) concentration for physical stability in different pH study. The pH influence (3 to 7) for physical stability in the secondary emulsion consisted on particle size, ζ -potential and creaming stability measurements. Above pH 3,5, emulsion stability was affected by casein aggregation tendency next to the isoelectric point. Pectin pKa was responsible for the instability observed in the secondary emulsion below pH 3,5. These results demonstrated that, in the studied conditions, the casein and pectin membranes were not suitable for emulsion physical stability.

KEYWORD: Physical stability, sodium caseinate, citrus pectin, sugar beet pectin, bridging flocculation, depletion flocculation.

4.1 Introdução

A utilização de óleos com elevado teor de ácidos graxos ômega-3 em alimentos é limitada devido a sua susceptibilidade à oxidação (KULAS *et al.*, 2003). A oxidação lipídica pode ser reduzida pela adição de antioxidantes ou pela encapsulação do óleo. A estabilidade oxidativa das emulsões com óleos insaturados pode ser estendida pelo controle do tipo de emulsificante e sua concentração. Por exemplo, quando partículas de emulsões óleo e água são estabilizadas por emulsificantes catiônicos, os metais pró-oxidantes são repelidos e a taxa de oxidação lipídica diminui (MANCUSO *et al.*, 1999, HU *et al.*, 2003).

A caseína tem uma forte tendência de adsorver interfaces óleo/água e estabilizar óleos ou glóbulos de gordura durante o processo de emulsificação. Isto se deve a sua estrutura semi-desnaturada e substancialmente hidrofóbica, que conseqüentemente forma uma camada espessa na membrana, a qual protege as partículas contra coalescência ou floculação (DICKINSON *et al.*, 1988). O caseinato de sódio comercial vem sendo largamente empregado como ingrediente alimentar devido a sua propriedade emulsificante, espessante, geleificante e ligante de gordura. Em pH neutro a caseína adsorvida na superfície das partículas proporciona excelente proteção contra coalescência devido a combinação do mecanismo de estabilização eletrostática e estérica. Em emulsão com concentração moderada de caseína não ocorre cremificação lenta, separação de fase ou gelatinização (DICKINSON e GOLDING, 1997). Porém, essas emulsões em pHs próximos ao pI (pH 4,7) da proteína tem demonstrado problemas de floculação por causa da redução de repulsão eletrostáticas entre as partículas (DICKINSON e McCLEMENTS, 1996).

O pH determina a carga predominante e a distribuição de carga na molécula da proteína. O limite e a intensidade das interações eletrostáticas são dependentes da força iônica da solução. As forças eletrostáticas desempenham um papel importante na determinação da estabilidade estrutural e a interação com outras moléculas. A interação eletrostática e a interação intermolecular na proteína podem ser investigadas pela variação do pH ou concentração de sais (DICKINSON e McCLEMENTS, 1996) e avalia-se tal fenômeno por meio do potencial zeta (potencial ξ), que tem como objetivo determinar a natureza da interação entre as partículas com outras espécies eletricamente carregadas ou verificar seu comportamento na presença de um campo elétrico (McCLEMENTS, 2005).

Outra medida importante na avaliação da estabilidade de emulsões é o diâmetro médio de partículas, este se caracteriza pelo diâmetro médio do volume equivalente, $D[4,3]$ ou d_{43} , e é definido por:

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

onde, n_i é o número de partículas de diâmetro d_i .

Este valor é similar a um volume médio (ou peso, se a densidade for constante) de uma distribuição que poderíamos obter por “peneiramento”. O parâmetro d_{43} é um parâmetro sensível à presença de grandes partículas na emulsão, permitindo detectar o fenômeno da floculação (McCLEMENTS, 2005).

Para emulsões óleo/água elaboradas com proteínas de leite, o tamanho de partícula inicial é um fator importante para garantir a estabilidade. Em condições de repouso, ocorre a cremificação, que é um dos fenômenos de instabilidade mais comuns, como consequência da distribuição do tamanho médio das partículas. Em sistemas muito instáveis ocorre uma rápida cremificação levando a coalescência de partículas grandes na camada de creme e uma separação visível na fase dispersa (perda de óleo). Outro fator importante que influencia na cremificação é a floculação das partículas. Em emulsões concentradas, ocorrem alterações no comportamento reológico, o qual é sensível à agregação das partículas e à interação coloidal. O estado de agregação depende da interação entre as camadas de proteína adsorvidas em diferentes partículas, e depende de fatores, tais como: cobertura da superfície das partículas pela proteína, a espessura da membrana, a densidade da carga e condições da solução aquosa (pH, concentração de íons) (DALGLEISH, 1998; DICKINSON, 1999).

A elaboração de emulsões por deposição eletrostática camada-camada produz partículas recobertas por uma membrana interfacial multicamada, aumentando a estabilidade da emulsão. A membrana interfacial multicamada confere aumento de estabilidade ao estresse físico do meio, promovido por temperatura, agitação mecânica, pH, presença de minerais (OGAWA *et al.*, 2003a,b; GU *et al.*, 2004; McCLEMENTS, 2004; GU *et al.*, 2005). As membranas multicamadas são produzidas por deposição de um biopolímero carregado em uma emulsão com partículas revestidas por um emulsificante com carga oposta. Por outro lado, é importante selecionar o biopolímero compatível com o emulsificante para elaborar emulsões estáveis e com características físico-químicas desejáveis. Emulsões estabilizadas por multicamadas ou membranas contendo proteínas de leite e biopolímeros (por exemplo, pectina) foram utilizadas em diversos estudos, uma vez que a pectina cítrica possui pKa 3,5,

tornando-se conveniente na elaboração de emulsões de pH inferior ao ponto isoelétrico das proteínas (no caso da caseína 4,6), condição em que essas apresentam cargas positivas (DALGLEISH e HOLLOCOU, 1997; DICKINSON *et.al.*, 1998; MUREAU *et al.*, 2003; SUHR *et. al.*, 2005).

Muitas pectinas comerciais usadas na indústria alimentícia são extraídas de plantas, geralmente de maçãs e frutas cítricas e são largamente empregadas como agentes geleificantes ou estabilizantes em alimentos com baixo pH, tais como bebidas lácteas acidificadas e iogurtes. As pectinas são polissacarídeos aniônicos em soluções parcialmente ácidas devido a presença de grupos carboxílicos ao longo da estrutura. A pectina é definida como uma mistura de heteropolissacarídeos composta predominantemente de resíduos de ácidos galacturônicos metoxilados, galactanas e resíduos de arabinanas com proporções variando de acordo com diferentes fontes. Estas podem ser divididas em dois grupos de acordo com o grau de metoxilação: pectina com alto grau de metoxilação ($\geq 50\%$), que forma gel sob condições ácidas ($\text{pH} \leq 3,5$) e pectina com baixo grau de metoxilação ($< 50\%$) que forma gel por diferente mecanismo na presença de cálcio (BEMILLER e WHISTLER, 1996; THAKUR *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2002; KAZMIERI *et al.*, 2003).

A pectina da beterraba (*Beta vulgaris*) é extraída do resíduo da polpa de beterraba, sendo largamente usada para nutrição animal. Esta pectina, por apresentar baixa capacidade geleificante, não é muito utilizada industrialmente. Essa limitação funcional é atribuída principalmente à presença do grupo éster acetila e ao reduzido tamanho da molécula da pectina de beterraba (PIPPEN *et al.*, 1950; MICHEL *et al.*, 1985) . A pectina da beterraba parece conter a mesma estrutura do ácido galacturônico, parcialmente metil-esterificado e O-acetilado na posição C-2 ou C-3, adicionado de ácido fenólico nas cadeias laterais (ácido ferúlico) o qual é ligado à arabinose e à galactose por ligação éster (FRY, 1983).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da concentração da pectina cítrica ou de beterraba e em diferentes pH na estabilidade física das emulsões de óleo de peixe estabilizadas por caseinato de sódio.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material

Foram utilizados fosfato de sódio monobásico e dibásico, e pectina de sal de potássio esterificado (de fruta cítrica, com grau de esterificação de 59%) da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO). A pectina de beterraba foi obtida da Herbstreith & Fox (Betapekt RU 301). A caseína foi obtida da American Company (AMCO, Burlington, NJ, US) Extra Grade (lote no. 2081) com a seguinte composição: 93% de proteína, 5,1% de umidade, inferior a 1% de gordura e 3,8% de cinzas. O óleo de peixe desodorizado, refinado e branqueado, foi doado pela Omega Protein (Reedville, VA) e continha 10-17% ácido eicosapentaenóico (AEP) e 7-12% ácido docosahexaenóico (ADH). O óleo foi envasado em tubos de vidro de 50 mL e armazenado no escuro, a -80°C. Foi utilizada água destilada e deionizada para a elaboração de todas as soluções. Todos os reagentes utilizados eram de pureza analítica.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Delineamento Experimental

O estudo consistiu na padronização da concentração da caseína necessária para estabilizar a emulsão primária de óleo de peixe, na determinação do tempo de ajuste do pH da emulsão primária, na determinação da concentração das pectinas cítrica e de beterraba para elaboração da emulsão com membranas, e avaliação da influência do pH na estabilidade física da emulsão secundária (Figura 1).

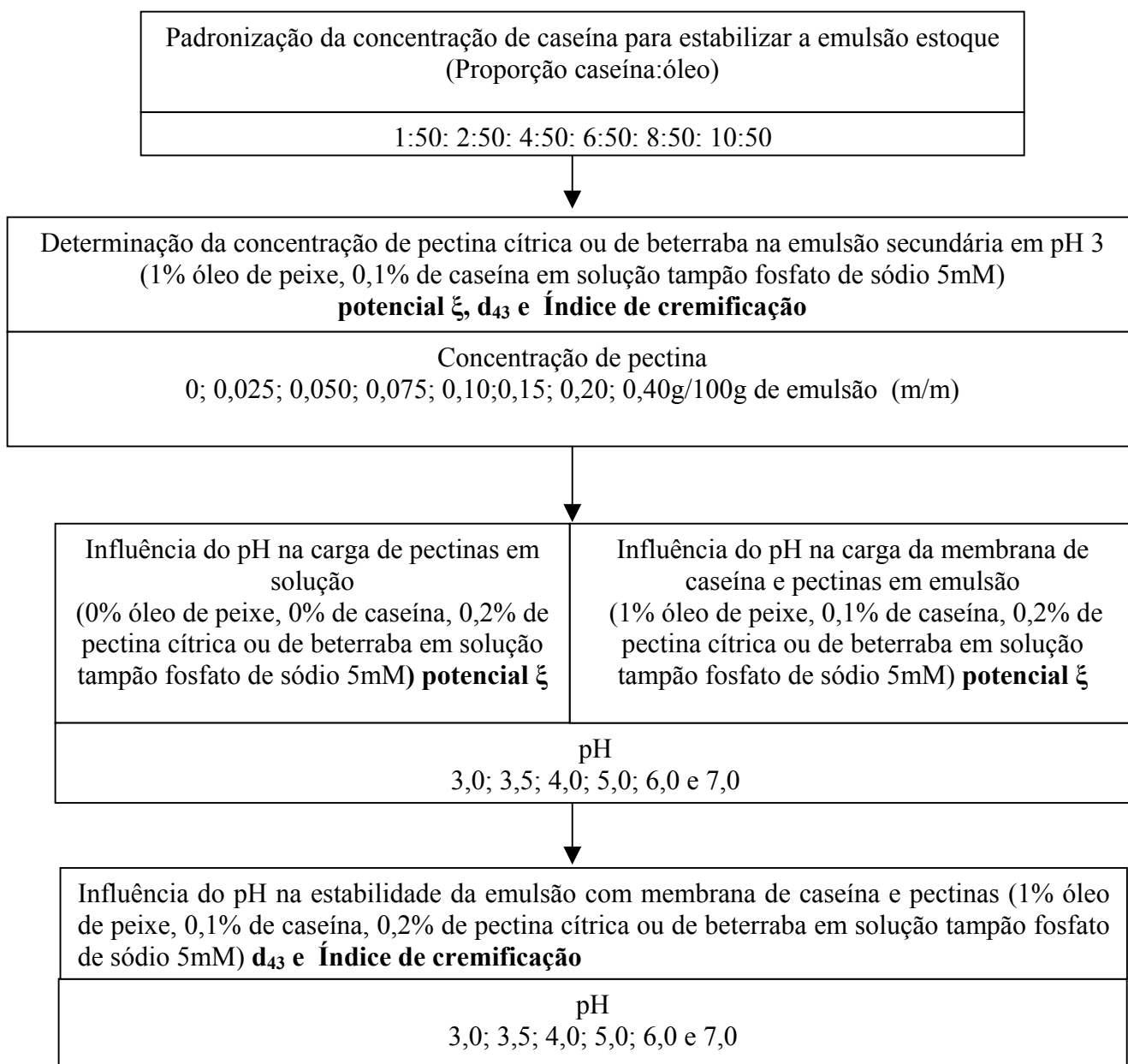


Figura 1 – Diagrama do delineamento experimental.

4.2.2.2 Elaboração da emulsão estoque

Produziu-se inicialmente uma dispersão de caseinato de sódio em tampão fosfato de sódio 5mM em pH 7. Os procedimentos de elaboração foram realizados de acordo com os descritos por Surh *et al.* (2006). A solução de caseína foi mantida sob agitação por 4 horas e depois estocada em refrigerador ($8\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 12 horas para completar a hidratação. Antes da

elaboração da emulsão, a solução de caseína foi mantida fora da refrigeração para atingir a temperatura ambiente. O óleo de peixe foi descongelado e pesado na proporção de 10% m/m da emulsão final e foi pré-homogeneizado com auxílio de um dispersor de alta velocidade (M133;1281-0, Biospec Product, Inc., ESGC, Suíça) por 2 minutos.

A pré-emulsão de óleo de peixe estabilizada por caseína foi elaborada em homogeneizador de alta pressão com válvula de duplo estágio (LAB 1000, APV-Gaulin, Wilmington, MA) em 03 passes, sob pressão de 2700 psi no primeiro estágio e 300 psi no segundo estágio, totalizando 3000 psi. A emulsão estoque foi preparada em banho de água gelada para garantir a estabilidade do óleo na fase de preparo. O pH da emulsão estoque foi ajustado com auxílio de solução HCl ou NaOH 1,0 e 0,1 N.

4.2.2.3 Elaboração da emulsão primária

A emulsão primária foi obtida por meio da diluição da emulsão estoque em solução tampão 5mM em pH 7 na proporção de 1:10 m/m, mantida sob agitação lenta durante 45 min .

4.2.2.4 Elaboração da emulsão secundária

As soluções de pectina cítrica ou de beterraba, foram elaboradas diluindo-se a solução estoque de pectina 1% m/m em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,0 e nas proporções de 0 a 0.4% m/m, com auxílio de agitador magnético durante uma hora. A emulsão secundária consistiu na diluição lenta da emulsão estoque nessa solução de pectina, na proporção de 1:10 m/m. A emulsão secundária foi submetida a agitação durante 45 minutos em temperatura ambiente, com o auxílio do agitador magnético. A acidificação foi realizada sob agitação constante, com adição de solução 1,0 e 0,1N de HCl, em tempo e volume controlados, para o ajuste do pH desejado, aguardando-se 20 min para estabilização do mesmo. A composição final das emulsões primária e secundária foi de 1% de óleo de peixe e 0,1% de caseína. As amostras de emulsão acidificada foram armazenadas em tubos de ensaio para análises físicas, 24 h após sua elaboração.

4.2.2.5 Padronização da concentração de caseína para estabilizar a emulsão estoque.

Para selecionar a melhor concentração de caseína para estabilizar a emulsão estoque avaliou-se a distribuição do diâmetro médio de partículas (d_{43}) (2.2.2.9) das diferentes proporções de caseína e óleo de peixe. Foram avaliadas as seguintes proporções de caseína/óleo de peixe: 0,2:10, 0,4:10, 0,8:10, 1:10, 1,2:10, 1,6:10 e 2:10 m/m. A proporção que apresentou maior frequência de partículas com diâmetro reduzido ($\pm 0,30 \mu\text{m}$) foi selecionada para o estudo de avaliação da estabilidade física.

4.2.2.6 Determinação do tempo de estabilização do pH na emulsão primária

Para definir o tempo de redução do pH da emulsão secundária foi necessário avaliar a estabilidade física da emulsão primária frente aos diferentes intervalos de adição de ácido clorídrico até pH 3. O ensaio consistiu na tomada do volume de ácido clorídrico na concentração 1,0 e 0,1N necessário para reduzir o pH para 3 em emulsão estoque sob mesma velocidade de rotação do agitador magnético. A partir desse volume foi calculado o volume de HCl por intervalos de tempo, com o tempo total variando de 5 a 240 min. As amostras foram avaliadas quanto a estabilidade física. A definição do tempo de estabilização do pH da emulsão ocorreu em função da condição que apresentou menor incidência de floculação (menor valor de d_{43}), menor índice de cremificação e maior potencial zeta.

