

ARLAN CALDAS PEREIRA SILVEIRA

**PROPRIEDADES REOLÓGICAS E INTERFACIAIS DE SISTEMAS
MODELO CONSTITUÍDOS DE ÁGUA, PROTEÍNAS LÁCTEAS E
FOSFOLIPÍDEOS EM DIFERENTES PROPORÇÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S587p
2012

Silveira, Arlan Caldas Pereira, 1987-

Propriedades reológicas e interfaces de sistemas modelo constituídos de água, proteínas lácteas e fosfolípidos em diferentes proporções / Arlan Caldas Pereira Silveira.

– Viçosa, MG, 2012.

xiii, 82f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 63-82.

1. Leite - Proteínas. 2. Reologia. 3. Físico-química.
4. Termodinâmica. 5. Caseína. 6. Evaporação. 7. Secagem.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 637.14

ARLAN CALDAS PEREIRA SILVEIRA

**PROPRIEDADES REOLÓGICAS E INTERFACIAIS DE SISTEMAS
MODELO CONSTITUÍDOS DE ÁGUA, PROTEÍNAS LÁCTEAS E
FOSFOLIPÍDEOS EM DIFERENTES PROPORÇÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2012.

Ítalo Tuler Perrone
(Coorientador)

Eduardo Basílio Oliveira

Marco Antônio Moreira Furtado

Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

*"L'encre du savant
est aussi précieuse
que le sang du martyr"*

Dedico:

Aos meus pais Hécio e Maristela

Pelo amor, doação e apoio de vida

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche Science et Technologie du Lait e du L'Oeuf (UMR - STLO) e à equipe 'Transfert et Interactions dans les Procédés de l'Industrie Laitière (TIPIIL)', pela oportunidade de executar meu experimento de mestrado.

A diretora do UMR STLO Sylvie LORTAL pela oportunidade de realizar meu trabalho.

Meus orientadores franceses: Cécile LE FLOCH – FOUERE et Romain JEANTET, por ter me acolhido, pela confiança, pelos conselhos úteis durante o trabalho e pela franca colaboração que me permitiu realizar este projeto de pesquisa.

Agradeço igualmente a Pierre SCHUCK pela ajuda e conselhos super interessantes.

Agradeço a Arnault SAINT-JALMES, pela disponibilidade quanto a utilização do goniômetro.

Um agradecimento sem igual a Antônio FERNADES DE CARVALHO pelo apoio em todos os momentos de minha vida de estudante.

Aos professores Ítalo TULER PERRONE e Eduardo BASÍLIO OLIVEIRA, pela participação e auxílio.

Obrigado a Naaman, Michele, Lívia, Marc, Jorge, François por todos os almoços muito proveitosos.

Para terminar agradeço do fundo de meu coração a Julia LOPARDI NICOLATO, pelo seu apoio moral.

BIOGRAFIA

ARLAN CALDAS PEREIRA SILVEIRA, filho de Hécio Caldas Silveira e Maristela Pereira Silveira, nasceu em Raul Soares, Minas Gerais, em 06 de julho de 1987.

Em maio de 2006 iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em janeiro de 2010.

Em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, em nível de Mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. Introdução	1
1. Revisão de Literatura	4
1.1 Leite	4
1.2 Micelas de caseína	7
1.3 Proteínas Solúveis	11
1.3.1 β -Lactoglobulina	13
1.3.2 α -Lactoalbumina	14
1.4 Secagem	15
1.5 Proteínas na interface	21
2. Materiais e métodos	29
2.1 Materiais	29
2.2 Preparação das dispersões protéicas	29
2.3 Análises Físico-químicas	30
2.3.1 Determinação de Densidade	30
2.3.2 Nitrogênio	31
2.3.3 Matéria seca	31
2.3.4 Cinzas	31
2.3.5 Determinação do tamanho das partículas	31
2.4 Comportamento reológico	32
2.5 Análises interfaciais	33
2.5.1 Tensão superficial	33

2.5.2	Reologia de cisalhamento interfacial.....	34
2.5.3	Reologia de dilatação interfacial	35
2.6	Análises estatísticas	36
3.	Resultados.....	37
3.1	Caracterização físico-química dos sistemas protéicos	37
3.2	Comportamento reológico.....	41
3.3	Tensão interfacial	48
3.4	Reologia de cisalhamento interfacial	52
3.5	Reologia de dilatação interfacial	55
4.	Discussão	58
5.	Conclusão.....	61
6.	Referências Bibliográficas	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. « Cracking » do leite (Schuck, 2002).	6
Figura 2. Modelo de micela de caseína em estrutura aberta (Holt, 2003).....	10
Figura 3. Estrutura tridimensional de um monômero de β -lactoglobulina (Qin et al., 1998).....	13
Figura 4. Estrutura tridimensional de uma molécula de α -lactalbumina (Qin et al., 1998).....	14
Figura 5. Princípio de secagem por atomização (Bimbenet, 1978).....	16
Figura 6. Esquema do princípio da torre de secagem ‘simples estágio’	18
Figura 7. Esquema do princípio da torre de secagem ‘dois estágios’	19
Figura 8. Esquema do princípio da torre de secagem ‘três estágios’.....	20
Figura 9. Esquema das camadas de proteína adsorvida na interface, submetidos à compressão da área interfacial, como em uma experiência de reologia de dilatação.....	27
Figura 10. Distribuição de tamanho (intensidade em %) em função do diâmetro hidrodinâmico (nm) das soluções de PPCN a concentração de 15% (m/m) de proteínas.....	32
Figura 11. Esquema de um goniômetro à gota pendente e de um reômetro de dilatação de interfaces.....	34
Figura 12. Reômetro de sensor de cone duplo	35
Figura 13. Detecção da posição do disco na interface ar/água pelo captor de força normal.	35
Figura 14. Viscosidade de dispersões a diferentes concentrações de PPCN. (◆) viscosidade aparente.....	42
Figura 15. Comportamento reológico de todas as dispersões de PS e PPCN/PS (50-50) em ausência e presença de PL. (▲) dispersões a 15% (m/m) de proteínas, (■) dispersões a 10% (m/m) de proteínas e (■) dispersões a 5% (m/m) de proteínas, em presença e ausência de PL. (A) Reograma, tensão de	

cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.....44

Figura 16. Comportamento reológico de todas as dispersões de PPCN/PS (80-20) em ausência e presença de PL. (▲) dispersões a 5% (m/m) de proteínas e (■) dispersões a 10% (m/m) de proteínas, em presença e ausência de PL; (●) dispersões a 15% (m/m) de proteínas em ausência e presença de 0,5% de PL; e (◆) dispersões a 15% (m/m) de proteínas em presença de 1% de PL. (A) Reograma, tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.....45