4.2.2.7 Determinação da concentração das pectinas cítricas e de beterraba na emulsão secundária

Após definição dos parâmetros tecnológicos para elaboração da emulsão de óleo de peixe com caseína acidificada para pH 3, foi realizado um ensaio com a emulsão formada por membrana de caseína e pectina cítrica ou de beterraba. O ensaio consistiu na avaliação do diâmetro médio de partículas, potencial zeta e índice de cremificação das emulsões

secundárias em diferentes concentrações de pectinas (0; 0,025; 0,050; 0,075; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,40% m/m) em pH 3.

4.2.2.8 Influência do pH na estabilidade da emulsão com membrana de caseína e pectina cítrica ou de beterraba

Após a definição das concentrações de pectinas no estudo anterior, avaliou-se o efeito do pH sobre a estabilidade física das emulsões formadas por caseína e membranas de caseína e pectina cítrica ou de beterraba. Os parâmetros avaliados neste estudo incluíram a determinação do diâmetro médio das partículas, potencial zeta e índice de cremificação das emulsões primárias e secundárias em pH variando de 3; 3,5; 4; 5; 6 e 7.

Um estudo posterior incluiu a avaliação do potencial zeta das soluções de pectina cítrica e de beterraba com os mesmos valores de pH definidos anteriormente. O ajuste do pH seguiu os mesmos procedimentos realizados no item 2.2.2.4.

4.2.2.9 Diâmetro médio das partículas

As análises de d_{43} foram realizadas no equipamento de dispersão estática de luz a laser Mastersize (Malvern MSS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Para evitar o efeito do escaneamento múltiplo, as emulsões foram diluídas na razão de 1:200 v/v, usando solução tampão fosfato de sódio 5mM com o mesmo pH da amostra. Esta solução foi submetida a agitação constante durante a análise das amostras. O procedimento analítico foi adaptado do estudo de Suhr *et al.* (2006).

4.2.2.10 Potencial zeta (ζ)

Para a avaliação do potencial ζ , as emulsões foram diluídas na proporção de 1:100 v/v em solução tampão fosfato 5mM, filtrada previamente (filtro Whatman com 0,45 μ m de

porosidade) no mesmo pH da amostra. O potencial ξ das partículas foi determinado usando o equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A medida individual do potencial ξ foi determinada a partir da média de 10 leituras tomadas pelo equipamento na mesma amostra. Os procedimentos analíticos foram realizados de acordo com GU *et al.* (2004).

4.2.2.11 Avaliação da cremificação

Foram acondicionados 10 g de emulsões em tubos de ensaio (diâmetro interno de 15 mm e altura de 125 mm) com tampas plásticas e estocados por 24 horas à temperatura ambiente. Após a estocagem, as emulsões apresentavam uma camada de creme na fase superior e uma solução transparente ou turva na base (camada de soro). Para avaliar o índice de cremificação foi medida a altura total da emulsão (H_T) e da camada do soro (H_s) com auxílio de uma régua. A extensão da cremificação foi caracterizada pelo índice de cremificação como se segue: $IC (\%) = 100 \times (H_s / H_T)$. Os procedimentos analíticos foram realizados de acordo com GU *et al.* (2004).

4.2.2.12 Análise estatística

As avaliações de d_{43} , potencial ζ e índice de cremificação foram realizadas em duplicata. A análise estatística realizada foi o teste de comparação de médias t-students no nível de 5% de significância.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Padronização da concentração de caseína para estabilizar a emulsão estoque

Para selecionar a proporção adequada de caseína e óleo de peixe avaliou-se a distribuição do tamanho de partículas. Os resultados demonstraram que na proporção de caseína: óleo de 0,4:10 m/m, houve uma distribuição monomodal, sendo que 8,8% das partículas apresentaram diâmetro médio em torno de 0,31 μm . Na proporção de 0,2:10 m/m o perfil de distribuição do tamanho médio de partículas foi bimodal, indicando que houve tendência à agregação por efeito limitante da concentração de proteína (Figura 2).

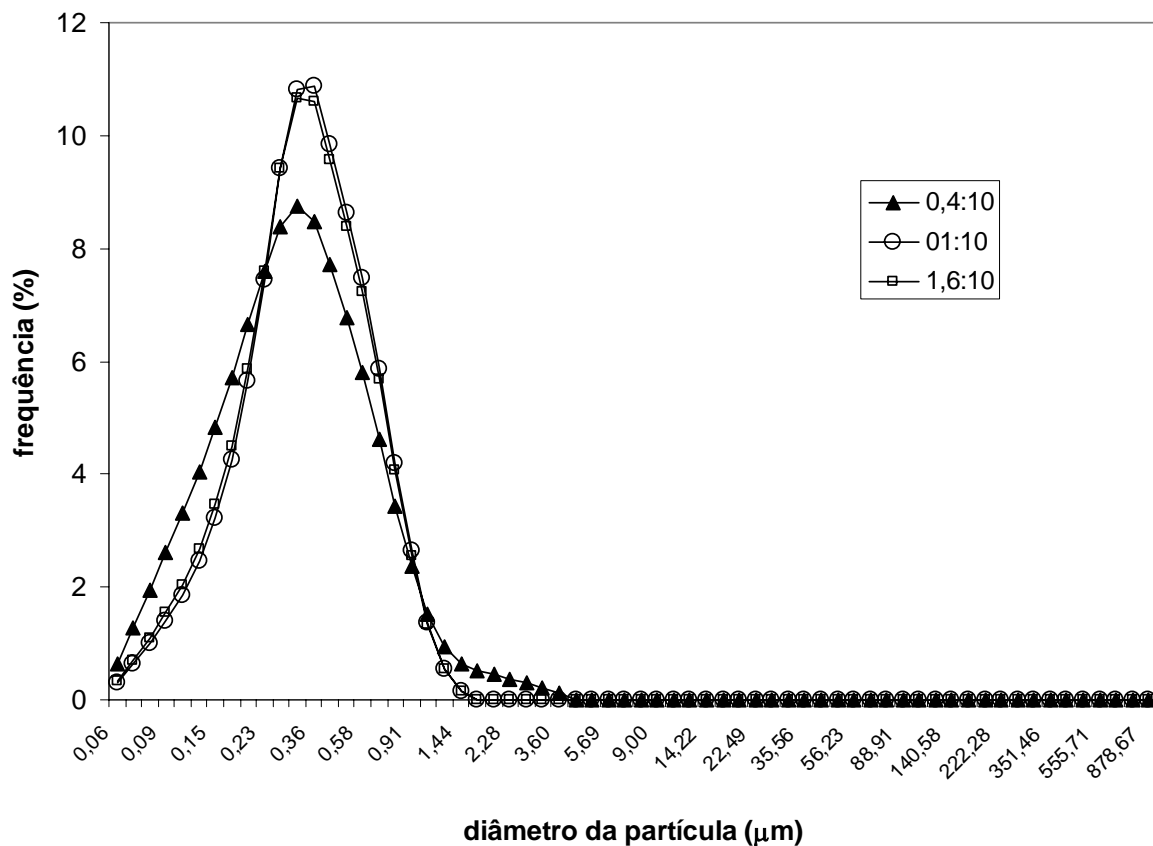


Figura 2 - Distribuição do tamanho de partículas em diferentes proporções de caseína e óleo de peixe em emulsões no pH 7.

As emulsões estudadas na proporção de 0,4:10 m/m de caseína:óleo demonstraram menor número de partículas com diâmetro médio em torno de 0,31 μm , e segundo Dickinson (2003), esse fenômeno ocorre quando os estabilizantes não proporcionaram total recobrimento na superfície das partículas. Para Dalglish (1998), em um sistema instável ocorre uma rápida cremificação levando a coalescência de partículas que formam uma camada de creme espessa e uma separação visível na fase dispersa.

As proporções de caseína:óleo de peixe que favoreceram o maior número de partículas de menor diâmetro foram 1,0:10 e 1,6:10 m/m. Outros autores (Suhr *et al.*, 2006) obtiveram emulsões estáveis com 1% de caseína e 10% de óleo de milho. No presente experimento, optou-se pelo emprego da proporção 1:10 m/m por ser suficiente para a finalidade de estabilização das partículas em emulsão.

O excesso na disponibilidade de proteínas, favorece a agregação das partículas e consequentemente a interação coloidal. Segundo Dalglish (1998) e Dickinson (1999), o estado de agregação depende da interação entre as camadas de proteínas adsorvidas em diferentes partículas, os quais dependem de fatores, tais como: cobertura da superfície das partículas pela proteína, a espessura da membrana, a densidade da carga e condições da solução aquosa (pH, concentração de íons e íons cálcio).

4.3.2 Determinação do tempo de estabilização do pH na emulsão primária

O ensaio teve como finalidade verificar a condução mais adequada do ajuste do pH 3 na emulsão primária (apenas com caseína). Este estudo consistiu na avaliação da estabilidade física da emulsão em diferentes intervalos de adição do ácido clorídrico. Ajustando o pH da emulsão durante 5 minutos, ocorreu floculação, evidenciada pela maior concentração de partículas com diâmetro (d_{43}) em torno de 20 μm . Os resultados da avaliação do potencial ζ demonstraram que a o tempo de redução do pH da emulsão em 5 min foi de 20 ± 7 mV. As partículas apresentaram carga superficial elevada, mas isso não foi suficiente para estabilizar a emulsão, fato comprovado pela agregação de partículas observada no ensaio. Tal agregação foi confirmada por meio do índice de cremificação de $80,9 \pm 0,4\%$. Segundo McClements (2005), o índice de cremificação tem como finalidade verificar a extensão de agregação das partículas na emulsão, ou seja, quanto mais rápido se formar o creme, maior é a partícula.

Entre 15 e 30 minutos, a tendência à floculação foi acentuada, com diâmetros de partículas superiores a 80 μm . Com 1, 2 e 3 horas de acidificação, foi verificada a ocorrência de floculação, mas com agregação de partículas de dimensões próximas a 40 μm .

A melhor condição foi observada com 4 horas de acidificação, que apresentou tamanho de partículas (d_{43}) de $5,59 \pm 0,62 \mu\text{m}$. A adição lenta de ácido clorídrico melhorou a estabilidade física das emulsões, reduzindo a tendência à agregação e a formação de grandes flocos. Suhr *et al.* (2006) encontraram valores superiores a 80 μm de diâmetro médio de partículas na emulsão de óleo de milho estabilizada por caseína em pH 3, e 26 mV na medida do potencial ζ . No presente ensaio, o potencial ζ , após 4 horas de acidificação foi de $28,4 \pm 1$ mV, indicando maior repulsão de cargas, constituindo fator de aumento de estabilidade.

Aumentando os intervalos de tempo de adição do HCl, as moléculas modificaram a carga, expondo os aminoácidos com cargas catiônicas, favorecendo parcial repulsão entre partículas e formando flocos menores. Com a redução do pH, a caseína modifica a carga superficial de aniônica para catiônica, apresentando tendência à floculação em pH próximo ao ponto isoelétrico. Isto deve-se a fraca repulsão eletrostática entre as partículas promovendo interações de Van-der-Waals, hidrofóbicas ou estérica (DICKINSON, 1999; McCLEMENTS, 2005).

4.3.3 Determinação da concentração de pectina cítrica ou de beterraba na emulsão secundária em pH 3.

Avaliou-se a concentração da pectina cítrica ou de beterraba nas emulsões formadas por membranas de caseína e pectinas em pH 3. Os diâmetros médios obtidos das emulsões com membranas em concentrações de pectina cítrica inferiores a 0,1% m/m variaram de $17,3 \pm 3,81 \mu\text{m}$ (0,075% m/m) a $75,9 \pm 3,41 \mu\text{m}$ (0,025% m/m) (Figura 3).

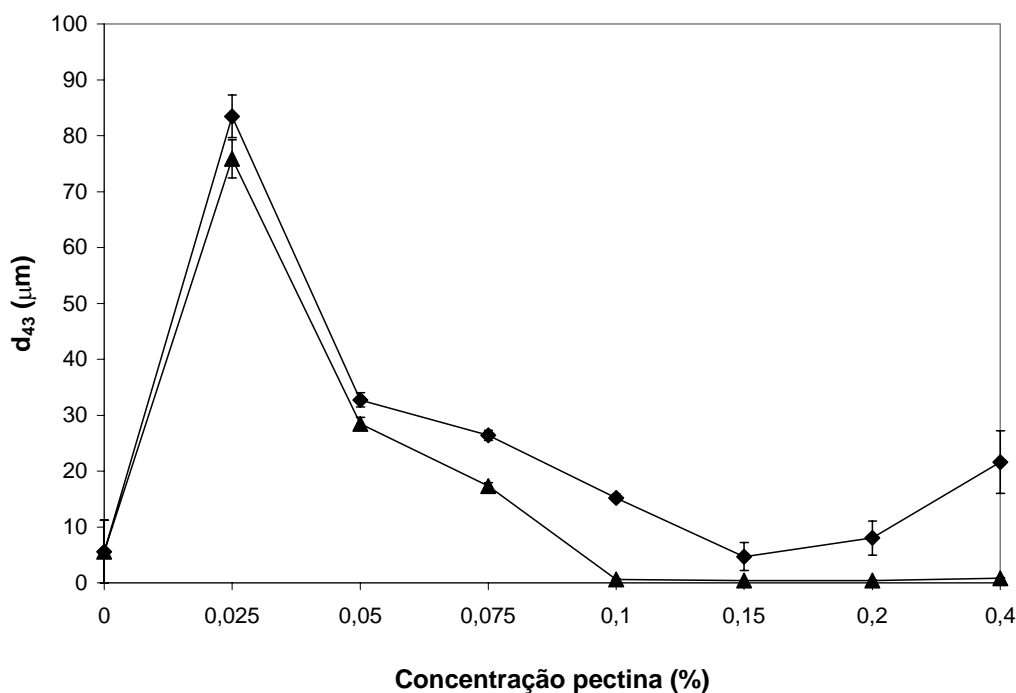


Figura 3 - Influência da concentração de pectina cítrica (▲) e de beterraba (◆) em emulsões secundárias (1% de óleo de peixe, 0,1% de caseína, 5mM de tampão fosfato de sódio) sobre o diâmetro médio das partículas (d_{43}) em pH 3.

As emulsões produzidas com membranas de caseína e pectina de beterraba flocularam em todas as concentrações. Os valores de d_{43} variaram de $4,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$ em concentração de 0,15% m/m $83,5 \pm 3,81 \mu\text{m}$ para 0,025% m/m. As pectinas de beterraba comerciais geralmente apresentam concentrações significativas de proteína, afetando a interação do polissacarídeo com a caseína na membrana e conseqüentemente promove problemas de floculação por ponteamto (DICKINSON, 2003; SUHR *et al.*, 2006). As emulsões formadas por membranas de caseína e pectina de beterraba apresentaram menor tendência à floculação em concentrações entre 0,15 e 0,20% m/m. Nesse caso, o diâmetro médio das partículas variou de $4,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$ a $8,01 \pm 3,04 \mu\text{m}$ respectivamente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre 0,15% e 0,20% m/m de pectina de beterraba. As membranas formadas em concentrações superiores a 0,20% apresentaram problemas de floculação por depleção, com aumento do d_{43} para $21,6 \pm 6,6 \mu\text{m}$.

A presença da pectina cítrica teve considerável impacto na estabilidade da emulsão de óleo de peixe formada por caseína. A partir da adição de 0,10% m/m de pectina cítrica a emulsão apresentou-se estável, corroborando com os resultados obtidos por meio da avaliação do diâmetro médio das partículas (Figura 3), onde o d_{43} foi de $0,39 \pm 0,03 \mu\text{m}$. Esta emulsão

permaneceu estável até concentrações de 0,40% m/m de pectina, o qual apresentou um ligeiro aumento no valor de d_{43} para $0,89 \pm 0,11 \mu\text{m}$.

Ao avaliar a carga das partículas em diferentes concentrações de pectina, identificou-se a saturação dos polissacarídeos na superfície das membranas. O potencial ζ das membranas de caseína com pectina cítrica e de beterraba na concentração de 0,025% m/m indicou que as cargas não foram suficientes para saturar toda a superfície das partículas, aproximando-se da neutralidade (Figura 4).

Este ensaio teve a finalidade de avaliar a influência do pH sobre a carga do polissacarídeo proporcionando melhor compreensão do fenômeno de deposição da pectina na superfície das membranas em emulsões estabilizadas por caseína.

A pectina cítrica em concentração inferior a 0,1% m/m, não apresentou carga suficiente para garantir a estabilidade da emulsão de óleo de peixe com caseína, ou seja, a superfície das partículas não foi saturada pelo polímero para garantir a repulsão.

Em concentrações superiores a 0,1% m/m as emulsões com pectina cítrica apresentaram carga constante, indicando que as partículas estavam suficientemente saturadas para garantir a estabilidade física.