Figura 17. Comportamento reológico de todas as dispersões de PPCN, a concentração de proteínas inferior a 15%, em ausência e presença de PL. (●) dispersões a 10% (m/m) de PPCN em presença de 1% de PL, (▲) dispersões a 10% (m/m) de PPCN em ausência de PL; e (■) dispersões a 5% (m/m) de proteínas, em presença e ausência de PL. (A) Reograma, tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.46

Figura 18. Comportamento reológico de todas as dispersões de PPCN, a concentração de 15% (m/m) de PPCN, em ausência e presença de PL. (●) ausência em PL; (▲) presença de 0.5% (m/m) em PL; e (■) presença de 1% (m/m) em PL. (A) Reograma, tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.47

Figura 19. Tensão interfacial da superfície ar/água, medida a 40 °C com uma cinética de 600 segundos em função da concentração de proteínas em ausência de PL (◆); presença de 0,5% (m/m) de PL (■); e presença de 1% (m/m) de PL (▲). (A) dispersões de PS; (B) dispersões de PPCN; (C) dispersões de PPCN/PS (50-50); e (D) dispersões de PPCN/PS (80-20).50

Figura 20. Evolução temporal da tensão interfacial da interface ar/água, medida a 40 °C, das dispersões protéicas à concentração de 15 % (m/m) em: (◆) PS; (■) PPCN; (▲) PPCN/PS (50-50); e (✕) PPCN/PS (80-20). (A) dispersões em ausência de PL; (B) dispersões em presença de 0,5 % (m/m) de PL: e (C) dispersões em presença de 1% (m/m) de PL.51

Figura 21. Medidas de G_i' (círculo) e G_i'' (quadrado) em varredura em frequência de todas as soluções em ausência de PL; Soluções de PS (símbolos fechados) e soluções de PPCN/PS 50-50 (símbolos abertos).....53

Figura 22. Medidas de G_i' (círculo) e G_i'' (quadrado) em varredura de frequência de todas as soluções em presença de 1% de PL (símbolos fechados) e 0,5% de PL (símbolos abertos).53

Figura 23. Evolução temporal do módulo de elasticidade na interface ar/água, medido a 40 °C, das dispersões de proteínas a concentração de 15 %. Dispersões de PS em ausência de PL (◆); dispersões de PS em presença de PL (0,5% e 1%) e solução de PPCN/PS 50-50 em ausência de PL (■); Dispersões de PPCN e PPCN/PS 50-50 em ausência de PL (×); Dispersões de PPCN em presença de PL (●); Dispersões de PPCN/PS 80-20 em ausência e presença de PL (0,5% e 1%) (■).56

Figura 24. Evolução temporal do módulo de elasticidade na interface ar/água, medido a 40 °C, das dispersões de PPCN; em ausência e presença de 0,5% de PL (◆); dispersões a 15% de PPCN em presença de 1% de PL (●); dispersões a 10% de PPCN em presença de 1% de PL (✱); dispersões a 5% de PPCN em presença de 1% de PL (✕).56

Figura 25. Tensão interfacial da interface ar/água em função do módulo de elasticidade, medida a 40 °C, das dispersões de diferentes concentrações de PPCN: dispersões em ausência de PL (■); dispersões a 15% de PPCN em presença de 1% de PL (●); dispersões a 10% de PPCN em presença de 1% de PL (✱); dispersões a 5% de PPCN em presença de 1% de PL (✕)..57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal do leite de vaca.....	5
Tabela 2. Principais características das caseínas de origem bovina (Swaisgood, 2003; Farrel et al., 2004).....	8
Tabela 3. Características gerais das micelas de caseína (Fox, 2008).....	9
Tabela 4. Composição do soro bovino.....	12
Tabela 5. Evolução de secagem por atomização (Sougnez, 1983).....	18
Tabela 6. Parâmetros utilizados para as medidas da distribuição de tamanho à 25°C.....	32
Tabela 7. Composição bioquímica do fosfolípídeo utilizado. Dados fornecidos pelo fornecedor.....	38
Tabela 8. Composição bioquímica do PPCN utilizado (média de três determinações ± desvio padrão).....	38
Tabela 9. Composição bioquímica do PS utilizado (média de três determinações ± desvio padrão).....	38
Tabela 10. Composição protéica e sólidos totais das dispersões preparadas..	39
Tabela 11. Composição bioquímica das dispersões preparadas.....	40
Tabela 12. Viscosidade a taxa de deformação de 100s^{-1} (η_{100}) das dispersões protéicas.....	43
Tabela 13. Inclinações das curvas de tensão iterfacial em função do tempo, das dispersões à 15% (m/m) de proteínas. Mesmas letras em uma mesma coluna não diferem significativamente.....	49

RESUMO

SILVEIRA, Arlan Caldas Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Propriedades reológicas e interfaciais de sistemas modelo constituídos de água, proteínas lácteas e fosfolípidos em diferentes proporções.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Ítalo Tuler Perrone, Afonso Mota Ramos e Luis Antônio Minim.

As proteínas do leite são largamente utilizadas nas indústrias alimentícias. Elas podem ser classificadas em relação a suas estruturas: proteínas flexíveis, para as caseínas e as proteínas globulares, para as proteínas solúveis. A superfície do pó reflete a interface ar/água das gotículas de secagem e sabe-se pouco a respeito das interações protéicas que podem se produzir na fabricação dos lácteos em pós. O objetivo deste trabalho foi de elucidar os mecanismos de formação de interfaces ar/água, entre estes dois tipos de proteínas, em função da presença e ausência de fosfolípidos, e de se focar na ligação existente entre estas proteínas e os processos utilizados industrialmente na atomização. A utilização simultânea, de tensão interfacial, de reologia de cisalhamento interfacial e de reologia de dilatação interfacial permitiu a caracterização das propriedades interfaciais de diferentes misturas a alta concentração de proteínas, e de fosfolípidos na interface ar/água. As soluções de caseínas e proteínas solúveis mostraram comportamentos diferentes na interface ar/água. Existe uma interação entre as moléculas de caseínas e fosfolípidos ao curso de suas adsorções na interface ar/água. No mais outro resultado interessante deste trabalho, mostra que a adição de fosfolípidos em soluções de alta concentração de caseínas, antes do processo de atomização, não é suficiente para diminuir o tamanho das gotas formadas nos processos de atomização.

ABSTRACT

SILVEIRA, Arlan Caldas Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Rheological and interfacial properties of model systems consisting of water, milk proteins and phospholipids in different proportions.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-Advisers: Ítalo Tuler Perrone, Afonso Mota Ramos and Luis Antônio Minim.