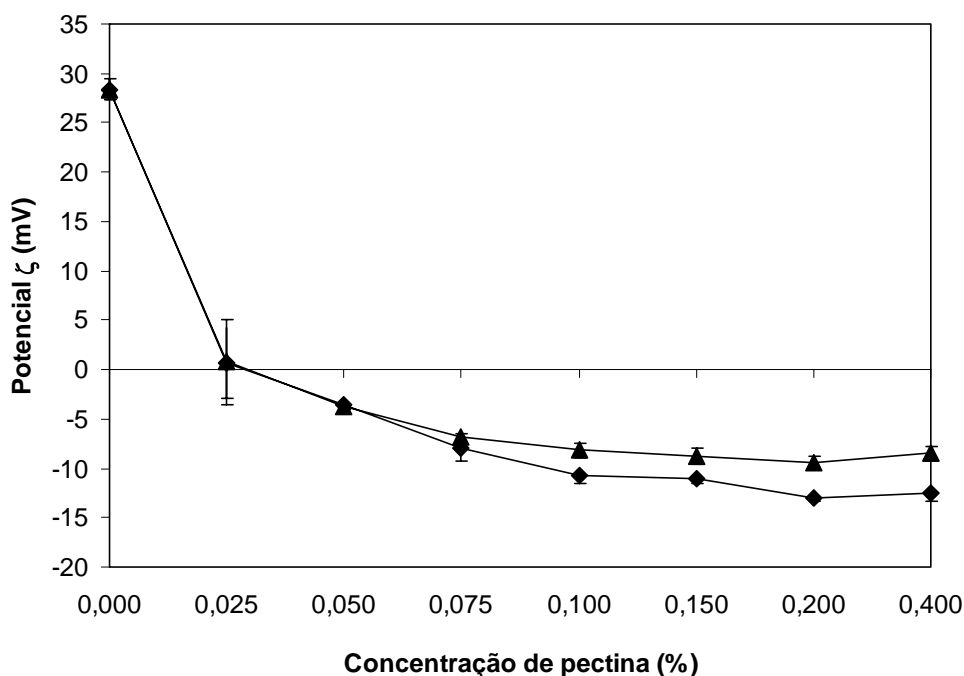


Figura 4 - Influência da concentração de pectina cítrica (▲) e de beterraba (◆) em emulsões secundárias (1% de óleo de peixe, 0,1% de caseína, 5mM de tampão fosfato de sódio) sobre o potencial zeta em pH 3.

O mesmo não ocorreu com a pectina de beterraba, que continuou apresentando significativa redução de carga até concentração de 0,20% m/m, com potencial ζ de $-13 \pm 0,4$ mV ($p \leq 0,05$). O potencial ζ a partir dessa concentração não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), permitindo concluir que a saturação da pectina de beterraba na membrana foi de 0,2%. Embora as emulsões com pectina de beterraba apresentassem valores de d_{43} superiores a 1 μm , considerados por muitos pesquisadores como floculados, ocorreu pequena agregação, pois a carga elétrica da pectina a essa concentração pareceu suficiente para proporcionar a repulsão (Figura 4). A sugestão para diminuir o diâmetro médio das partículas seria submeter essa amostra a re-homogeneização.

O resultado da avaliação qualitativa da cremificação, das emulsões de óleo de peixe com caseína permitiu observar que em concentrações superiores a 0,1% m/m de pectina cítrica, e 0,15% m/m de pectina de beterraba, não houve formação de camada de creme (Figura 5).

Este resultado foi confirmado na avaliação do diâmetro de partículas e potencial ζ , que apresentaram menor diâmetro médio e maior valor (em módulo) de carga elétrica, garantindo a estabilidade da emulsão. Segundo McClements (2005) podemos afirmar que 0,1% de pectina cítrica é a concentração crítica de floculação, o que significa dizer que, abaixo dessa concentração, inicia-se o processo de floculação por ponteamto.

Em concentrações de pectina cítrica entre 0,025 e 0,075% m/m (Figura 5A), houve um aumento na camada de creme. As emulsões com caseína e pectina de beterraba apresentaram o mesmo comportamento da pectina cítrica, porém a formação de creme ocorreu em um intervalo de concentração entre 0,025 e 0,10% m/m. Uma provável explicação para o desempenho diferente da pectina de beterraba, comparada à pectina cítrica, pode ser a composição do polissacarídeo. Segundo Dickinson (2003), pectinas comerciais contêm proteínas que interferem na interação do polissacarídeo com a caseína na membrana.

As imagens fotográficas das amostras de emulsões permitiram observar que a emulsão primária (primeiro tubo da esquerda para direita, Figura 5) em A e B, apresentaram maior índice de cremificação, com formação de uma camada pouco espessa de creme. Observou-se também que a camada de soro ainda apresentou-se turva, quando pequena parcela de partículas agregadas formou a camada de creme, enquanto que a maioria das partículas se encontrava dispersa, não contribuindo na formação do creme. As imagens permitem observar coerência entre os resultados do d_{43} e índice de cremificação.

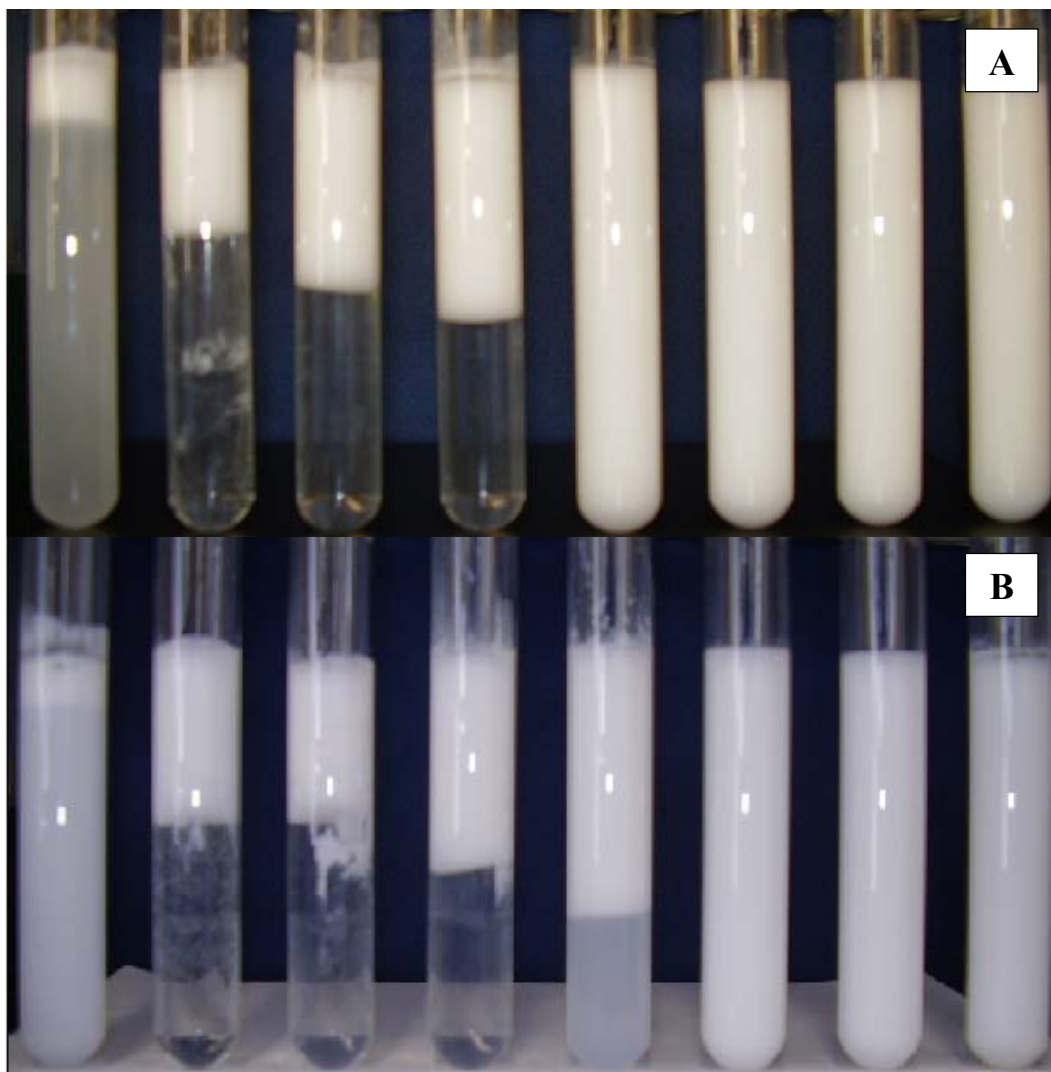


Figura 5 - Emulsões de óleo de peixe com caseína e pectina em pH 3, após 24h de elaboração. A - caseína e pectina cítrica e B - caseína e pectina de beterraba. Concentrações de pectina da esquerda para a direita 0; 0,025; 0,050; 0,075; 0,10, 0,15, 0,20 e 0,4% m/m.

As emulsões formadas de caseína e pectina de beterraba (Figura 5B) permitiram observar que houve formação de creme com camada de soro transparente na base, entre as concentrações 0,025 e 0,075%. Na concentração de 0,10% a emulsão apresentou formação de uma camada de creme com camada de soro turva, indicando possível tendência à distribuição de partículas dispersas. Através das imagens observou-se que a emulsão com pectina de beterraba apresentou estabilidade a partir da concentração de 0,15% m/m. No entanto, apesar dos resultados das avaliações do diâmetro médio de partículas e índice de cremificação concordarem com o resultado visual, a medida do potencial ζ indicou que a concentração de pectina de beterraba na superfície das partículas pareceu não ter atingido carga suficiente para garantir a estabilidade da emulsão. Concluiu-se a partir dos resultados obtidos, que para

estabilizar a emulsão de óleo de peixe com caseína, deve-se utilizar a concentração de 0,20% de pectina cítrica ou de beterraba.

4.3.4 Influência do pH na estabilidade da emulsão de óleo de peixe com caseína e pectina cítrica ou de beterraba.

Na emulsão primária, composta apenas de caseína, a carga variou de $-49,4 \pm 5,4$ mV em pH 7 para $33,8 \pm 4,2$ mV, quando se atingiu o pH 3, ocorrendo inversão de carga negativa para positiva, destacando a passagem pelo pI (Figura 6).

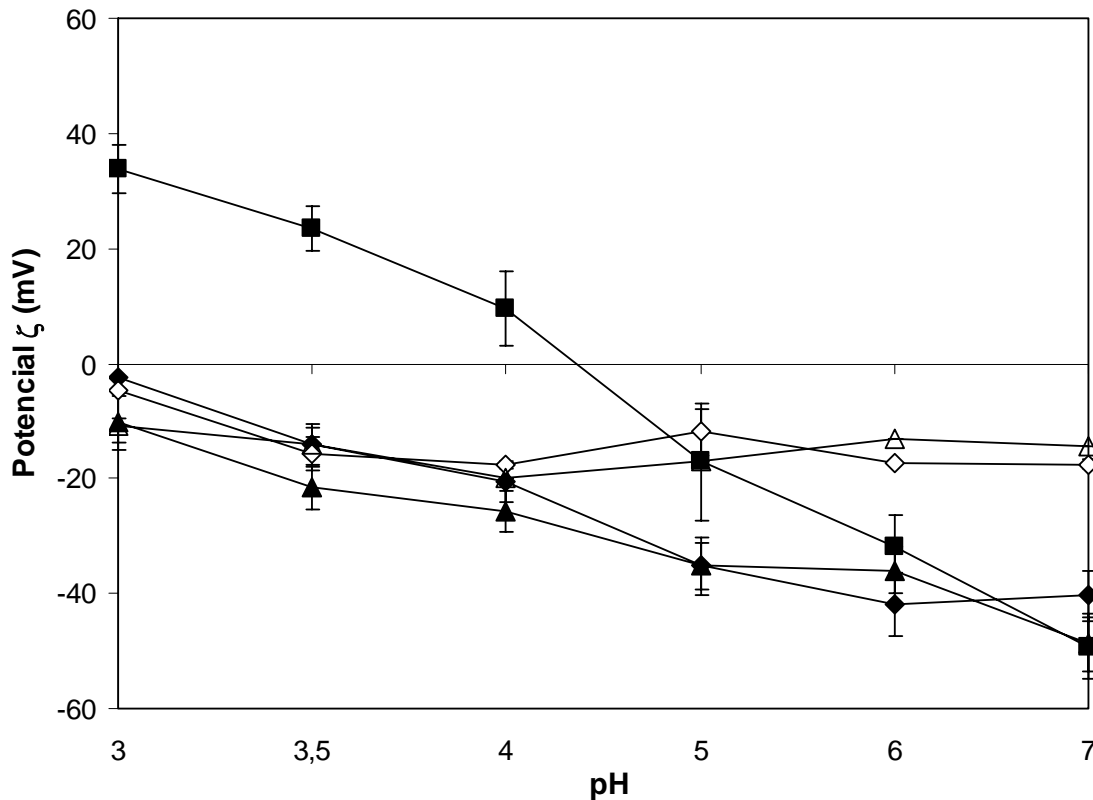


Figura 6 - Influência do pH sobre o potencial zeta. Emulsão primária (■), emulsão secundária com pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com pectina cítrica (▲), solução de pectina de beterraba (◇), solução de pectina cítrica (△).

Entre o pH 4 e 5, observou-se que a emulsão de caseína foi neutralizada, ou seja, não apresentou nenhuma carga. Em pH próximo ao seu pI (pH 4,7), a caseína é completamente insolúvel promovendo uma forte aglomeração das partículas.

Com a adição de pectina cítrica, a emulsão de óleo de peixe e caseína, houve mudança de carga que variou de $-48,6 \pm 4,9$ mV em pH 7 a $-10,3 \pm 4,7$ mV em pH 3.

Nas emulsões com pectinas testadas em pH 6 e 7, não houve formação de membrana, uma vez que a carga da emulsão secundária foi igual a carga da emulsão primária, indicando que nesse ponto ainda não havia interação com a pectina.

Em torno do pH 5, foi possível observar a ocorrência de interação de caseína e pectinas, indicando início de formação de membrana por deposição dos polímeros sobre as partículas. O potencial ξ das partículas recobertas da emulsão secundária, foi igual a $-35,2 \pm 4,09$ mV, e passou a se diferenciar significativamente ($p \leq 0,05$) do potencial ξ encontrado na avaliação da emulsão primária, que foi $-17,1 \pm 10,3$ mV. Este resultado foi semelhante ao observado por Suhr *et al.* (2006) quando a carga da membrana de caseína e pectina cítrica da emulsão foi inferior à carga da emulsão primária, sugerindo que houve deposição do biopolímero na superfície das partículas.

Em pH inferior ao pI da caseína, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as cargas da superfície das membranas formadas em pH 4, que teve potencial ξ igual a $-25,7 \pm 3,5$ mV e pH 3,5, que teve potencial ξ igual a $-21,5 \pm 3,8$ mV. Em pH 3 já houve diminuição da repulsão de partículas, com potencial ξ igual a $-10,3 \pm 4,7$ mV.

Segundo McClements (2005), a carga negativa da membrana é resultante da reversão de carga das partículas após a adsorção da pectina, de caráter aniônico, com a caseína que é catiônica. Em pH inferior a 3,5, a carga da membrana de caseína e pectina cítrica diminui drasticamente. Sabe-se que o pKa da pectina encontra-se próximo ao pH 3,5 e Suhr *et al.* (2006) destacaram que isto pode ter como consequência a neutralização da carga da pectina afetando a carga da superfície das partículas e diminuindo as forças de repulsão.

O mesmo comportamento foi observado nas emulsões formadas com membrana de caseína e pectina de beterraba. Houve um decréscimo significativo ($p \leq 0,05$) no potencial ξ da membrana com pectina de beterraba que foi de $-20,5 \pm 3,7$ mV em pH 4, $-14,2 \pm 3,7$ mV em pH 3,5 e $-2,4 \pm 0,1$ mV em pH 3. No entanto, em pH 3, a carga da emulsão foi ainda mais reduzida que na emulsão com pectina cítrica, com potencial ξ quase nulo, tornando a emulsão mais instável.

Avaliou-se o potencial ξ das soluções de pectina com a finalidade de se entender melhor o desempenho do polissacarídeo em diferentes níveis de pH. Deste modo, foi avaliada a carga das moléculas de pectina cítrica e de beterraba em solução tampão, bem como a carga das emulsões primárias e secundárias em diferentes níveis de pH.

As soluções de pectina cítrica apresentaram cargas elétricas entre $-14,4 \pm 0,0$ mV em pH 7 e $-10,8 \pm 1,2$ mV em pH 3 (Figura 6). O potencial zeta da solução de pectina de beterraba variou de $-17,5 \pm 0,9$ mV em pH 7 a $-4,6 \pm 0,3$ mV em pH 3. A queda mais acentuada de cargas ocorreu abaixo do pH 3,5 em ambas as soluções, confirmando a redução de cargas observada na emulsão em pH abaixo do pKa das pectinas, demonstrando a interferência que ocorreu na capacidade de adsorção das pectinas nas membranas formadas por caseínas nas emulsões.