Milk proteins are widely used in food industry. They can be classified in relation to their structure: caseins are flexible proteins, while the soluble proteins are globular. The surface of the powder reflects the air / water interface of droplet drying and we know relatively little about protein interactions that may occur during the manufacture of powder. The objective of this work is to understand the mechanisms of formation of air / water interfaces, between these two different proteins, in the presence and absence of phospholipids, and to examine the link between these properties and the spray-drying processes used. The simultaneous use of surface tension, interfacial shearrheology, and interfacial expansion rheology has allowed us to characterize the interfacial properties of different solutions of high protein concentration. Caseins and soluble protein solutions show different behaviors at the air / water interface. There is an interaction between the molecules of phospholipids and caseins during their adsorption at air / water interface. In addition, another interesting result of this work shows that the addition of phospholipids in highly concentrated solutions of casein before the atomization process is not sufficient to reduce the droplet size formed during atomization.

1. Introdução

Além de suas características nutricionais as proteínas do leite são utilizadas como ingredientes em indústrias alimentícias devido a suas propriedades funcionais. As proteínas do leite podem ser classificadas em relação a suas estruturas em proteínas flexíveis para as caseínas e proteínas globulares para as proteínas solúveis (Dickisonm 2001). As caseínas apresentam uma estrutura dinâmica e constituída das proteínas α , β , κ -caseína. As duas principais proteínas solúveis são α -Lactalbumina e a β -Lactoglobulina sendo que esta última representa 50 a 60 % das proteínas do soro. Uma característica importante das proteínas do soro é que elas contêm pontes dissulfetos com estruturas terciárias, e preservam sua forma globular mesmo após adsorção em uma interface. Em consequência destas características a estrutura molecular das proteínas tem um forte impacto sobre suas propriedades reológicas e interfacias. Como as proteínas do leite podem ser degradadas pela ação física ou microbiológica elas são secas por pulverização para minimizar a velocidade das principais reações de deteriorização, reduzir custos de transporte e para facilitar a manipulação.

Desde os anos 80, a indústria de laticínios tem desenvolvido novos processos tecnológicos para extrair e purificar proteínas, tais como as proteínas do leite e do soro de leite (Caron et. al., 1997; Goudédranche et. al., 1980; Le Graët et. al., 1979; Madsen & Bjerre,1981; Maubois et. al., 1987), caseína micelar (Fauquant et. al., 1988; Schuck et. al., 1994a) phosphocaseinato nativo (Pierre et. al., 1992; Schuck et. al., 1994b), e proteínas do soro de leite desmineralizado (Jeantet et. al., 1996). Este desenvolvimento se deve, em grande parte, ao surgimento da tecnologia de membranas (microfiltração, ultrafiltração nanofiltração, e osmose inversa).

Como as proteínas do leite são perecíveis, estas são estabilizadas por processos de secagem, pela remoção de parte de sua água, com o objetivo de aumentar seu tempo de prateleira, diminuir custos de transporte e estocagem, dentre outros. O processo de secagem mais comum utilizado para a desidratação destas proteínas é o processo de spray-dryer, durante o qual as soluções de proteínas são transformadas em pó pela eliminação da quase totalidade de seu conteúdo em água. A influência da composição do líquido a

ser seco sobre a composição da interface dos pós foi estudada por espectrometria fotoeletrônica de raios X (XPS) (Fäldt & Bergenstahl, 1996; Gaiani et al, 2006.; Kim, 2008). Todos esses autores mostraram que a composição da interface do pó é muito diferente da composição média do seu interior . Quando um componente tensoativo está presente no líquido a ser seco, como proteína ou fosfolípidos, a superfície do pó é recoberta por este componente (Gaiani, et al. 2007; Kim 2008). Outros autores sugeriram que a superfície do pó refletia a interface ar/água das gotículas de secagem (Fäldt, 1995; Landström et. al., 2000; Landström, et. al., 2003). Os processos de pulverização durante a secagem, provocam igualmente várias alterações estruturais e transformações físico-químicas que podem influenciar as propriedades funcionais dos pós, como a molhabilidade (Fäldt & Bergenstahl, 1996;. Gaiani et al, 2009), a aglomeração (Nijdam & Langrish, 2006), a fluidez (Onwulata, et. al., 1996) ou ainda a estabilidade à oxigenação (Hardas, et. al., 2000). Quando diferentes componentes tensoativos são misturados a adsorção concorrencial, ou seja a concorrência pela adsorção na interface, é um fenômeno comum.

De acordo com Dickson (2001) é possível identificar três etapas principais ao curso dos processos de adsorção nas interfaces. A primeira etapa é a passagem das proteínas através da interface, em seguida se produzem as ligações entre as proteínas na interface, e por fim, acontecem os arranjos estruturais na camada adsorvida (Dickson, 2001). Este fenômeno é bem documentado e várias informações são disponíveis no domínio das emulsões (Dickinson, et. al., 1988 a; McClements, 2004) e de espumas (Marinova et al., 2009; Zhang & Goff, 2004). é difícil comparar os estudos onde se é permitido que a adsorção atinja o equilíbrio, altas escalas de tempo (emulsões, espuma) com resultados onde a adsorção é interrompida, ao curso da atomização, por exemplo, após uma fração de segundos (Fäldt, 1995). Em consequência, sabe-se muito pouco a respeito das competições entre as proteínas ao nível da adsorção na interface ar/água em uma gotícula de secagem.

As propriedades funcionais dos leites em pó podem ser controladas pelo conhecimento de seus elementos e das técnicas utilizadas, como o tratamento térmico, a homogeneização, a filtração, a concentração e a secagem. Os fatores que controlam as características físicas (a solubilidade, a

dispersibilidade etc.), são bem documentados. Existem poucas informações na literatura científica sobre as interações entre proteínas que podem ocorrer durante a fabricação dos produtos desidratados e como essas interações podem influenciar sua funcionalidade (Singh, 2007).

Existe igualmente pouca informação disponível sobre a relação entre as propriedades funcionais e os processos de alterações induzidos ao nível das proteínas. A fim de se produzir novos produtos lácteos desidratados com propriedades funcionais específicas, a compreensão quantitativa da funcionalidade, e sua relação com as diversas alterações nos componentes do leite ,durante a fabricação, deverão ser desenvolvidas.

O objetivo deste trabalho foi o de entender os mecanismos de formação de interfaces ar/água entre dois grupos de proteínas de estruturas diferentes: um de estrutura micelar, constituída pelas caseínas nativas (PPCN); outro de estrutura globular constituído pelas proteínas solúveis (PS); na presença e na ausência de fosfolipídeos (PL). Adicionalmente, objetivou-se correlacionar essas propriedades com os processos utilizados industrialmente para a secagem de produtos lácteos.