As emulsões formadas somente por caseína, emulsão primária, em pH 6 e 7, apresentaram d_{43} de $0,39 \pm 0,25$ μm . No entanto, ao se aproximar do pI da caseína a agregação das partículas aumentou, atingindo o diâmetro médio de $150,08 \pm 7,27$ μm (Figura 7).

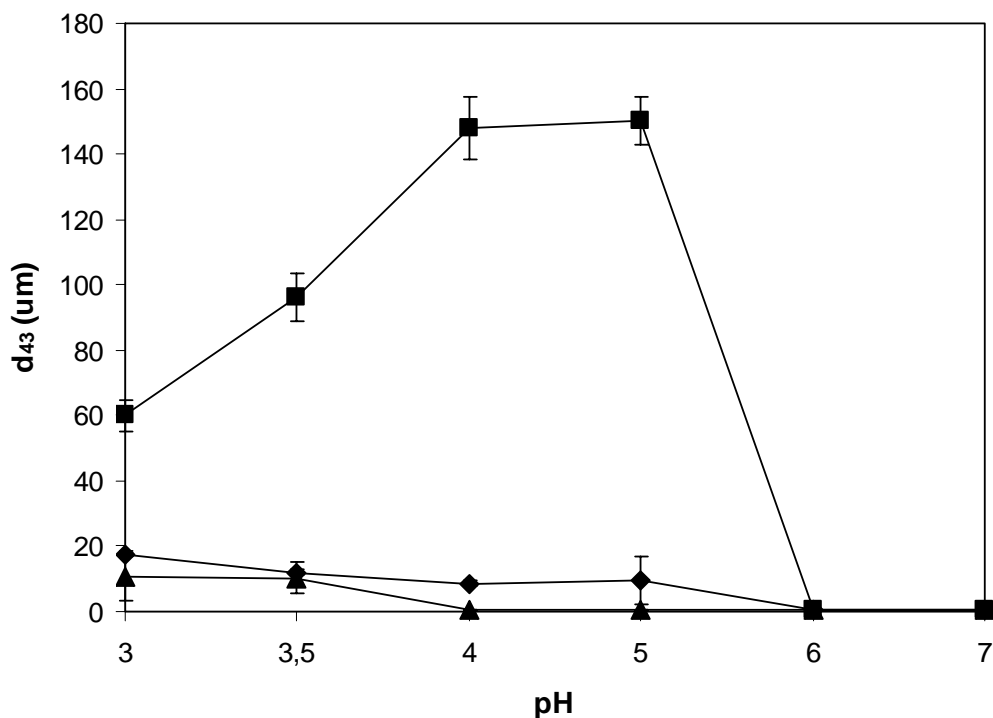


Figura 7 - Influência do pH sobre o diâmetro médio das partículas (d_{43}). Emulsão primária (■), emulsão secundária com pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com pectina cítrica (▲).

A emulsão primária em pH 4 e 5 se encontrava floculada devido a neutralização da carga elétrica na superfície das partículas. Segundo McClements (2005), nessa condição não há carga suficiente para promover a repulsão entre as partículas, promovendo aglomeração. Em pH 3,5 e 3, a emulsão primária apresentou uma redução do diâmetro médio de partícula d_{43} , mas, sem re-homogeneização, permaneciam agregadas.

Em pH 6 e 7, o d_{43} foi de $0,39 \pm 0,02 \mu\text{m}$ para todos os tratamentos. Tal resultado foi mantido em pH 4 e 5 em membranas com pectina cítrica. Em pH 3,5 e 3 confirmou-se a tendência à agregação, com aumento de diâmetro médio de partículas d_{43} variando de 10,25 a 10,85 μm .

Quanto a avaliação da cremificação, não se observou formação de creme nas emulsões primária e secundária entre os valores de pH 6 e 7 (Figura 8).

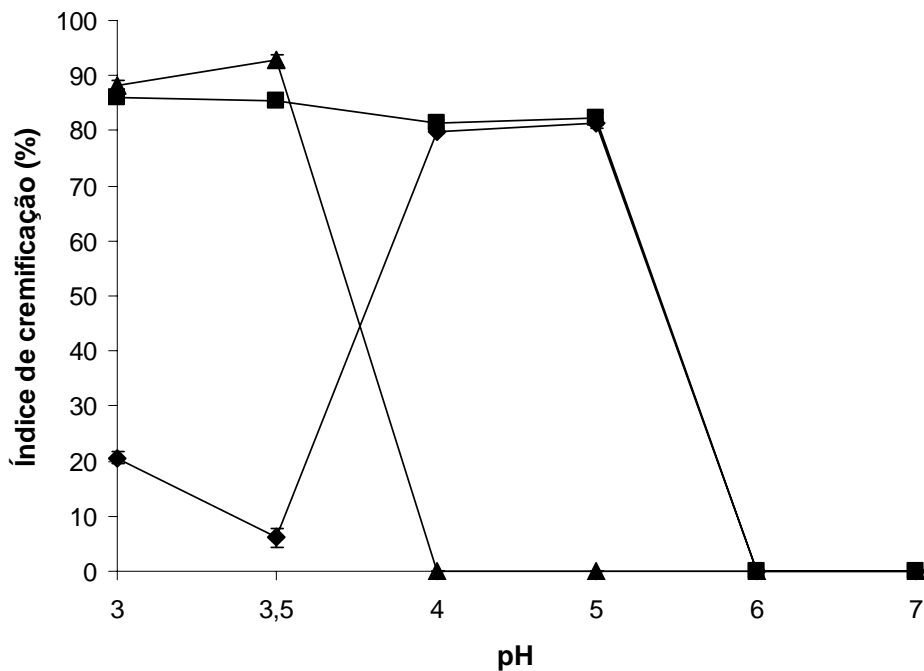


Figura 8 - Influência do pH sobre o índice de cremificação. Emulsão primária (■), emulsão secundária com pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com pectina cítrica (▲).

Com a adição de pectina cítrica, em pH 4 e 5, também não foi constatada formação de creme, confirmando os resultados da avaliação do diâmetro médio de partículas. Esse resultado indica a forte tendência a agregação promovida sobre as partículas de óleo de peixe formadas com a interação de caseína e pectina em pH abaixo do pKa do polissacarídeo. Dessa maneira, o presente estudo permitiu concluir que a composição de membrana com pectina cítrica e caseína, não garantiu a estabilidade da emulsão no pH de interesse, que seria pH 3.

Nesse caso, a recomendação seria a aplicação de re-homogeneização, para obtenção de partículas dispersas estáveis, conforme a tendência constatada a partir dos resultados de potencial ξ .

4.4 Referências

BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O.R. *Food Chemistry*. 3rd edition, New York, NY: Marcel Dekker, 1996. p.159-223.

DALGLEISH, D.G. Emulsions made with milk proteins: Formation and stability towards calcium ions. *Leatherhead Foods RA Food Industry Journal*, v.1, n.2, p.80-85, 1998.

DALGLEISH, D.G.; HOLLOCOU, AL. Stabilization of protein-based emulsions by means of interacting polysaccharides. In: E. DICKINSON; B. BERGENSTAHL (Eds.). *Food Colloids: Proteins, lipids and polyssacharides*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1997. p.236-244.

DICKINSON, E. Caseina in emulsion: interfacial properties and interactions. *International Dairy Journal*, v.9, p.305-312, 1999.

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

DICKINSON, E.; ROLFE, S.E.; DALGLEISH, D.G. Competitive adsorption of α_{s1} -casein and β -casein in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.265, p.397-405, 1988.

DICKINSON, E & McCLEMENTS, D.J. *Advances in food colloids*. New York: Blackie Academic & Professional, 1996. p.333.

DICKINSON, E.; GOLDING, M. Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, v.11, p.13-18, 1997.

DICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; ANTIPOVA, A.S.; PELAN, E.G. Effect of high-methoxy pectin on properties of casein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.12, p.425-432, 1998.

FRY, S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta*, v.157, p.111-123, 1983.

GORDON, W.G & KALAN, E. Proteins of milk. In: WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H.; ALFORD, J.A. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 2nd edition, Connecticut: The AVI Publishing Company, INC. 1980. p.87-124.

GU, Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and κ -carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of β -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.3626-3632, 2004.

GU, Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and carrageenan type on properties of β -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsion. *Food Hydrocolloids*, v.19, p.83-91, 2005.

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

KAZMIERI, M.; WICKER, L.; Corredig, M. Interactions of betalactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. *Journal of Food Science*, v.68, p.1673-1679, 2003.

KULAS, E; OLSEN, E.; ACKMAN, R.G. Oxidation of fish lipids and its inhibition with tocopherols. In: KAMAL-ELDIN, A., *Lipid oxidation pathways*. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2003. p.37-69.

LEROUX, J.; LANGENDORFF, V.; SCHICK, G.; VAINSHNAV, V.; MAZOYER, J. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, v.17, p.455-462, 2003.

MANCUSO, J. R.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. The effects of Surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.4112-4116, 1999.

McCLEMENTS, D. J. *Food Emulsions – Principles, practices and techniques*. 2nd edition, Boca Ranton: CRC Press, 2005.

MICHEL,F.; THIBAUT, J.F,; MERCIER, C.; HEITZ,F.; POULEANDE,F. Extraction and characterization of pectins from beet pulp. *Journal of Food Science*, v.50, p.1499, 1985.

MOREAU, L; KIM, H.J.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6612-6617, 2003.

OGAWA, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.2806-2812, 2003a.

OGAWA, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.5522-5527, 2003b.

PIPPEN, E.L.; MCCREADY, R.M.; OWENS, H.S. Gelation properties of partially acetylated pectins. *Journal of the American Chemical Society*, v.72, p.813, 1950.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.70 (suppl.), p. 560S-569S, 1999.

SURH, J.;GU,Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4236-4244, 2005.

SURH, J.;GU,Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.20, p.607-618, 2006.

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin-A review. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, v.37, p.47-73, 1997.

WANG, Q.; PAGÁN, J.; SHI, J. Pectin from fruits. In: SHI, J.X.; MAZZA, G.; MAQUER, M.L. *Functional Foods – Biochemical & Processing Aspects*. Boca Ranton: CRC Press, 2002. v.2, p. 264-330.

**5 ARTIGO 2:
ESTABILIDADE FÍSICA E OXIDATIVA DE ÓLEO DE PEIXE EM EMULSÃO COM
MEMBRANA DE β -LACTOGLOBULINA E PECTINA**

ESTABILIDADE FÍSICA E OXIDATIVA DE ÓLEO DE PEIXE EM EMULSÃO COM MEMBRANA DE β -LACTOGLOBULINA E PECTINA

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a estabilidade oxidativa promovida pela membrana de β -lactoglobulina com pectina cítrica ou de beterraba (*Beta vulgaris*), aplicada a uma emulsão de óleo de peixe em pH 3,5. A emulsão era composta de β -lactoglobulina e pectina, na seguinte proporção: 1% de óleo, 0,05% de β -lactoglobulina, 0,06% de pectina e 5 mM de solução tampão fosfato. O estudo de oxidação lipídica incluiu a avaliação do diâmetro médio da partícula, potencial zeta, avaliação da concentração de hidroperóxidos lipídicos e propanal, durante 16 dias à temperatura de 37°C. Dentre as pectinas estudadas, a membrana formada de pectina cítrica e β -lactoglobulina foi a que promoveu maior ação contra os agentes pró-oxidantes, tendo como consequência, maior estabilidade oxidativa. A pectina de beterraba, no entanto, apesar de possuir ácido ferúlico em sua composição, não teve a esperada atividade antioxidante, provavelmente por apresentar teor de ferro 15 vezes maior do que a pectina cítrica, limitando sua funcionalidade no sistema estudado.

PALAVRAS CHAVES: pectina cítrica, pectina de beterraba (*Beta vulgaris*), eletrodeposição, floculação, propriedade antioxidante, interação polissacarídeo-proteína.

Abstract

The purpose of this research was to evaluate the oxidative stability of fish oil emulsion in β -lactoglobulin and citrus or sugar beet pectin (*Beta vulgaris*) membrane at pH 3,5. Emulsion was composed of β -lactoglobulin and pectin with the following proportion: 1% oil, 0,05% β -lactoglobulin, 0,06% pectin, 5 mM buffer phosphate. The lipid oxidation study included mean particle diameter, zeta potential, lipid hydroperoxides and propanal concentration evaluation, during 16 days at 37°C. Between the studied pectins, β -lactoglobulin with citrus pectin membrane has promoted greater activity against prooxidant agents, consequently greater oxidative stability. Despite beet pectin has ferulic acid in its composition; it did not have antioxidant activity, maybe because it had 15 times more iron than citrus pectin, limiting its functionality in the studied system.

KEYWORDS: Citric pectin, sugar beet pectin (*Beta vulgaris*), eletrodeposition, flocculation, antioxidant activity, polysaccharide-protein interaction.

5.1 Introdução

Os óleos de peixe são ricos em ácido docosaheptaenóico (ADH) e ácido eicosapentaenóico (AEP) e estes são susceptíveis a oxidação por conterem várias insaturações na cadeia carbônica (KULAS *et al.*, 2003). A susceptibilidade oxidativa depende da composição do produto e da presença de pró-oxidantes ou antioxidantes. Os metais de transição (tais como ferro e cobre) estão presentes naturalmente nos alimentos e podem ser provenientes de matéria-prima ou ingredientes, equipamentos, embalagens, etc. Cobre e ferro são metais de transição comum em alimentos, entretanto o ferro é normalmente encontrado em maior quantidade do que o cobre. Para garantir a estabilidade oxidativa os óleos devem conter concentrações inferiores a 0,1 ppm de ferro e 0,02 ppm de cobre (FLIDER e ORTHOEFER, 1981). Esses íons são reconhecidos como agentes pró-oxidantes, levando a degradação desses lipídeos para produtos de oxidação primária, ou seja, os hidroperóxidos (NAWAR, 1996; McCLEMENTS, 2005).

Os hidroperóxidos são os primeiros produtos da autooxidação lipídica e são relativamente instáveis. Estes, por sua vez, participam de inúmeras reações complexas, envolvendo degradações de substrato e permitindo interações que resultam em compostos com diversos pesos moleculares e aromas (NAWAR, 1996). Os hidroperóxidos geralmente se decompõem durante a oxidação lipídica para formar moléculas pequenas e voláteis que proporcionam o odor associado a rancidez oxidativa. Os produtos de oxidação secundária (voláteis) formados a partir da decomposição de hidroperóxidos do AEP são os aldeídos voláteis, dos quais destaca-se o propanal (KULAS *et al.*, 2003).

Atualmente, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos acerca da membrana interfacial multicamada, uma vez que esta confere aumento de estabilidade ao estresse físico do meio, promovido por temperatura, agitação mecânica, pH ou presença de íons multivalentes (MOREAU *et al.*, 2003; OGAWA *et al.*, 2003a,b; AOKI *et al.*, 2005; SUHR *et al.*, 2005). As membranas multicamadas são produzidas por deposição de um biopolímero carregado em uma emulsão com partículas revestidas por um emulsificante com carga oposta. Por outro lado, é importante selecionar o biopolímero compatível com o emulsificante para elaborar emulsões estáveis e com características físico-químicas desejáveis. Emulsões estabilizadas por multicamadas ou membranas contendo proteínas do leite e polissacarídeos foram utilizadas em diversos estudos, uma vez que a interação se forma em $\text{pH} < \text{pI}$ da proteína, desde que o pH do sistema seja igual ou superior ao pKa do hidrocolóide. As

emulsões elaboradas em pH inferior ao ponto isoelétrico das proteínas do leite geralmente apresentam cargas positivas (DALGLEISH e HOLOCOU, 1997; DICKINSON *et al.*, 1998).

As proteínas do soro são largamente usadas como agentes emulsificantes na indústria de alimentos. Estas não só produzem emulsões óleo/água (O/A) estáveis, como podem inibir a oxidação lipídica. (COUPLAND e McCLEMENTS, 1996). Quando aderidas à superfície das partículas na emulsão, as proteínas do soro inibem a oxidação lipídica pela produção de uma superfície catiônica, cuja carga repele os metais de transição em pH inferior ao ponto isoelétrico (pI) das proteínas. Estudos realizados com emulsão de óleo de salmão estabilizada em água por frações de proteínas do soro em pH 3, demonstraram que a estabilidade oxidativa ocorreu na seguinte ordem: β -lactoglobulina \geq α -lactalbumina \geq isolados protéicos de soro. (HU *et al.*, 2003a ; DJORDJEVIC *et al.*, 2004 ; FARAJI *et al.*, 2004).

As pectinas são polissacarídeos aniônicos, normalmente derivados de frutas cítricas e maçã, são utilizados como agentes geleificantes ou estabilizantes em alimentos com baixo pH, tais como bebidas lácteas acidificadas e iogurtes. A pectina é definida como uma mistura de heteropolissacarídeos composta predominantemente de resíduos de ácidos galacturônicos metoxilados. A pectina pode ser dividida em dois grupos de acordo com o grau de metoxilação: pectina com alto grau de metoxilação ($\geq 50\%$), que forma gel sob condições ácidas e pectina com baixo grau de metoxilação ($< 50\%$) que forma gel por diferente mecanismo na presença de cálcio (BeMILLER e WHISTLER, 1996; KAZMIERI *et al.*, 2003).