1. Revisão de Literatura

1.1 Leite

O leite pode ser entendido como um fluido secretado pelas fêmeas de mamíferos com o propósito de satisfazer os requerimentos nutricionais dos recém nascidos. Como tal, constitui-se na única fonte de energia, provida por lipídeos e lactose, aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas, elementos inorgânicos e água para os neonatos. Apresenta ainda um importante papel fisiológico representado principalmente por fatores de crescimento, enzimas, hormônios, compostos antibacterianos, proteínas e peptídeos, incluindo imunoglobulinas (Fox, 2003).

O valor médio de pH do leite bovino situa-se em 6,7 sob temperatura ambiente. Apresenta uma constante dielétrica média de 80, à temperatura de 20° C, a qual é aproximadamente a mesma da água pura. Embora a viscosidade seja duas vezes maior que a da água, comporta-se como fluido newtoniano. As substâncias dissolvidas conferem pressão osmótica média de 700 kPa (7 bar) e atividade de água de 0,995. Possui densidade média de 1029 kg/m³ que varia principalmente em função do teor de gordura (Walstra, 2006).

Sob uma perspectiva físico-química, o leite é uma secreção de pH próximo à neutralidade, que se constitui em uma emulsão de gorduras e água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas, em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas e outras proteínas. Possui também enzimas, anticorpos, hormônios, pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina), células (epiteliais, leucócitos, bactérias e leveduras) e gases dissolvidos (CO₂, O₂ e N₂) (Walstra, 2006). A composição do leite é mostrada na Tabela 1.

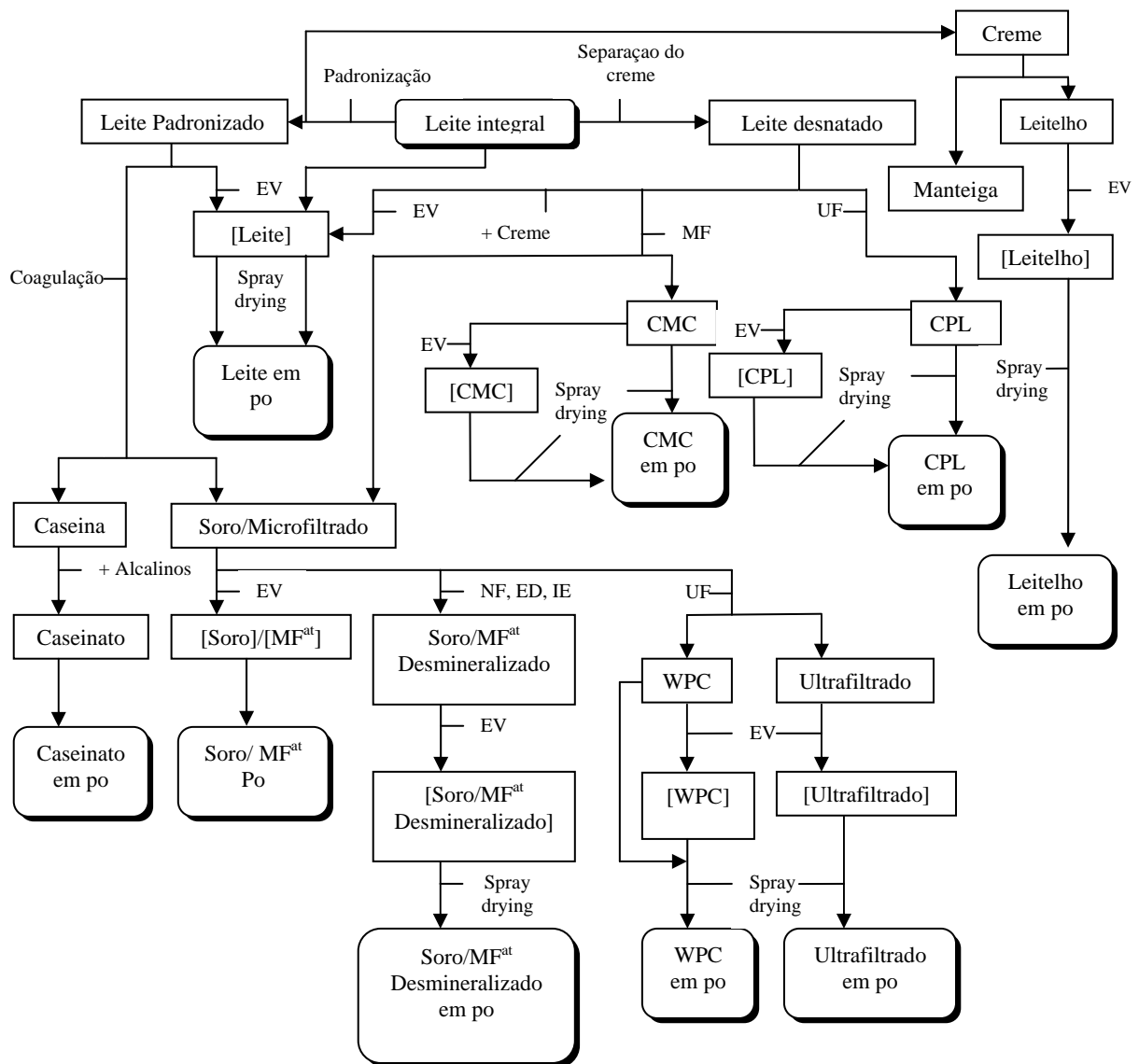
Tabela 1. Composição centesimal do leite de vaca.

Constituinte	Conteúdo médio no leite (% m/m)	Variação (% m/m)
Água	87,1	83,5 – 88,7
Sólidos não-gordurosos	8,9	7,9 – 10
Gordura no extrato seco	31	22 – 38
Lactose	4,6	3,8 – 5,3
Gordura	3,6	2,5 – 5,5
Proteínas	3,4	2,3 – 4,4
Caseínas	2,6	1,7 – 3,5
Minerais	0,7	0,57 – 0,83
Ácidos orgânicos	0,17	0,12 – 0,21
Diversos	0,15	-

Fonte: (Walstra, 2006).

A matéria nitrogenada do leite representa aproximadamente 3,4 % de sua massa. Ela pode ser dividida fundamentalmente em três grupos: caseínas, proteínas do soro e nitrogênio não protéico. A caseína corresponde a 80 % (m/m) do total protéico no leite bovino, e pode ser subdividida em quatro frações principais, α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína, que se associam para formarem a micela de caseína. As proteínas do soro apresentam formato globular, sendo que as principais encontradas no leite bovino são β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro sanguíneo (BSA) e imunoglobulinas. O leite bovino também possui quantidade expressiva de minerais, sendo que se destacam o cálcio e o fósforo, além de vitamina A do complexo B (Fox, 2003).