A pectina da beterraba (*Beta vulgaris*) é extraída do resíduo da polpa de beterraba, e é largamente usada em nutrição animal. Esta pectina, por apresentar baixa capacidade geleificante, não é muito utilizada industrialmente. Esta limitação funcional é atribuída principalmente à presença do grupo éster acetila e ao reduzido tamanho da molécula (PIPPEN *et al.*, 1950; MICHEL *et al.*, 1985). A pectina da beterraba consiste de resíduo de ácido galacturônico, parcialmente metil-esterificado e O-acetilado na posição C-2 ou C-3, adicionado de ácido fenólico nas cadeias laterais (ácido ferúlico) o qual é ligado à arabinose e à galactose por ligação éster (FRY, 1983).

O Tween (monolaurato de sorbitano etoxilado) é um emulsificante não-polimérico, hidrófilo, apresentando o grupamento polar neutro. Devido ao seu caráter não-iônico, esse agente emulsificante não favorece interação com íons multivalentes ou compostos com cargas elétricas, proporcionando excelente estabilidade em emulsões O/A. Vários pesquisadores utilizaram os agentes emulsionantes neutros em estudos de oxidação lipídica de emulsões O/A

para avaliar a atividade antioxidante de proteína do leite e compostos fenólicos (MEI *et al.*, 1999; MANCUSO *et al.*, 1999; McCLEMENTS, 2005).

Moreau *et al.* (2003) caracterizaram a emulsão de óleo de milho estabilizada por β -lactoglobulina e pectina cítrica com elevado grau de metoxilação em pH 3,0. Os pesquisadores observaram problemas de floculação por ponteamento quando empregaram pectina cítrica em concentração inferior a 0,04% m/m, e floculação por depleção quando utilizaram concentração de pectina superior a 0,1% m/m. Foi constatado que a estabilidade física das emulsões depende da concentração dos emulsionantes, especialmente do polissacarídeo, pois estes afetam a interação eletrostática (DICKINSON e GOLDING, 1997).

Ogawa *et al.* (2003b) estudaram a oxidação lipídica de emulsões de óleo de milho estabilizadas por membrana de lecitina e quitosana e estas apresentaram maior estabilidade oxidativa do que as emulsões estabilizadas apenas por lecitina, num período de estocagem de 03 semanas incubadas à temperatura ambiente.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade oxidativa de emulsões de óleo de peixe estabilizadas por β -lactoglobulina e pectinas, cítrica ou de beterraba, em pH 3,5. O estudo incluiu avaliação da estabilidade física dessas emulsões com diferentes concentrações de pectinas.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Material

Foram utilizados fosfato de sódio monobásico e dibásico, sulfato ferroso, hidroperóxido de cumila (hidroperóxido de cumeno), propionaldeído, azida sódica, Tween 20 e pectina de sal de potássio esterificado (de fruta cítrica, com grau de esterificação de 59%) da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO). A pectina de beterraba foi obtida da Herbstreith & Fox (Betapekt RU 301). A β -lactoglobulina foi obtida da Davisco Foods International (BIOPURE – Betalactoglobulina lote JE 003-6-922, Le sueur, MN, US) composta por 93,8% de betalactoglobulina, 5,2% de umidade, 1% de gordura e 1,8% de cinzas. O óleo de peixe desodorizado, refinado e branqueado foi doado pela Omega Protein (Reedville, VA) e

continha 10-17% AEP e 7-12% ADH. Ambos os óleos foram envasados em tubos de vidro de 50 mL e armazenados no escuro, a -80°C . Foi utilizada água destilada e deionizada para a elaboração de todas as soluções. Todos os reagentes eram de grau puro ou analítico.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Preparo da emulsão estoque

A elaboração da emulsão estoque consistiu inicialmente na dispersão de 0,5% m/m de β -lactoglobulina ou 1% m/m de Tween 20 (Tw) em tampão fosfato de sódio 5mM sob pH 7, ajustado com auxílio de solução HCl ou NaOH 1 e 0,1 N. A solução de β -lactoglobulina foi mantida sob agitação por 4 horas e depois estocada em refrigerador ($8\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 12 horas para completar a hidratação. Antes da elaboração da emulsão, esta solução foi mantida fora da refrigeração para atingir a temperatura ambiente. A solução Tween 20 foi preparada no mesmo dia. O óleo de peixe foi descongelado e pesado na proporção de 10% m/m da emulsão final e foi pré-homogeneizado com auxílio de um dispersor de alta velocidade (M133;1281-0, Biospec Product, Inc., ESGC, Suíça), por 2 minutos.

As emulsões estoque de óleo de peixe produzidas com β -lactoglobulina (Blg) ou Tween 20 foram elaboradas em um microfluidizador (Model M-110L Microfluidizer® Processor, Microfluidics™, Newton, MA, US) em 03 passes, sob pressão de 6000 psi. As emulsões estoque foram preparadas sob banho de água gelada para evitar oxidação durante o processamento. Após a elaboração, adicionou-se 0,01% m/m de azida sódica.

As emulsões primárias foram elaboradas a partir da diluição da emulsão estoque em solução tampão 5mM em pH 7 na proporção de 1:10 m/m sob agitação lenta durante 45 min .

A emulsão secundária foi elaborada pela diluição lenta da emulsão estoque de β -lactoglobulina em solução tampão fosfato de sódio 5mM, contendo pectina cítrica (CPBlg) ou de beterraba (BPBlg) misturadas previamente em placas de agitação magnética durante 1 hora. As emulsões secundárias formadas por Tween 20 e pectina cítrica (CPTw) ou de beterraba (BPTw) seguiram os mesmos procedimentos de elaboração para emulsões com β -lactoglobulina. Para a determinação da concentração mais adequada de pectina que seria

adotada para o ensaio de oxidação lipídica, efetuou-se um ensaio preliminar apenas para a emulsão estabilizada por β -lactoglobulina, em concentrações variando de 0,01 a 0,5% m/m. No ensaio com pectina de beterraba, a emulsão estabilizada por β -lactoglobulina foi tratada termicamente a 80°C/15 minutos, e resfriada rapidamente antes da adição em solução de pectina. A composição final da emulsão secundária foi: 1% óleo e 0,05% β -lactoglobulina ou 0,1% de Tween. Essa solução foi submetida a agitação durante 45 minutos em temperatura ambiente. O pH da emulsão foi ajustado em pH 3,5 com adição regular de HCl 1 e 0,1 N sob agitação constante por 40 minutos. Após o ajuste do pH, a solução foi mantida sob agitação por 20 min. Os procedimentos de elaboração das emulsões secundárias foram realizados de acordo com os procedimentos descritos por Suhr *et al.* (2006) com modificações. As emulsões foram estocadas em cápsulas de vidro ou tubos de ensaio para análises físicas e químicas.

5.2.2.2 Avaliação da estabilidade física da emulsão

Os ensaios de estabilidade física foram realizados no estudo preliminar e na avaliação da oxidação lipídica. Para o estudo preliminar foram avaliados a distribuição do tamanho de partícula e o potencial zeta (ζ) após 24 horas do período de elaboração sob temperatura ambiente. As análises foram realizadas a cada 2 dias, ao longo de 16 dias de estudo nas amostras mantidas à temperatura de 37°C. Os ensaios físicos foram realizados em duplicata, mantendo-se constante o pH 3,5.

5.2.2.2.1 Potencial Zeta (ζ)

Para avaliação do potencial ζ , as emulsões foram diluídas na proporção de 1:100 v/v em solução tampão fosfato 5mM, filtrada previamente (filtro Whatman com 0,45 μ m de porosidade), em pH 3,5. O potencial ζ das partículas foi determinado usando o equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Os resultados foram obtidos da média de 10 leituras tomadas pelo equipamento na mesma amostra. O procedimento analítico foi realizado de acordo com Gu *et al.* (2004).

5.2.2.2.2 Determinação do tamanho de partículas

As análises de d_{32} e d_{43} foram realizadas no equipamento de dispersão de luz estático a laser Mastersize (Malvern MSS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A média do tamanho das partículas foi obtida dos valores encontrados na medida do diâmetro médio da superfície-estimada d_{32} ($\sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$) e o diâmetro médio do volume-estimado d_{43} ($\sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$). Para evitar o efeito do escaneamento múltiplo, as emulsões foram diluídas na razão de 1:200 v/v, usando solução tampão fosfato de sódio 5mM, pH 3,5. Esta solução foi submetida a agitação constante durante a análise das amostras. O procedimento analítico foi realizado de acordo com Suhr *et al.* (2006).

5.2.2.3 Avaliação da oxidação lipídica

A análise de oxidação lipídica consistiu na avaliação da concentração de hidroperóxidos (produto da oxidação primária) e propanal (produto da oxidação secundária). A coleta de dados foi realizada durante o período de 16 dias em intervalos de 2 dias, com amostras estocadas em câmaras à temperatura de 37°C. Essas análises foram realizadas em triplicata e o ensaio realizado em 2 repetições.

5.2.2.3.1 Hidroperóxidos

As amostras de emulsões (1 mL) foram acondicionadas em recipientes de vidro (Fisherbrand 13 x 100 mm), recravadas por tampas de alumínio com septa de poliuretano e estocadas em ausência de luz à temperatura de 37°C. As análises de hidroperóxidos dos lipídeos foram realizadas de acordo com o método descrito por Shanta e Decker (1994). O procedimento para quantificar os hidroperóxidos dos lipídeos consistiu na mistura de 0,3 mL de emulsão com 1,5 mL de isooctano/ 2-propanol 3:1 v/v. A mistura foi agitada por 10s em 03 vezes e centrifugada por 2 min a 1000 g. Em seguida, a fase orgânica (200 µL) foi adicionada

de 2,8 mL de metanol/butanol 2:1 v/v, acrescida de 15 μ L de tiocianato de amônia 3,94 M e 15 μ L de solução de íons ferroso (preparado pela mistura de BaCl₂ 0,132 M e FeSO₄ 0,144 M). A absorbância da solução foi medida em 510 nm, 20 minutos após a adição da solução de íons ferroso. A concentração de hidroperóxidos foi determinada pela curva padrão elaborada a partir de hidroperóxido de cumila (hidroperóxido de cumeno) (Sigma Chemical, Co.).

5.2.2.3.2 Propanal

Para análise de propanal foi acondicionado 1 mL de amostra em recipiente de vidro (SUPELCO SU860099) com tampa de alumínio rosqueável, magnética e com septa de PTFE/silicone (SUPELCO SU860101). A concentração de propanal foi determinada usando-se cromatógrafo a gás (GC-17A, Shimadzu, Kyoto, JA) e as amostras foram coletadas automaticamente utilizando o “auto sampler” (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, JA).

Para operação, as amostras foram aquecidas a 45°C, com tempo de equilíbrio de 5 minutos, injetor a 250°C, detector de ionização por chama a 250°C, temperatura do ‘loop’ de 100°C, tempo de equilíbrio de 1 minuto, pressurização por 10 s, tempo de injeção de 1 min. Os compostos voláteis foram separados isotermicamente a 70°C em uma coluna capilar de sílica fundida com fase 100% metil silicone DB-1 (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 1 μ m de espessura do filme). O gás de arraste foi o Hélio no fluxo de 10 mL/min. As concentrações foram determinadas por áreas de picos, usando propanal como padrão (Sigma-Aldrich Co.). Os procedimentos analíticos foram realizados de acordo com o descrito por Faraji *et al.* (2004).

5.2.2.4 Avaliação da composição de metais nas amostras de pectinas

As concentrações de ferro e cobre das pectinas cítricas e de beterraba foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica. Os procedimentos analíticos foram realizados de acordo com o AOAC (1984). Os resultados foram determinados da média de 3 leituras do equipamento.

5.2.2.5 Análise estatística

As médias dos resultados físicos e químicos obtidos foram comparadas adotando o teste t-student no nível de 5% de significância (SNEDECOR e COCHRAN, 1989).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Ensaios Preliminares

Para definir a concentração das pectinas cítrica e de beterraba foi necessário avaliar a estabilidade física das emulsões secundárias em diferentes concentrações do polissacarídeo (de 0,01 a 0,5% m/m). Os ensaios foram realizados em pH 3,5 baseado no pKa da pectina, em pH inferior ocorre a redução da carga da molécula diminuindo a capacidade de interação e, conseqüentemente, ocorre problemas de floculação por ponteamto (DALGLEISH e HOLOCOU, 1997; DICKINSON, 2003).

Concentrações de pectina de beterraba inferiores a 0,04% m/m apresentaram problemas de floculação, alcançando na emulsão secundária um diâmetro médio de partículas (d_{43}) igual a 14,95 μm , quando comparados à emulsão primária (0,0% de concentração) que apresentou valores de d_{43} igual a 0,45 μm (Figura 1).

Esses resultados demonstraram que as emulsões elaboradas na proporção de polissacarídeo e β -lactoglobulina inferiores a 1:10 apresentaram problemas de floculação. Isto se deve à baixa concentração do polissacarídeo em solução, e devido à proximidade das partículas dispersas, favorecendo a interação entre pectina e proteína, promovendo o fenômeno de floculação por ponteamto (DICKINSON, 2003).

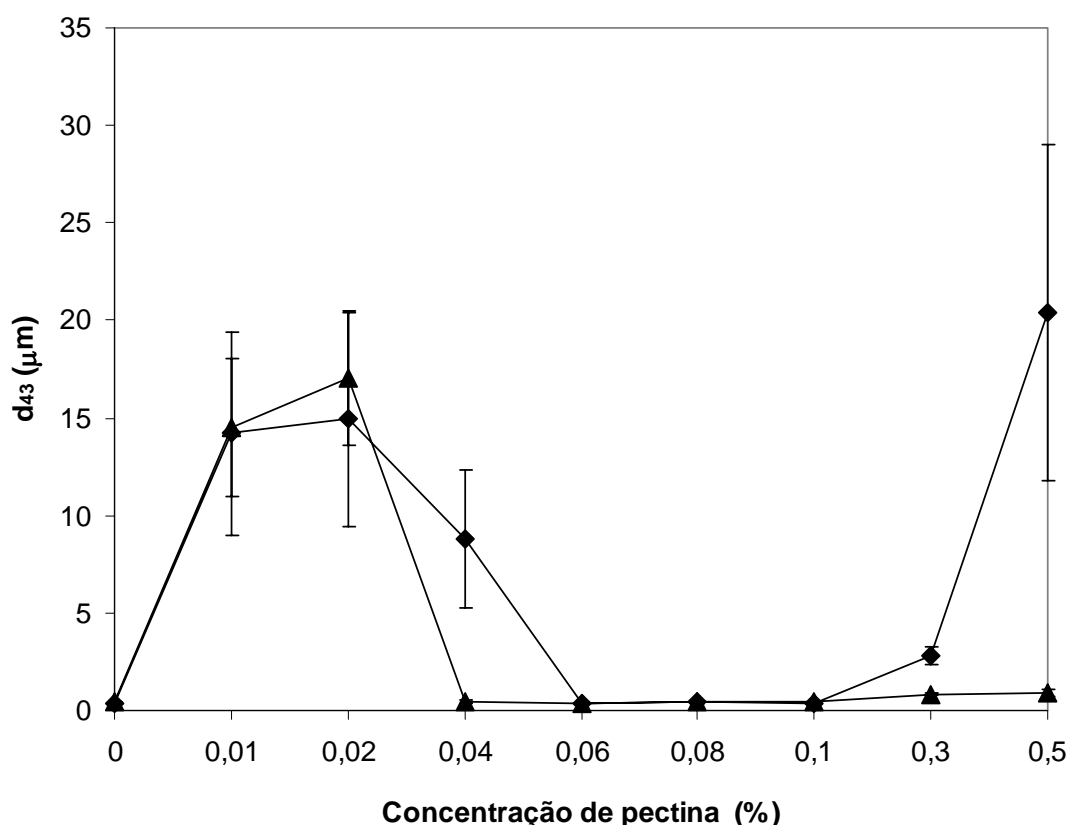


Figura 1 – Influência de diferentes concentrações de pectina cítrica e de beterraba sobre o diâmetro médio das partículas (d_{43}). Emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (◆) e emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica (▲)

As emulsões elaboradas por pectina de beterraba em concentrações entre 0,06% e 0,1% demonstraram-se estáveis, com o d_{43} em torno de 0,41 μm . Isto significa que as emulsões estabilizadas com membranas de pectina e β -lactoglobulina elaboradas na proporção entre 1:10 e 1:5 (pectina:proteína) apresentaram interação proteína-polissacarídeo estericamente estáveis (DICKINSON, 2003). Em proporção superior a 1:5, o d_{43} foi 2,79 μm ou mais, indicando que as emulsões apresentariam novamente problemas de floculação.

Emulsões com concentrações superiores a 0,04% de pectina cítrica apresentaram-se estáveis, com diâmetro médio de partículas d_{43} igual a 0,41 μm . Este fato permitiu concluir que, a partir de concentração de 0,04%, a pectina cítrica pode ser utilizada em emulsões estabilizadas por β lactoglobulina, sem problemas de floculação.

O potencial ζ fornece a carga elétrica na superfície das partículas da emulsão, permitindo observar a tendência à agregação. A carga elétrica da emulsão primária apresentou valores entre 42 a 45 mV (Figura 2), indicando um valor suficiente para manutenção da repulsão entre as partículas.

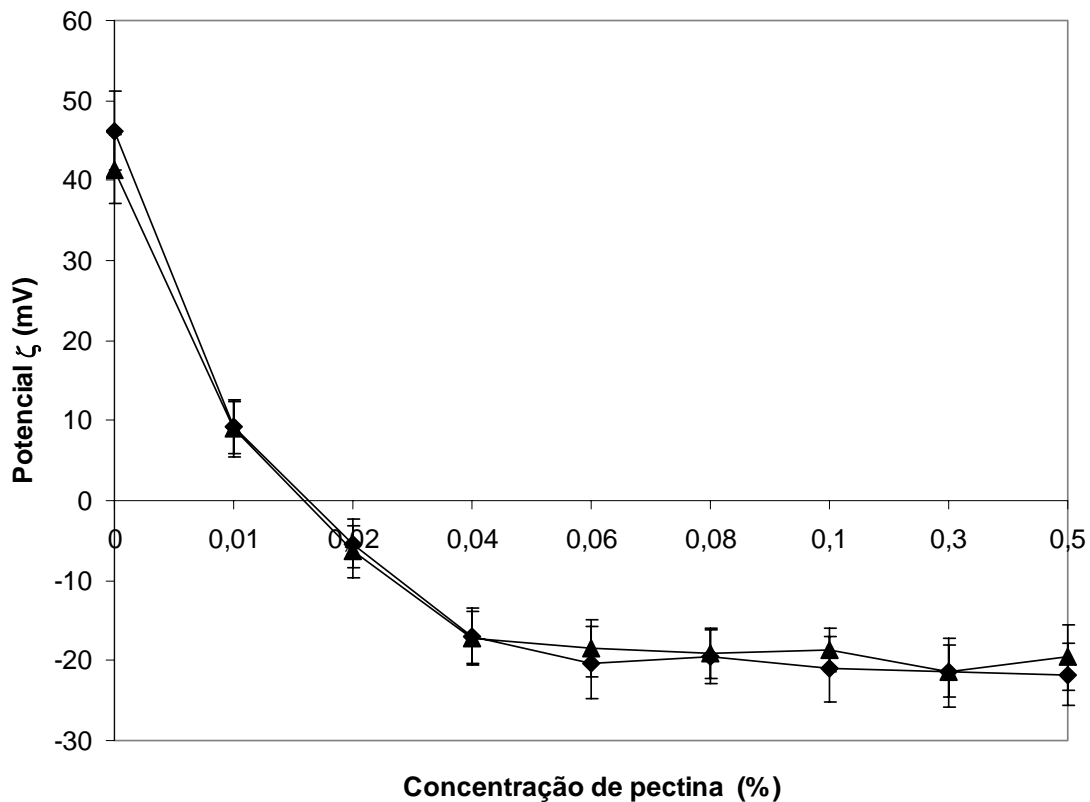


Figura 2 – Influência de diferentes concentrações de pectina cítrica e de beterraba sobre o potencial zeta. Emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (♦) e emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica (▲)

Sabe-se que emulsões primárias de óleo de milho foram estabilizadas por β -lactoglobulina em pH 3,0, apresentando potencial ζ de $33,3 \pm 3,0$ mV (MOREAU *et al.*, 2003). Este valor indica a mudança de carga negativa para positiva, pela mudança do pH da solução de 7 para 3,5, valor esse inferior ao pI da β -lactoglobulina. Nessa condição ocorre alteração na carga superficial da β -lactoglobulina pela exposição de seus aminoácidos ao novo ambiente, aumentando a repulsão entre as partículas (HU *et al.*, 2003a).

Com a participação das pectinas, os valores da carga mudaram de positivo para negativo devido a interação das pectinas com a β -lactoglobulina na superfície da membrana. Em concentrações superiores a 0,06%, o potencial ζ foi em torno de -20 mV com a pectina de beterraba e em torno de -19 mV com a cítrica. Estes resultados indicaram que a concentração de 0,06% foi suficiente para saturar a superfície das partículas por interação eletrostática com carga negativa. A partir de 0,06% de concentração de pectina, os polissacarídeos ainda continuaram sendo adsorvidos, embora sem alteração significativa da carga. Os resultados de potencial ζ demonstrados neste estudo foram semelhantes aos obtidos por Moreau *et al.*

(2003), que obtiveram carga de -19 ± 1 mV na emulsão de óleo de milho estabilizada por membrana de β -lactoglobulina e pectina cítrica em pH 3,0. Os resultados portanto, confirmaram que a melhor concentração das pectinas cítricas e de beterraba para realizar o estudo de oxidação lipídica foi de 0,06%.

5.3.2 Avaliação da estabilidade física das emulsões de óleo de peixe em membrana de β -lactoglobulina e pectina cítrica ou de beterraba, durante a estocagem.

O diâmetro médio das superfícies das partículas d_{32} das emulsões de óleo de peixe com β -lactoglobulina e pectinas cítrica ou de beterraba em pH 3,5, obtido no presente estudo não apresentou variações ao longo do período de 16 dias de estocagem a 37°C (Figura 3). Embora as emulsões estabilizadas por Tween apresentassem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na medida de d_{32} , não foram observadas diferenças nos valores de d_{43} , indicando que as emulsões tiveram comportamento estável durante o período de estudo. O d_{32} é relacionado com a média de área de superfície das partículas presentes na fase contínua por unidade de volume na emulsão. O parâmetro d_{43} é mais sensível à presença de grandes partículas na emulsão do que o d_{32} , permitindo detectar a tendência à floculação. Sabe-se que o Tween é excelente estabilizante, permitindo o preparo de emulsões sem problemas de floculação ou cremificação, sendo por isso adotado como controle no estudo de oxidação (McCLEMENTS, 2005).

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Hu *et al.* (2003b), que obtiveram partículas entre 0,29 a 0,35 μm de d_{32} , em emulsões de óleo de milho estabilizadas por isolados protéicos em pH 3, durante 4 dias de estocagem. As emulsões estabilizadas por β -lactoglobulina e pectinas apresentaram-se similares aos estudos prévios com d_{43} entre 0,35 a 0,38 μm , e assim permaneceram durante os 16 dias de estudo.

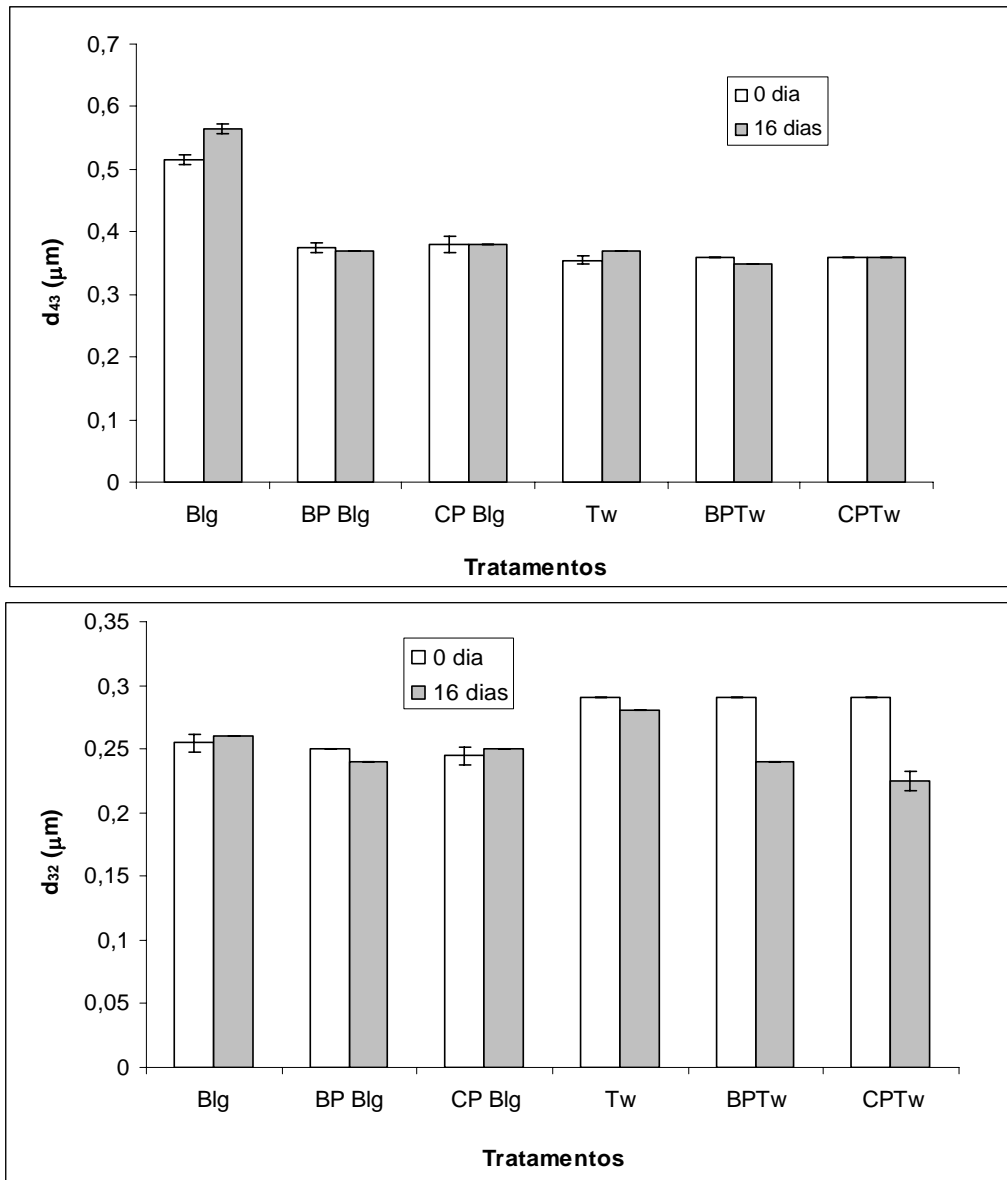


Figura 3 – Diâmetro médio das partículas (d_{43} e d_{32}) das emulsões nos tempos 0 e 16 dias em pH 3,5 incubadas a 37°C. Blg – Emulsão primária com β -lactoglobulina, BPBlg – emulsão secundária com pectina de beterraba, CPBlg - emulsão secundária com pectina cítrica, Tw – emulsão com Tween, BPTw – emulsão com Tween e pectina de beterraba e CPTw - emulsão com Tween e pectina cítrica. Os resultados são médias de duplicatas.

A estabilidade de partículas das emulsões também foi monitorada pela medida de carga elétrica das partículas e a emulsão primária apresentou redução significativa ($p \leq 0,05$) de 43,75 para 35,1 mV no 16º dia de estocagem, confirmada pelo aumento significativo ($p < 0,05$) do diâmetro médio da partícula d_{43} (Figura 4).

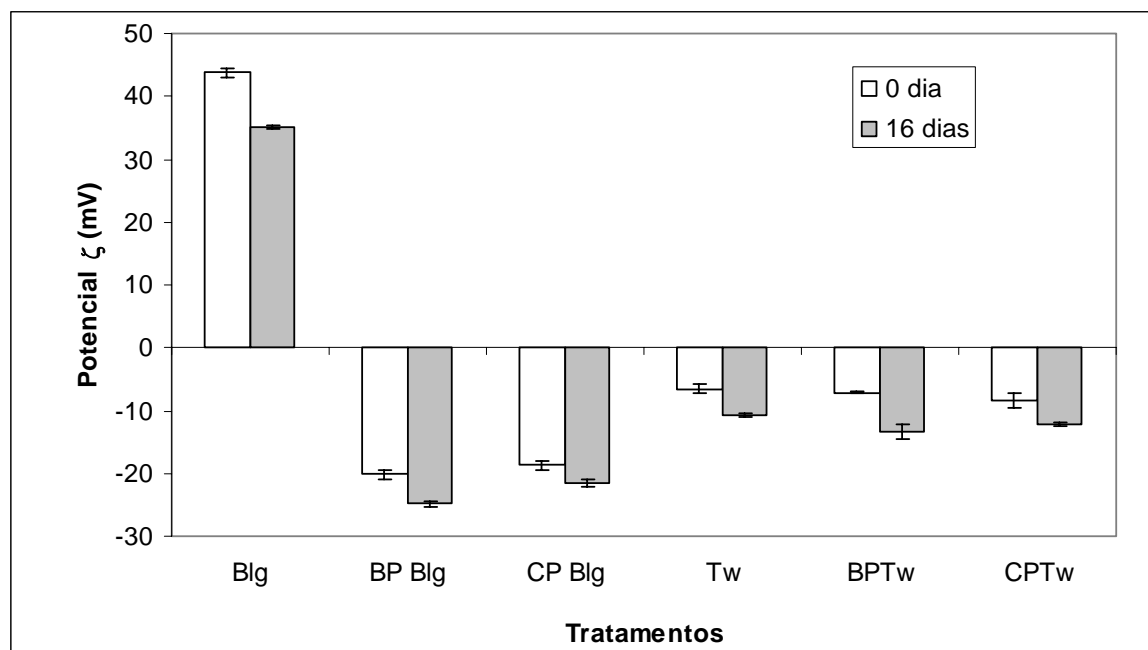


Figura 4 – Potencial zeta das emulsões nos tempos 0 e 16 dias em pH 3,5 incubadas a 37°C. Blg – Emulsão primária com β -lactoglobulina, BPBlg – emulsão secundária com pectina de beterraba, CPBlg - emulsão secundária com pectina cítrica, Tw – emulsão estabilizada por Tween, BPTw – emulsão com Tween e pectina de beterraba e CPTw - emulsão com Tween e solução de pectina cítrica. Os resultados são médias de duplicatas.

Mesmo com d_{43} superior ao observado em ensaio preliminar, a carga elétrica foi suficiente para manter a emulsão primária estável ao longo do tempo de estocagem. Hu *et al.* (2003a) encontraram o potencial zeta de $62,4 \pm 0,2$ mV nas emulsões de óleo de salmão estabilizadas por β -lactoglobulina. No entanto, os autores investigaram em pH 3, condição em que haveria maior repulsão entre as partículas. Deste modo, o presente estudo demonstrou que a carga da β -lactoglobulina apresentou excelente funcionalidade.

Com a adição da pectina cítrica as emulsões foram estabilizadas por β -lactoglobulina, mantendo os valores de potencial ζ encontrados no início da estocagem. No entanto, com pectina de beterraba, houve redução significativa ($p \leq 0,05$) desse valor, garantindo a estabilidade da emulsão pelo aumento de repulsão das partículas.

Com a redução do tamanho das partículas, aumenta-se a estabilidade física mas, com o aumento da área de superfície favorece-se a exposição das partículas de óleo em solução aquosa, proporcionando a oxidação lipídica (McCLEMENTS e DECKER, 2000).

5.3.3 Avaliação da oxidação lipídica em emulsão de óleo de peixe com membrana de β -lactoglobulina e pectina cítrica ou de beterraba.

A membrana de β -lactoglobulina e pectina cítrica inibiu a formação de hidroperóxidos lipídicos na emulsão de óleo de peixe em pH 3,5 por mais de 12 dias a 37°C (Figura 5).