A maioria destas proteínas, usadas como ingredientes nutricionais ou funcionais, são comercializadas na forma desidratada (Figura 1). O "Cracking" do leite em diferentes formas desidratadas e estáveis levou a um aumento súbito no uso de produtos lácteos intermediários. Novas utilizações destes constituintes surgiu com a fabricação de novos produtos para formulações, substitutos e adaptadores de matéria-prima.



Legenda:

[]: Concentração à vacuo

CMC: Concentrado de micelas de caseína

WPC: Concentrado de proteínas solúveis

CPL: Concentrado de proteínas do leite

ED: Eletrodialise

IE: Troca iônica

EV: Evaporação à vacuo

MF: Microfiltração 0,1 µm

MF^{at}: Microfiltrado

NF: Nanofiltração

UF: Ultrafiltração

Figura 1. « Cracking » do leite (Schuck, 2002).

1.2 Micelas de caseína

Segundo Fox (2003) as quatro principais caseínas do leite bovino são α_{s1} , α_{s2} , β e κ e representam respectivamente 37, 10, 35 e 15 % do total de caseínas. Entre suas principais características (Tabela 2), duas apresentam papel fundamental para a estrutura. A primeira diz respeito à importante presença de resíduos de prolina, principalmente na β -caseína, na qual representa 17 % do total dos aminoácidos. A presença de múltiplos resíduos de prolina afeta a organização espacial das proteínas, interrompendo estruturas secundárias do tipo α -hélice e folha β . A segunda refere-se à presença de dois resíduos de cisteína nas frações α_{s2} e κ -caseína, que permitem a formação de pontes dissulfeto intra ou intermoleculares. Além desses fatores, as caseínas são ricas em resíduos de glutamina e asparagina que estão sob forma ionizada ($pK = 4,5 - 4,7$) no pH do leite, e contribuem significativamente para a formação de cargas negativas.

Caseína pode ser definida como uma proteína micelar precipitada por acidificação do leite desnatado a pH 4,6 e a temperatura de 20°C, sendo classificada como fosfoproteína, devido à presença de fósforo (Sgarbieri, 1996).

A capacidade das caseínas de formarem estruturas similares a micelas quando em solução, advém da natureza anfifílica das suas moléculas. No leite, as caseínas são associadas por meio de ligações de seus grupos de fosfato de cálcio, formando micelas com diâmetro aproximado de 200 nm (De Kruif, 2003). Quando o fosfato de cálcio é removido, as micelas se dissociam em monômeros e, ou submicelas de caseína (Walstra, 1990).

A caseína possui regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (De Kruif e Grinberg, 2002). A conformação das moléculas expõe consideravelmente os resíduos hidrofóbicos, o que resulta em forte associação entre as caseínas e as torna insolúveis em água.

Tabela 2. Principais características das caseínas de origem bovina (Swaisgood, 2003; Farrel et al., 2004).

	α -s1 caseína (Variante B 8P)	α -s2 caseína (Variante A 11P)	β -caseína (Variante A ² 5P)	κ -caseína (Variante B 1P)
Nº de variantes genéticas	5	4	7	2
Massa Molar (Da)	23614	25230	23983	19023
Concentração (g/L)	10	2,6	9,3	3,3
Amino-ácidos	199	207	209	169
Prolina	17	10	35	20
Cisteína	0	2	0	2
Ácido glutâmico	24	25	18	13
Ácido aspartico	7	4	4	4
Fosfoserina	8	11	5	1
Glicosilação	0	0	0	0 – 5
Carga pH 6,6 (mV)	-21	-15	-12	-3
pI	4,94	5,37	5,14	5,90
Precipitação (CaCl ₂ / pH 7)	+	+	+	-

O termo micelas de caseínas foi utilizado inicialmente no trabalho de Beau (1932). Todavia somente a partir dos trabalhos de Waugh e colaboradores (1956, 1965, 1971) que começou ser amplamente difundido nas publicações científicas sobre leite e derivados lácteos.

No Compêndio de Terminologia Química publicado pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1997), as micelas de caseína podem ser descritas como partículas de tamanho coloidal, denominadas como supramoléculas, ou ainda como entidades moleculares organizadas e mantidas em conjunto por meio de interações intermoleculares não covalentes. Na tabela 3 encontra-se algumas das características gerais das micelas de caseína.

Por meio de microscopia eletrônica constata-se que as micelas de caseína são geralmente esféricas com diâmetro variando de 50 a 500 nm, média de 150 nm, e massa variando de 10^6 a 3×10^9 Da, média de 10^8 Da. São encontradas em uma proporção de 10^{14} a 10^{16} micelas.mL⁻¹ de leite. Pequenas

micelas também estão presentes em grande quantidade, porém representam ínfima proporção da massa (FOX, 2003).

Tabela 3. Características gerais das micelas de caseína (Fox, 2008).

Características	Valor
Diâmetro	150 nm (variando de 50-500 nm)
Área superficial	$8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$
Volume	$2,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
Densidade (hidratada)	$1,0632 \text{ g.cm}^{-3}$
Massa	$2,2 \times 10^{-15} \text{ g}$
Conteúdo de água	63 %
Hidratação	$3,7 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$
Massa Molar (hidratada)	$1,3 \times 10^9 \text{ Da}$
Massa Molar (desidratada)	$5 \times 10^8 \text{ Da}$
Nº cadeias polipeptídicas	5×10^3
Nº partículas por mL de leite	$10^{14} - 10^{16}$
Superfície micelar por mL de leite	$5 \times 10^4 \text{ cm}^2$
Distância livre média	240 nm

As caseínas não apresentam conformação terciária (tridimensional) rígida e possuem a capacidade de modificar-se rapidamente às mudanças ambientais. Uma análise preliminar da sequência de aminoácidos das caseínas sugere uma conformação estendida dessas proteínas em função da elevada frequência de resíduos de prolina, acarretando conseqüentemente na redução de conformações secundárias e terciárias. Entretanto, o estabelecimento de um modelo conformacional para as micelas de caseína ainda demanda estudos com elevado grau de sofisticação, incluindo ressonância magnética nuclear, modelagem molecular e microscopias eletrônicas. Segundo Horne (2009) para qualquer modelo de micela de caseína sugerido faz-se necessário considerar a localização superficial da κ -caseína assim como seu papel estabilizador.

Em meio aos vários modelos propostos para a estrutura da micela de caseína, um em particular parece mais consistente, o modelo de estrutura aberta (Figura 2) (Holt, 1992; De Kruif e Holt, 2003; Dalgleish, 2004). Nesse

modelo as moléculas de κ -caseína apresentam-se com a parte C-terminal proeminente, estendendo-se de 5-10 nm da superfície da micela, para formar uma camada denominada pilosa (*hairy-layer*). Essa camada confere estabilidade à micela devido ao seu baixo potencial zeta de - 20 mV, somado à estabilização espacial (De Kruif e Holt, 2003).