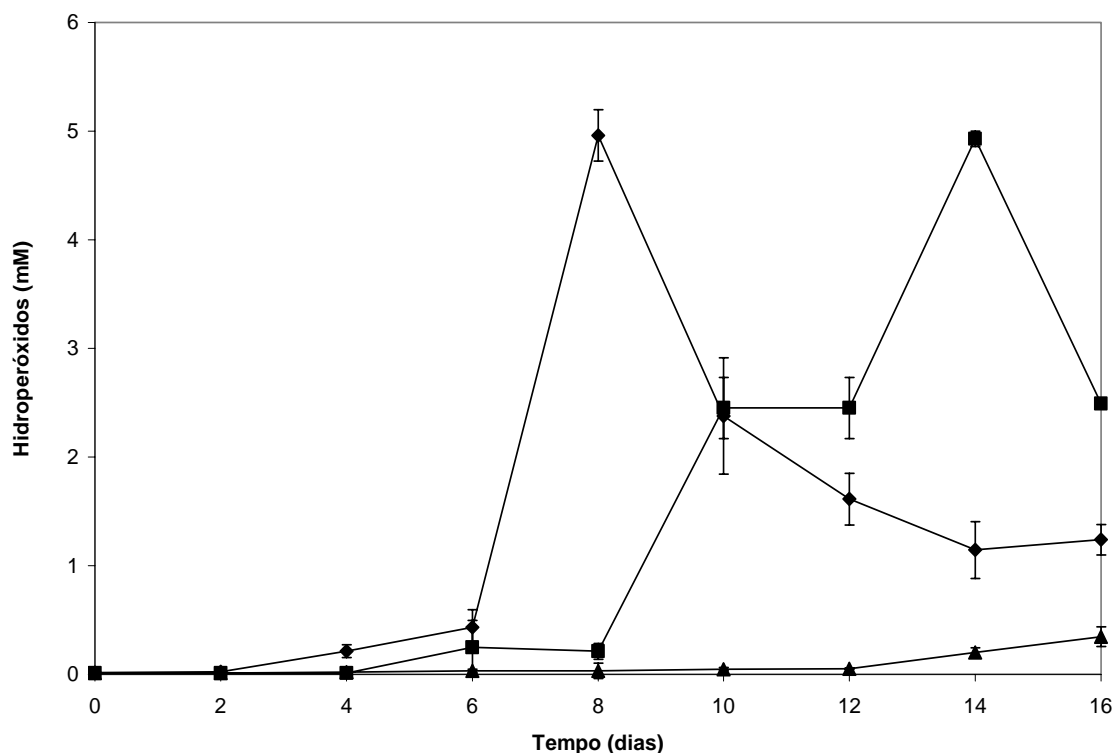


Figura 5 – Efeito da membrana de β -lactoglobulina e pectina cítrica ou de beterraba, na produção de hidroperóxidos em emulsões de óleo de peixe durante estocagem à 37°C. Emulsão com β -lactoglobulina (■), Emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (◆), Emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica (▲).

Em função da formação de hidroperóxidos lipídicos, avaliou-se a estabilidade oxidativa, sendo que a emulsão com β -lactoglobulina e pectina cítrica obteve o melhor resultado. A emulsão produzida com β -lactoglobulina e pectina de beterraba foi a mais instável. A formação de hidroperóxido na emulsão com pectina cítrica ocorreu somente após 12 dias, sendo que após 2 dias já havia formação de hidroperóxidos na emulsão com β -lactoglobulina e pectina de beterraba, e após 6 dias na emulsão primária (apenas com β -lactoglobulina). A emulsão com β -lactoglobulina e pectina cítrica apresentou produção de

$0,20 \pm 0,06$ mM após 14 dias de estocagem, enquanto a emulsão primária produziu $4,90 \pm 0,07$ mM. Hu *et al.* (2003a) obtiveram no estudo com emulsões de óleo de salmão estabilizada por β -lactoglobulina, em pH 3 a concentração de $23,4 \pm 2,4$ mmol de hidroperóxidos/Kg de óleo, após 2 dias de estocagem. Isto demonstrou que a interação da pectina cítrica com a β -lactoglobulina garantiu a estabilidade do sistema por mais de dez dias. O mesmo não ocorreu na emulsão estabilizada por β -lactoglobulina e pectina de beterraba, cuja produção de hidroperóxidos foi de $4,9 \pm 0,24$ mM após 8 dias de estocagem.

A avaliação de estabilidade oxidativa secundária, medindo-se a concentração de propanal, apresentou a mesma tendência obtida no estudo da oxidação primária, expressa em concentração de hidroperóxidos (Figura 6).

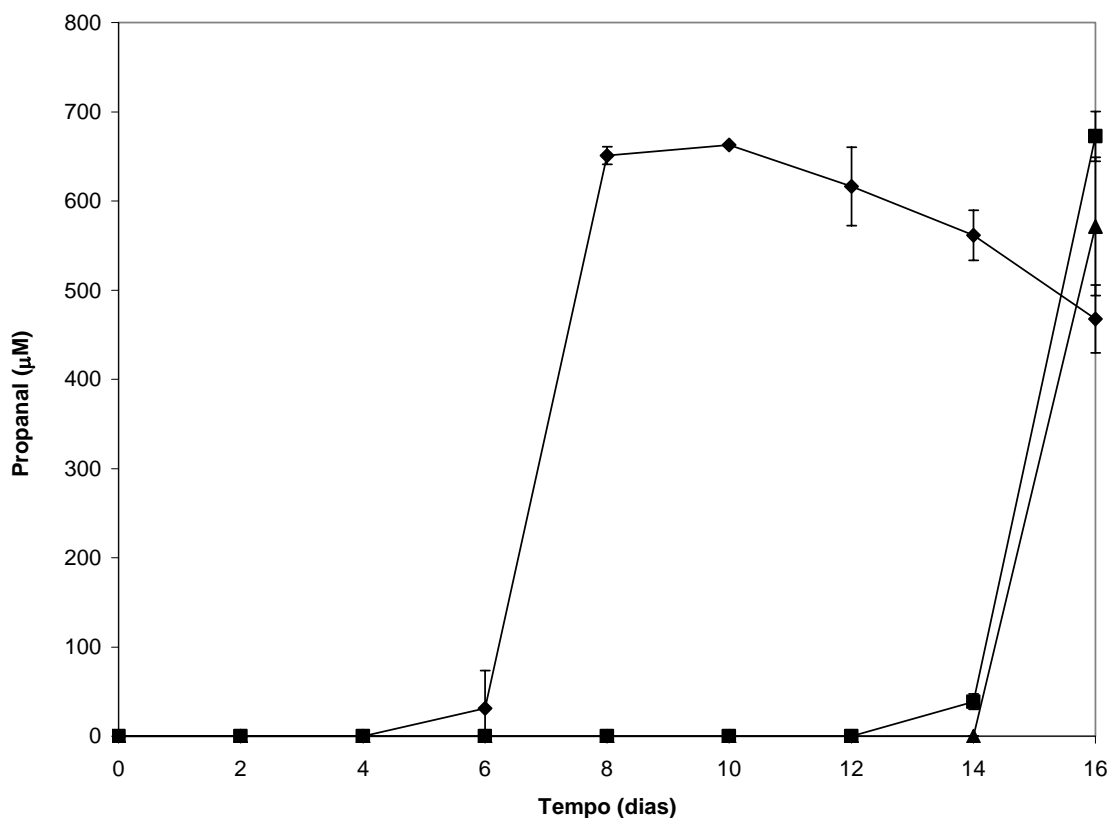


Figura 6 – Influência da membrana de β -lactoglobulina e pectina na produção de propanal em emulsões de óleo de peixe, durante estocagem à 37°C . Emulsão com β -lactoglobulina (■), emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina de beterraba (◆), emulsão secundária com β -lactoglobulina e pectina cítrica(▲).

A concentração de propanal na emulsão estabilizada por β -lactoglobulina e pectina de beterraba foi de $650,89 \pm 10,00$ μM no oitavo dia de estocagem. Durante esse período não houve formação do composto nos demais tratamentos (β -lactoglobulina e β -lactoglobulina

com pectina cítrica). Após 14 dias de experimento, ainda não havia sido observada produção de propanal na emulsão estabilizada por β -lactoglobulina e pectina cítrica. No entanto, a emulsão primária havia produzido $38,71 \pm 8,5 \mu\text{M}$ de propanal nesse período sendo esse valor inferior ao encontrado por Hu *et al.* (2003a) que obtiveram concentrações de $51,7 \pm 7,6 \mu\text{M}$ de propanal com 05 dias de estocagem.

Comparando-se com a emulsão primária, observou-se menor formação de hidroperóxidos e propanal na emulsão com pectina cítrica, indicando maior estabilidade oxidativa devido à deposição do polímero na membrana. Essa condição proporcionou uma barreira contra os agentes pró-oxidantes ao óleo de peixe por um período maior, mesmo apresentando carga negativa. Esses resultados apresentaram comportamento similar ao estudo de estabilidade oxidativa realizado por Ogawa *et al.* (2003b). Os autores produziram emulsões estáveis à oxidação, utilizando membrana de lecitina e quitosana em óleo de milho, embora a carga da emulsão secundária tenha sido catiônica.

Por outro lado, os resultados da emulsão estabilizada por membrana de β -lactoglobulina e pectina de beterraba do presente estudo não demonstraram o mesmo desempenho da emulsão com pectina cítrica, embora se conheça a ação antioxidante do ácido ferúlico (CASTELLUCCIO *et al.*, 1996; OU & KWOK, 2004).

5.3.4 Avaliação da atividade antioxidante de pectinas livres na emulsão.

Para avaliar a propriedade antioxidante das pectinas livres foi utilizada emulsão estabilizada por emulsificante não-iônico. Esse sistema favorece a não interação da pectina com o emulsificante, permitindo avaliar se a pectina livre aumenta a estabilidade oxidativa do óleo de peixe. Deste modo, a emulsão estabilizada apenas por Tween foi utilizada como controle do experimento. As emulsões adicionadas de pectina de beterraba permitiram uma formação significativa de hidroperóxidos lipídicos após 02 dias de estocagem, fenômeno observado com adição de pectina cítrica após 04 dias (Figura 7).

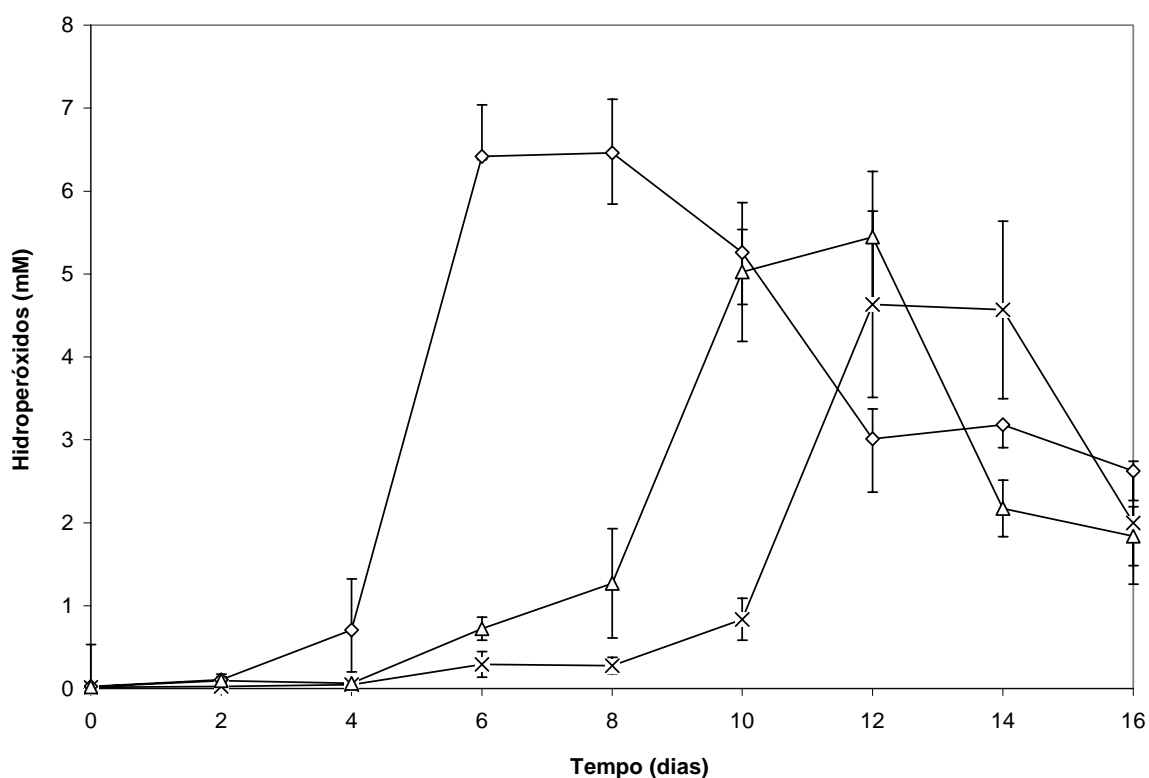


Figura 7 – Efeito das pectinas na produção de hidroperóxidos em emulsões de óleo de peixe durante estocagem à 37°C. Emulsão primária com Tween 20 (-X-), emulsão secundária com Tween 20 e pectina de beterraba (◇), emulsão secundária com Tween 20 e pectina cítrica (△)

Após 6 dias de estocagem, a emulsão adicionada de pectina de beterraba apresentou produção máxima de $6,42 \pm 0,05$ mM de hidroperóxidos, a emulsão estabilizada por Tween formou $0,29 \pm 0,15$ mM e a emulsão com pectina cítrica produziu até $0,72 \pm 0,14$ mM de hidroperóxidos. As concentrações de hidroperóxidos nesse estudo foram superiores às encontradas em emulsões estabilizadas por β -lactoglobulina e pectinas em estudo anterior, em período equivalente, uma vez que apresentaram produção de $0,42 \pm 0,16$ mM de hidroperóxidos quando se adicionou pectina de beterraba e $0,03 \pm 0,02$ mM quando se adicionou pectina cítrica (Figura 5).

A emulsão com pectina cítrica apresentou concentração máxima de $5,45 \pm 0,79$ mM de hidroperóxidos após 12 dias de estocagem. Este resultado demonstrou que a emulsão adicionada de pectina cítrica, não obteve o mesmo desempenho apresentado quando foi aplicado β -lactoglobulina para composição da membrana (Figura 5).

A avaliação da concentração de propanal apresentou a mesma tendência aos resultados obtidos na investigação de hidroperóxidos. A emulsão adicionada de pectina de beterraba apresentou concentração de $387,36 \pm 101,57 \mu\text{M}$ de propanal após 06 dias (Figura 8).

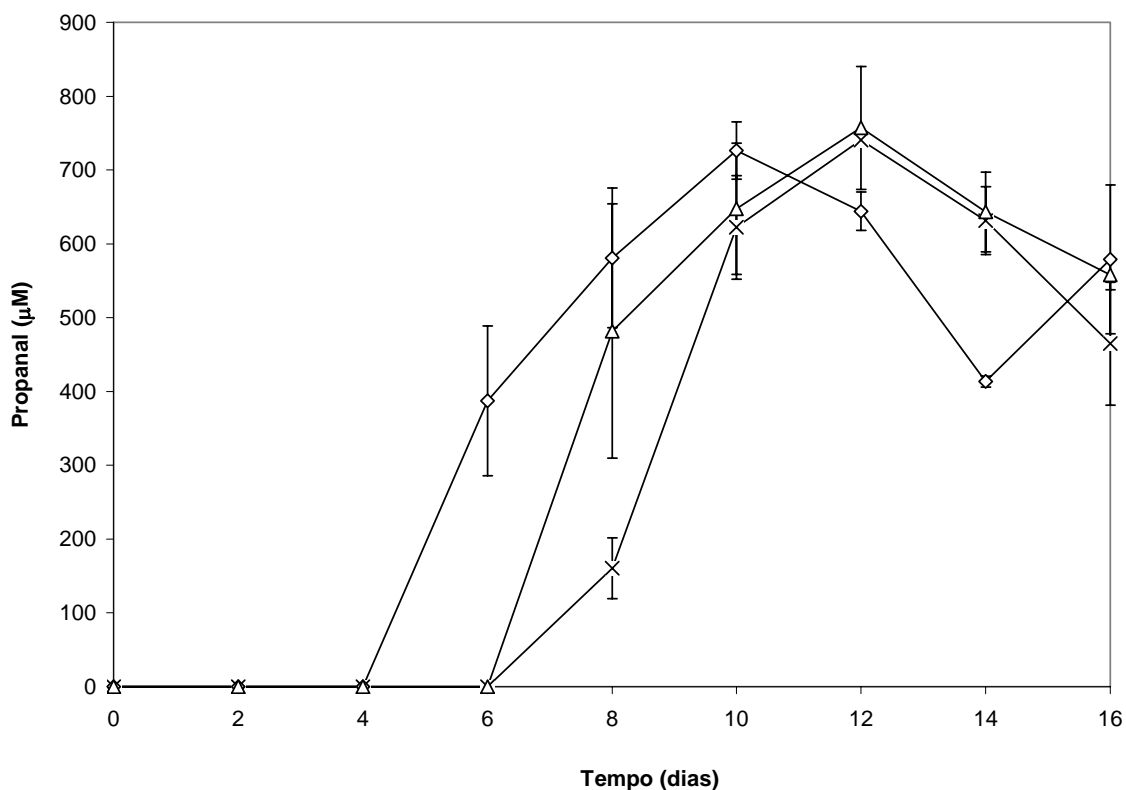


Figura 8 - Efeito das pectinas na produção de propanal em emulsões de óleo de peixe durante estocagem à 37°C. Emulsão primária com Tween 20 (-x-), emulsão secundária com Tween 20 e pectina de beterraba (◇) e emulsão secundária com Tween 20 e pectina cítrica (△).

Neste mesmo período não houve formação de propanal nas emulsões estabilizadas por Tween (controle) ou adicionada de pectina cítrica. Após 08 dias observou-se uma produção de $160,55 \pm 41,34 \mu\text{M}$ de propanal na emulsão controle e $481,76 \pm 172,14 \mu\text{M}$ de propanal na emulsão adicionada de pectina cítrica. Com a membrana formada por β -lactoglobulina e pectina cítrica, a oxidação ocorreu apenas após 16 dias (Figura 6).