Horne (1998, 2006) descreve o papel das interações hidrofóbicas e iônicas na formação das micelas de caseína no modelo de estrutura aberta. Esse autor leva em consideração as estruturas individuais das caseínas e ressalta o importante papel da formação de “pontes” de fosfato de cálcio coloidal entre elas e não entre sub-micelas. De acordo com De Kruif e Holt (2003) cada “nanocluster” de fosfato de cálcio coloidal pode se ligar a cinco cadeias polipeptídicas e, considerando que as caseínas α_{s1} , α_{s2} e β apresentam duas ou mais sequências de resíduos fosfoserina, o fosfato de cálcio coloidal torna-se imprescindível à formação de uma estrutura micelar tridimensional.

Horne (2009) salienta que apesar das interações de origem hidrofóbicas serem relativamente fracas, elas estão presentes em elevado número nas micelas de caseína e contribuem para a sustentação da estrutura micelar. Haja vista a manutenção dessa estrutura após a acidificação do leite, a qual resulta em dissolução do fosfato de cálcio coloidal (Marchin et al., 2007).

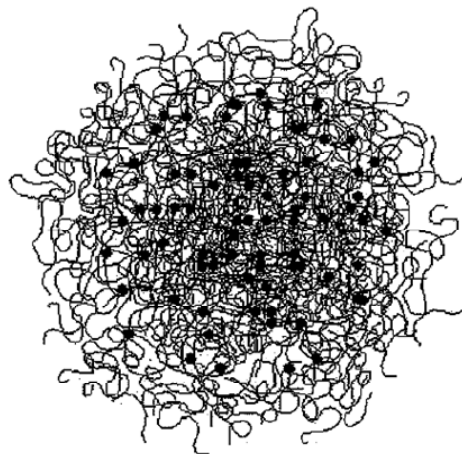


Figura 2. Modelo de micela de caseína em estrutura aberta (Holt, 2003).

O conhecimento sobre a estrutura das micelas de caseína é importante devido ao seu papel na indústria láctea, por exemplo, na fabricação de queijos, na estabilidade de leite UHT, leite condensado, leite reconstituídos e produtos congelados.

1.3 Proteínas Solúveis

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou em indústrias por três processos principais (Zinsly et al.,2001; Maubois et al.,2001): a) pelo processo de coagulação enzimática, resultando na coagulação das caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e no soro "doce"; b) precipitação ácida no pH isoelétrico (pI), das caseínas (pI = 4,6) resultando na caseína isoelétrica e no soro ácido; c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, em membranas de 0,1 μm , obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro.

O soro de leite, em geral, contém aproximadamente 20 % das proteínas originais do leite (tabela 4). As duas principais proteínas são a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina, que perfazem 70 % a 80 % das proteínas totais do soro (Sgarbieri,1996). As sub-frações ou peptídeos secundários, assim denominados por se apresentarem em pequenas concentrações no soro de leite, são compostas por: glicomacropéptidos, imunoglobulinas, albumina, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (Haraguchi et al., 2006).

Tabela 4. Composição do soro bovino.

Composição do Soro de leite	%	Proteínas do soro de leite	Propriedades
Sólidos totais	6,5	β -Lactoglobulina	Gelatinizante
Proteína	0,8	α -Lactalbumina	Formar espuma
		Imunoglobulina	Substituta do colostro
		Lipoproteínas (BSA*)	Emulsificante
		Lactoferrina	Bacteriostática
		Lactoperoxidase	Bacteriostática
Gordura	0,05		
Lactase	4,5		
Cinza	0,5		
Ácido Láctico	0,05		

Fonte: Adaptado de Antunes, 2003.

*BSA: Albumina do soro bovino

As proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto pelos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades. Apresentam elevadas proporções dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (Sgarbieri, 2004; Torres, 2005).

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente metabolizadas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais a tal ponto que alguns pesquisadores (Boirie et al., 1997; Dangin et al., 2001) classificaram essas proteínas como proteínas de metabolização rápida, *fast metabolizing proteins*, muito adequadas para situações de estresses metabólicos em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial.

As proteínas do soro de leite são conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais, sendo utilizadas na alimentação de atletas, na fabricação de bebidas lácteas, na produção de ricota e como coadjuvantes

tecnológicos e, ou ingredientes nas indústrias de produtos cárneos, panificação e confeitaria (Wit, 1998).

1.3.1 β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -Lg) é, quantitativamente, a principal proteína do soro de leite, apresentando massa molar média entre 18400 – 36800 Da. É a principal proteína do soro de leite em ruminantes, não sendo encontrada em abundância no leite de muitas outras espécies, como no leite humano. A β -lactoglobulina apresenta polimorfismo genético, sendo que as variantes A e B são mais comuns (Kinsella & Whitehead, 1989; Sgarbieri, 1996; Haraguchi, et al., 2006).

A β -lactoglobulina bovina apresenta na sua estrutura primária 162 aminoácidos, ponto isoelétrico de 5,2 e massa molar de aproximadamente 18.300 Da. Possui cinco resíduos de cisteína sendo que quatro estão envolvidos em duas ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína (106-119) e (66-160) que contribuem para a manutenção da sua estrutura terciária (Torres, 2005) (Figura 3).



Figura 3. Estrutura tridimensional de um monômero de β -lactoglobulina (Qin et al., 1998).

A alergenicidade atribuída às proteínas do leite está, essencialmente, associada à β -lactoglobulina, e afeta cerca de 1% - 2% de crianças com menos de dois anos, sendo algo compreensível já que se trata de uma proteína inexistente no leite humano (Torres, 2005).

A proteína existe como um dímero estável em solução, leite, devido à interação eletrostática entre Asp¹³⁰ e Glu¹³⁴ de um monômero com o resíduo de lisina de outro monômero, e em pH < 3 e pH > 8 os dímeros se dissociam em monômeros (Kinsella & Whitehead, 1989; Sgarbieri, 1996).

1.3.2 α -Lactoalbumina

Em termos quantitativos, a α -lactalbumina (α -La) é a segunda proteína do soro, de massa molar igual a 14000 Da (Walzem et al., 2002).

A α -lactalbumina (α -La) (Figura 4) é uma proteína globular compacta e se manifesta como monômero no pH natural do leite, pH 6,6. Possui um excelente perfil de aminoácidos essenciais, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina (Kinsella & Whitehead, 1989; Sgarbieri, 1996).