No sexto dia de estocagem, a pectina de beterraba produziu $400 \mu\text{M}$ de propanal. Este resultado, quando comparado com emulsões estabilizadas por membrana de β -lactoglobulina e pectina de beterraba, demonstrou que a interação com a proteína aumentou a estabilidade oxidativa. No oitavo dia, ambas as emulsões (com e sem β -lactoglobulina) apresentavam concentrações de propanal acima de $650 \mu\text{M}$.

Este estudo permitiu observar que a pectina cítrica solubilizada não estabilizou o óleo de peixe e, conseqüentemente, não atuou como agente antioxidante. Deste modo, pode-se concluir que a funcionalidade desse polissacarídeo está associada à interação com a proteína na superfície das partículas, aumentando a barreira da membrana, e conseqüentemente, dificultando o acesso de agentes pró-oxidantes. Deve-se considerar também que a β -lactoglobulina e suas frações hidrolizadas apresentam propriedades antioxidativas quando presentes na forma solúvel ou em emulsões (FARAJI *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2005).

A pectina de beterraba não conferiu estabilidade oxidativa nos dois ensaios, mesmo possuindo o ácido ferúlico em sua estrutura, fato que teoricamente determinaria desempenho superior ao apresentado pela pectina cítrica. No entanto, verificou-se no presente estudo, a interferência de concentração significativamente maior de metais na pectina de beterraba, comparada à pectina cítrica. A pectina comercial de beterraba continha $1,91 \pm 0,02$ ppm de ferro e $0,08 \pm 0,00$ ppm de cobre, enquanto que a pectina cítrica $0,13 \pm 0,00$ ppm de ferro e $0,04 \pm 0,00$ ppm de cobre. Estes resultados demonstraram que a pectina comercial de beterraba apresentou 15 vezes mais ferro do que a pectina cítrica, afetando a ação desse polissacarídeo como antioxidante. Deste modo, propõe-se realizar estudos de extração da pectina de beterraba com elevado grau de pureza para intensificar o seu efeito como agente antioxidante.

5.4 Agradecimentos

Agradecimento à CAPES pela concessão do suporte financeiro para realizar o estágio doutoral no Department of Food Science em Amherst - MA, US.

5.5 Referências

A. O. A. C. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 14th edition, Washington DC., 1984. p.1141.

AOKI, T.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids*, v. 19, 209-220, 2005.

BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O.R. *Food Chemistry*. 3rd edition, New York: Marcel Dekker, 1996. p.159-223.

CASTELLUCCIO, C; BOLWELL, G.P.; GERRISH, C.; RICE-EVANS, C. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochemical Journal*, v.316, p.691-694, 1996.

COUPLAND, J.N. & McCLEMENTS, D.J. Lipid oxidation in food emulsions – Review. *Trends in Food Science & Technology*, v.7, p.83-91, 1996.

DALGLEISH, D.G.; HOLOCOU, A.L. Stabilization of protein-based emulsions by means of interacting polysaccharide. In: E. DICKINSON, B. BERGENSTAHL, *Food colloids: Proteins, lipids and polysaccharides*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1997. p.236-244.

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

DICKINSON, E.; GOLDING, M. Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, v.11, p.13-18, 1997.

DICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; ANTIPOVA, A.S.; PELAN, E.G. Effect of high-methoxy pectin on properties of casein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.12, p.425-432, 1998.

DJORDJEVIC, D.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A., Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential omega-3 fatty acid delivery systems (Part B). *Journal of Food Science*, v.69, n.5, C356-C362, 2004.

FARAJI, H.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A., Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n.14 , p.4558-64, 2004.

FLIDER, F.J. AND ORTHOEFER, F.T. Metals in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.58, n.3, p.270-272, 1981.

FRY, S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta*. v.157, p.111-123, 1983.

GU, Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and κ -carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of β -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.52, p.3626-3632, 2004.

HU, M; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E. A. Impact of whey protein emulsifier on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.5, p.1435-1439, 2003a.

HU, M; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipid Oxidation in Corn Oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.6, p.1696-1700, 2003b.

KAZMIERI, M.; WICKER, L.; CORREDIG, M. Interactions of betalactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. *Journal of Food Science*, v.68, p.1673-1679, 2003.

KULAS, E; OLSEN, E.; ACKMAN, R.G. Oxidation of fish lipids and its inhibition with tocopherols. In: KAMAL-ELDIN, A. *Lipid oxidation pathways*. Champaign: AOCS Press, 2003. p.37-69.

MANCUSO, J. R., McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. 2002, The Effects of Surfactant Type, pH and Chelators on the Oxidation of Salmon Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.4112-4116, 1999.

McCLEMENTS, D. J. *Food Emulsions – Principles, practices and techniques*. 2nd edition, Boca Ranton: CRC Press, 2005.

McCLEMENTS, D.J. & DECKER, E.A. Lipid oxidation in Oil-in-Water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, v.65, n.8, p.1270-1282, 2000.

MEI, L.; McCLEMENTS, D.J. ; DECKER, E.A. Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.2267-2273, 1999.

MICHEL,F.; THIBAUT, J.F,; MERCIER, C.; HEITZ,F.; POULEANDE,F. Extraction and characterization of pectins from beet pulp. *Journal of Food Science*, v.50, p.1499-1500, 1985.

MOREAU, L; KIM, H.J.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.6612-6617, 2003.

NAWAR, W.W. Lipids, In: FENNEMA, O.R., *Food Chemistry*. 3rd edition, New York: Marcel Dekker, 1996. p.225-319.

OGAWA, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 2806-2812, 2003a.

OGAWA, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.5522-5527, 2003b.

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

PIPPEN, E.L.; McCREADY, R.M.; OWENS, H.S. Gelation properties of partially acetylated pectins. *Journal of the American Chemical Society*, v.72, p.813, 1950.

RYAN, J. E.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A., Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.26, p.10248-10253, 2005.

SHANTA, N.C.; DECKER, E.A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, v.77, p.421-424, 1994.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, G.W. *Statistical Methods*, 8th ed., Ames:Iowa State University, 1989, p. 343-438.

SURH, J.; GU,Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4236-4244, 2005.

SURH, J.; GU,Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, v.20, p.607-618, 2006.

6 CONCLUSÃO

O estudo da estabilidade de emulsão de óleo de peixe produzida com membrana de caseína e pectinas demonstrou que a pectina de beterraba não apresentou suficiente carga para interagir com a caseína em pH 3, resultando em floculação.

No estudo de membrana com β -lactoglobulina, a concentração de pectina que proporcionou maior estabilidade à emulsão de óleo de peixe foi 0,06% m/m em pH 3,5.

Dentre as pectinas estudadas na composição de membrana, a pectina cítrica teve melhor desempenho na estabilidade oxidativa da emulsão do que a pectina de beterraba, embora o esperado fosse que a presença de ácido ferúlico nessa pectina tivesse maior atividade antioxidante.

A avaliação do conteúdo de ferro da amostra de pectina de beterraba foi 15 vezes superior a pectina cítrica, o que limitou a atividade antioxidante desse polissacarídeo no sistema estudado.

As pectinas, cítrica ou de beterraba, não apresentaram atividade antioxidante. A interação com a β -lactoglobulina, no entanto, proporcionou a estabilidade oxidativa observada na emulsão de óleo de peixe.

7 SUGESTÕES

Sugere-se avaliar a estabilidade física de emulsões de óleo de peixe com membrana de caseína e pectina em pH superior a 3,5.

Sugere-se o emprego de pectina de beterraba purificada para o estudo de estabilidade oxidativa de emulsão de óleo de peixe com membrana de β lactoglobulina.

REFERÊNCIAS

AMIOT, J. *Ciencia y tecnologia de la leche: principios y aplicaciones*. Zaragoza: Acribia, 1991.

AOKI, T.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p.209-220, 2005.

BAKER, L.G. High-polymer pectin and their deesterification. IN: STEWART, G.F and MRAK, E.M. *Advances in Food Nutrition Research*, 3rd edition, New York: Academic Press Inc. Publishers, 1970, v. 1.

BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: Fennema, O.R. *Food Chemistry*. 3rd edition, New York, NY: Marcel Dekker, 1996, p.159-223.

BRENNER, BRENNER, R. R. Biosynthesis and interconversion of essential fatty acids. In: A. L. Willis. *Handbook of eicosanoids: prostaglandins and related lipids. Chemical and biochemical aspects*, part A, Florida (USA): CRC Press, 1987, v.1, p. 99-117.

CONSIDINE, T.; PATEL, H.A.; ANEMA, S.G.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments – Review. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, v. 8, 2007, p.1-23.

CONNOR, W. E., Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal Clinical Nutrition*, v.71, n.1, 2000, Suppl, 171S-5S.

COUPLAND, J.N. & McCLEMENTS, D.J. Lipid oxidation in food emulsions. Review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, 1996, p. 83-91.

DALGLEISH, D.G. Adsorption of protein and the stability of emulsion. *Trends in Food Science & Technology*, v.1, n. 8, p.1-6, 1997.

DALGLEISH, D.G. Emulsions made with milk proteins: Formation and stability towards calcium ions. *Leatherhead Foods RA Food Industry Journal*, v.1, n.2, p.80-85, 1998.

DALGLEISH, D.G.; HOLLOCOU, AL. Stabilization of protein-based emulsions by means of interacting polysaccharides. In: E. DICKINSON; B. BERGENSTAHL (Eds.), *Food Colloids: Proteins, lipids and polysaccharides*, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1997, p. 236-244.

DAMODARAN, S. Interfaces, protein film, and Foams. In: KINSELLA, J.E. *Advances in Food and Nutrition Research*, California: Academic Press, 1990, v. 34, p. 1-72.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: FENEMMA, O.R. *Food Chemistry*, 3rd edition, New York:Marcel Dekker, 1996, p. 321-429.

DECKER, E.A. e WELCH, B. The role of ferritin as a lipid oxidation catalysts in muscle foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.38, p.674-677, 1990.

DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J.; CHAIYASIT, W.; NUCHI, C.; SILVESTRE, M.P.C.; MANCUSO, J.R.; TONG, L.M.; MEY L. Factors influencing free radical formation in food emulsions. In: HO, C.T. & SHAHIDI, F. *Free radicals in health and food*, ACS Press, 2002, p. 83-97.

DEMETRIADES, K.; COUPLAND, J. N.; McCLEMENTS, D. J. Physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, v.62, p.342-347, 1997.

DIAZ, M.; DECKER, E. A. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolisates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.8208-8213, 2004.

DICKINSON, E & McCLEMENTS, D.J. *Advances in food colloids*. New York: Blackie Academic & Professional, 1996. 333 p.

DICKINSON, E. Protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering*, v.22, Issues 1-4, p.59-74, 1994.

DICKINSON, E. Casein in emulsion: interfacial properties and interactions. *International Dairy Journal*, v.9, p.305-312, 1999.

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

DICKINSON, E.; GOLDING, M. Depletion flocculation of emulsions containing- unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*. v.11, p.13-18, 1997.

DICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; ANTIPOVA, A.S.; PELAN, E.G. Effect of high-methoxy pectin on properties of casein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*. v.12, p.425-432, 1998.

DJORDJEVIC, D.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A., Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential omega-3 fatty acid delivery systems (Part B). *Journal of Food Science*, v.69, n.5, p.C356-C362, 2004.

ELIAS, R.J.; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.26, p.10248-10253, 2005.

FANG, Y e DALGLEISH, D.G. Dimensions of the adsorbed layers in oil-in-water emulsions stabilized by caseins. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.156, p.329-334, 1993.

FARAJI, H.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A., Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.14, p.4558-4564, 2004.

FLIDER, F.J. and ORTHOEFER, F.T. Metals in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.58, n.3, p.270-272, 1981.

FOX, P.F. *Advanced dairy chemistry*. 2nd edition, Chapman & Hall, 1995. v.2, p.309-333.

FRY, S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta*. v.157, p.111-123, 1983.

GANCZ, K.; ALEXANDER, M.; CORREDIG, M. In situ study of flocculation of whey protein-stabilized emulsions caused by addition of high methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*. v.20, p.293-298, 2006.

GANCZ, K.; ALEXANDER, M.; CORREDIG, M. Interactions of high methoxyl pectin with whey proteins at Oil/Water Interface at acid pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p. 2236-2241, 2005.

GORDON, W.G. e KALAN, E.B. Proteins of milk. In: WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H.; ALFORD, J.A. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 2nd ed., Connecticut: The AVI Publishing Co, 1980, 929 p.

GRAF, E. e EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, v.8, p.61-69, 1990.

GU, Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and κ -carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of β -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.52, p.3626-3632, 2004.

GU, Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and carrageenan type on properties of β -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsion. *Food Hydrocolloids*, v.19, p.83-91, 2005.

GUILLOIN, F. e THIBAUT, J. F. Further characterization of acid- and alkali-soluble pectins from sugar beet pulp. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v.21, p.198-205, 1988.

HU, M; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Impact of whey protein emulsifier on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.5, p.1435-1439, 2003a.

HU, M; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipid Oxidation in Corn Oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.51, n.6, p.1696-1700, 2003b.

KAZMIERI, M.; WICKER, L.; CORREDIG, M. Interactions of betalactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. *Journal of Food Science*, v.68, p.1673-1679, 2003.

KIM, M., ATALLAH, M. T., AMARSIRIWARDENA, C.; BARNES, R. Pectin with low molecular weight and high degree of esterification increases absorption of ⁵⁸Fe in growing rats. *Journal of Nutrition*, v.126, p.1883-1890, 1996.

KINSELLA, J.E. e WHITEHEAD, D.M. Protein in Whey In: KINSELLA, J.E. *Advances in Food Nutrition Research*. USA: Academic Press, 1996. v.39.

KULAS, E; OLSEN, E.; ACKMAN, R.G. Oxidation of fish lipids and its inhibition with tocopherols. In: Kamal-Eldin, A. *Lipid oxidation pathways*, Champaign: Illinois AOCS Press, 2003. p.37-69.

MANCUSO, J. R.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.4112-4116, 1999.

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

McCLEMENTS, D. J. *Food Emulsions – Principles, practices and techniques*, 2nd edition, Boca Ranton: CRC Press, 2005. 609 p.

MEI, L.Y.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Evidence of iron association with emulsion droplets and its impacts on lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.5072-5077, 1998.

MICHEL, F.; THIBAUT, J.F.; MERCIER, C.; HEITZ, F.; POULEANDE, F. Extraction and characterization of pectins from beet pulp. *Journal of Food Science*, v.50, p.1499, 1985.

MOREAU, L.; KIM, H.J.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.6612 - 6617, 2003.

MYERS, D. *Surfaces, interfaces, and colloids - Principles and applications*. New York: VCH Publishers, 1991. 433 p.

NAWAR, W.W. Lipids. In: Fennema, O.R. *Food Chemistry*. 3rd edition, New York: Marcel Dekker, 1996. p.225-319.

OGAWA, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.2806-2812, 2003a.

OGAWA, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.5522-5527, 2003b.

PIPPEN, E.L.; McCREADY, R.M.; Owens, H.S. Gelation properties of partially acetylated pectins. *Journal of the American Chemical Society*, v.72, p. 813-816, 1950.

PONGSAWATMANIT, R., HARNSILAWAT, T., McCLEMENTS, D.J. Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 287, n. 1, p. 59-67, 2006.

RADFORD, S.J. & DICKINSON, E. Depletion flocculation of caseinate-stabilized emulsions: what is the optimum size do the non-adsorbed protein nano-particles? *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 238, 71-81, 2004.

SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades-degradações-modificações*. São Paulo: Edunicamp, 1996.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.70 (suppl.), p.560S-569S, 1999.

SURH, J.;GU, Y.S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4236-4244, 2005.

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin-A review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.37, p.47-73, 1997.

THIBAUT, J.F. Characterisation and oxidative cross linking sugar beet pectins extracted from cossetes and pulps under different conditions. *Carbohydrate Polymer*, v. 8, p. 209-223, 1988.

THIBAUT, J.F.; RENARD, C.M.G.C.; AXELOS, M.A.V; ROGER, P.; CRE'PEAU, M.-J. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid-hydrolysis. *Carbohydrate Research*, v. 238, p. 271-286, 1993.

TONG, L.M.; SASAKI, S.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E.A. Mechanism of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.1473-1478, 2000.

VEISSEYRE, R. *Lactologia técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche* 2ª. Ed. Zaragoza: Acribia, 1988

WANG, Q.; PAGÁN, J.; SHI, J. Pectin from fruits. In: SHI, J.X.; MAZZA, G.; MAQUER, M.L. *Functional Foods – Biochemical & Processing Aspects*. Vol. 2, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 264-330, 2002.

YONGMANICHAJ, W. & Ward O.P. Omega-3 fatty acids: Alternative sources of production. *Prog. Biochem.* v.24, p.117-125, 1989.

ZATSICK, N.M. & MAYKET, P. Fish oil getting to the heart of it. *The Journal for Nurse Practitioners*, p. 104-109, 2007.