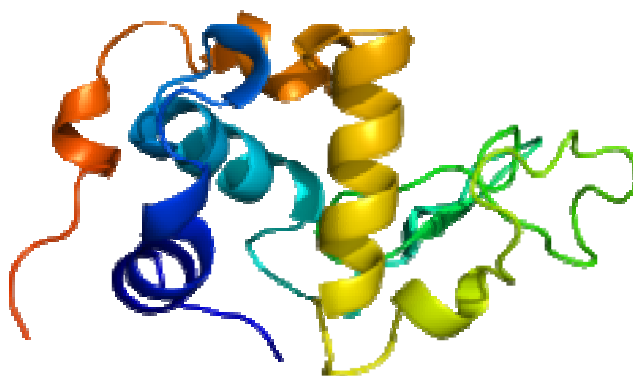


Figura 4. Estrutura tridimensional de uma molécula de α -lactalbumina (Qin et al., 1998).

A função biológica da α -La é modular a especificidade da galactosiltransferase no complexo lactose sintetase, que catalisa o último passo da biossíntese da lactose no tecido mamário (Kinsella & Whitehead, 1989; Sgarbieri, 1996; Walzem et al., 2002).

A α -La purificada é usada comercialmente em fórmulas infantis devido à similaridade estrutural e composicional em relação à principal proteína do leite materno. É também utilizada em alimentos protéicos para esportistas, pois constitui uma boa fonte de aminoácidos de cadeia ramificada, os quais estão envolvidos no fornecimento de energia e síntese protéica muscular (Walzem et al., 2002; Ha & Zemel, 2003).

1.4 Secagem

A secagem ou desidratação é uma operação muito útil na indústria de alimentos assim como em indústrias farmacêuticas, poliméricas e químicas (Schuck, 2002). Esta operação consiste na extração de parte da água de um produto, permitindo uma conservação mais longa e diminuindo os custos logísticos.

A tecnologia de secagem do leite é empregada industrialmente desde o início do século XX. O primeiro dispositivo confeccionado para a secagem do leite foi o dispositivo de secagem por cilindros, de Just et Hattmaker, patenteado em 1902 (Sloth et al., 1990). Após a segunda guerra mundial, as instalações de secagem por cilindros não eram mais suficientes para secar a totalidade dos excedentes lácteos e nem por satisfazer a demanda por qualidade do produto. Foi então desenvolvido a secagem por atomização para produtos lácteos, o que permitiu a obtenção de um produto de melhor qualidade em comparação à secagem por cilindros. A secagem por atomização é utilizada nas indústrias de laticínios desde 1930, mesmo que a primeira patente sobre este processo é datada de 1865 por Larmont, para a secagem de ovos (Masters, 1991).

A secagem dos líquidos por pulverização, frequentemente chamada de secagem por atomização ou “spray drying” em inglês, consiste em dispersar o produto a ser seco sobre forma de pequenas gotículas em uma corrente de ar quente de maneira a obter um pó. Quando um alimento é colocado em uma corrente de ar com baixa umidade relativa e elevada temperatura (150 a 300°C), é formada espontaneamente uma diferença de temperatura e pressão parcial de água entre o alimento e o ar, resultando uma transferência de energia na forma de calor do ar para o produto e uma transferência de água do produto para o ar (Figura 5, Bimbenet, 1978). O princípio de secagem por pulverização é de criar uma superfície de troca muito elevada entre o líquido pulverizado e o ar quente de secagem a fim de melhorar a transferência de matéria e de energia na forma de calor, o que permite limitar o tempo de estadia do produto a ser seco na torre de secagem. A temperatura da interface do produto é cerca de 45 °C (temperatura do bulbo úmido) e o tempo de estadia é cerca de 3 a 30 segundos, o que permite conservar a qualidade

nutricional e biológica do produto (Dittman et Cook, 1977). Este tipo de secagem é, portanto bem adaptada aos produtos termo sensíveis como os produtos alimentares.

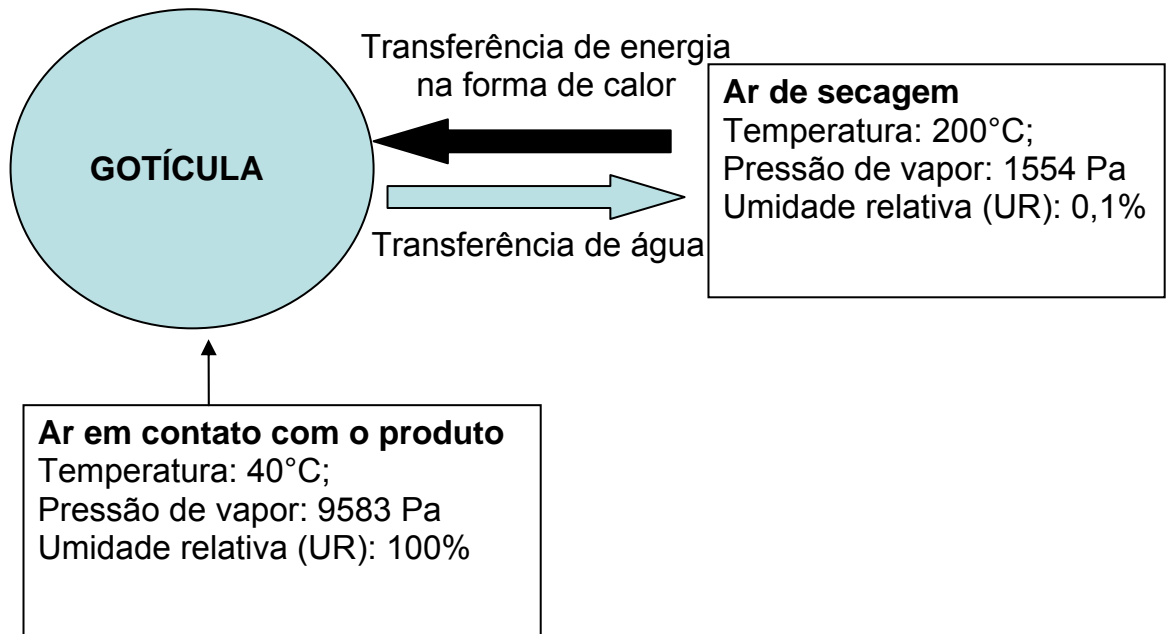


Figura 5. Princípio de secagem por atomização (Bimbenet, 1978).

A velocidade de secagem é ligada a três fatores: a superfície de evaporação, a diferença da pressão parcial de água entre a gotícula e o ar e a velocidade de migração de água na gotícula (Schuck, 1999). De acordo com a lei de Fourier, quanto maior a área de troca, mais rápida será a transferência de energia na forma de calor e, portanto maior será a velocidade de secagem. A pulverização pode aumentar significativamente a área de troca entre o produto e o ar quente: um litro de líquido pulverizado em gotículas de 100 μm de diâmetro tem uma área de 60 m^2 . Assim a área é 1200 vezes superior que a área de uma esfera de mesmo volume. Acontece o mesmo para a cinética de secagem. A transferência de água do produto para o ar é causada pela diferença da pressão parcial da água entre as gotículas e o ar seco. Quanto maior a diferença, mais a secagem será rápida. Uma desidratação do ar e, ou um aumento da temperatura permite uma diminuição de sua pressão parcial da água. A velocidade de migração da água do interior da gotícula para a superfície é também um fator que influencia a velocidade de secagem (Sougnez, 1983). Essa velocidade depende do coeficiente de difusão da água

que varia de acordo com a composição bioquímica, do teor de água e da temperatura da gotícula (Charlesworth & Marshall, 1960, Chandrasekaran & King, 1972, Okos et al., 1992).

A secagem por atomização evoluiu de um simples estágio até três estágios (Tabela 5). A torre de secagem 'simples estágio' (ou 'um tempo', Figura 6), tem um tempo de estadia na câmara de secagem muito curto, de 20 a 60 segundos em média, portanto não existe um equilíbrio real entre a umidade das partículas ou aglomerados do pó e do ar. A temperatura de saída do ar é, portanto mais elevada e o rendimento térmico é diminuído (Sougnez, 1983, Knipschildt, 1986, Masters, 1991).

A torre de secagem 'dois estágios' (ou 'dois tempos', Figura 7) é construída para obter um tempo de secagem mais longo, até vários minutos e portanto mais próximo do equilíbrio termodinâmico. Por este tipo de instalação, um leito fluidizado externo vibrante é necessário para obter a umidade residual requerida (Sougnez, 1983, Knipschildt, 1986, Masters, 1991).

A secagem 'três estágios' (ou 'três tempos' ou 'MSD' (*'Multi Stage drying'*), Figura 8) é o maior progresso realizado nesta área desde o início da secagem por atomização. Para reduzir os custos de secagem e melhorar as performances das instalações, tem-se que transferir a maior parte possível da secagem da fase 'atomização' para a fase 'fluidização'. O limite é o início da colagem entre o produto úmido e a parede da torre. Para evitar este inconveniente, um leito fluidizado no interior da unidade (leito fluidizado interno ou estático) é instalado para secar o produto úmido (Sougnez, 1983, Pisecky, 1985; Knipschildt, 1986; Masters, 1991). A temperatura do ar de entrada e saída variam de acordo com as diferentes torres de secagem. Para as unidades 'três tempos', aproxima-se o meio do equilíbrio termodinâmico. Devido a melhora do rendimento térmico, a temperatura de entrada deste tipo de torre pode ser mais elevada, sendo que, ao contrário, a temperatura de saída é mais baixa. Uma melhora da qualidade do produto ao nível da aglomeração, da solubilidade, da dispersibilidade e da molhabilidade, é igualmente observado sobre as torres de secagem de três efeitos (Sougnez, 1983; Pisecky, 1990; Refstrup, 1992).

Existem também outras instalações de secagens (Tallform, Filtermat, Secagem a bandas) destinadas aos produtos que tem propriedades

específicas, alto teor em matérias gordas, amidos, ovoprodutos, etc. (Knipschildt, 1986; Pisecky, 1990; Masters, 1991).

Tabela 5. Evolução de secagem por atomização (Sougnez, 1983).

	Unidade "simples estágio"	Unidade "dois estágios"	Unidade "três estágio"
Temperatura ar de entrada (°C)	190	220	320
Temperatura ar de saída (°C)	97	85	80
Umidade do pó no leito fluidizado interno (%)	-	-	6 à 15
Umidade do pó no leito fluidizado externo (%)	-	4 à 6	4 à 6
Umidade final do pó (%)	4	4	4
Consumo (kJ.kg ⁻¹ d'água)	4 912	4 076	3449
Consumo (kWh.kg ⁻¹ d'água)	1,36	1,13	0,96

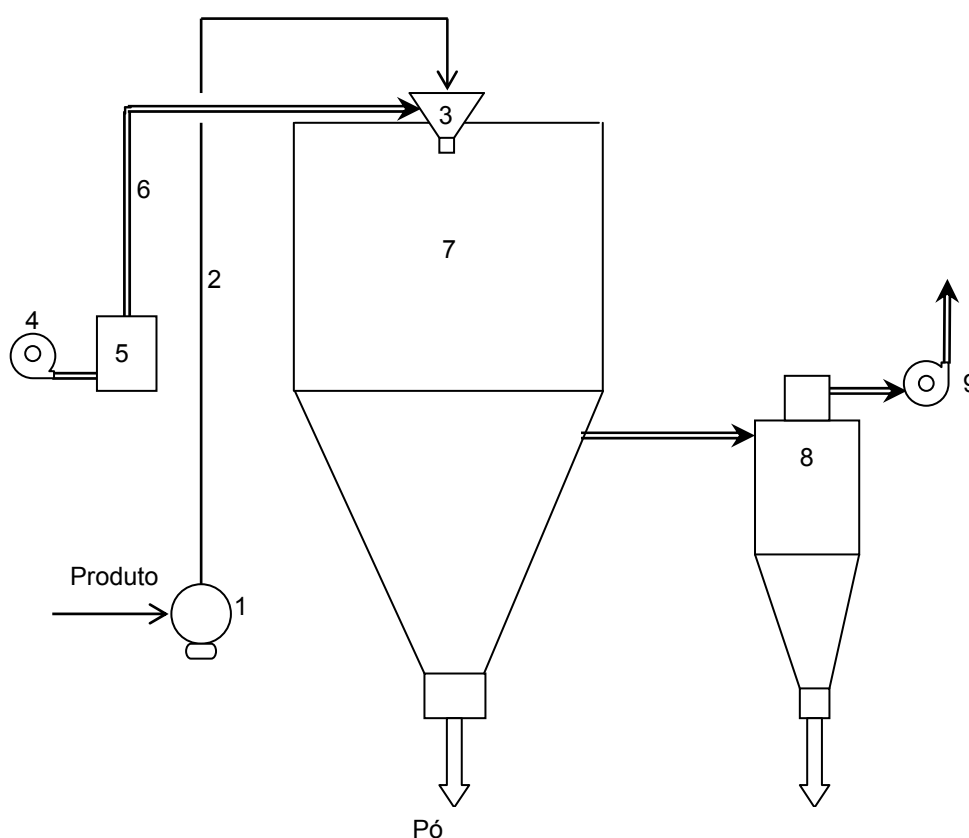


Figura 6. Esquema do princípio da torre de secagem 'simples estágio' (1: Bomba de alimentação, 2: Circuito de alimentação, 3: Atomizador, 4: Ventilador de ar de entrada, 5: Aquecedor de ar, 6: Canalizador de ar quente, 7: Câmara de secagem, 8: Ciclone, 9: Ventilador de ar de saída).

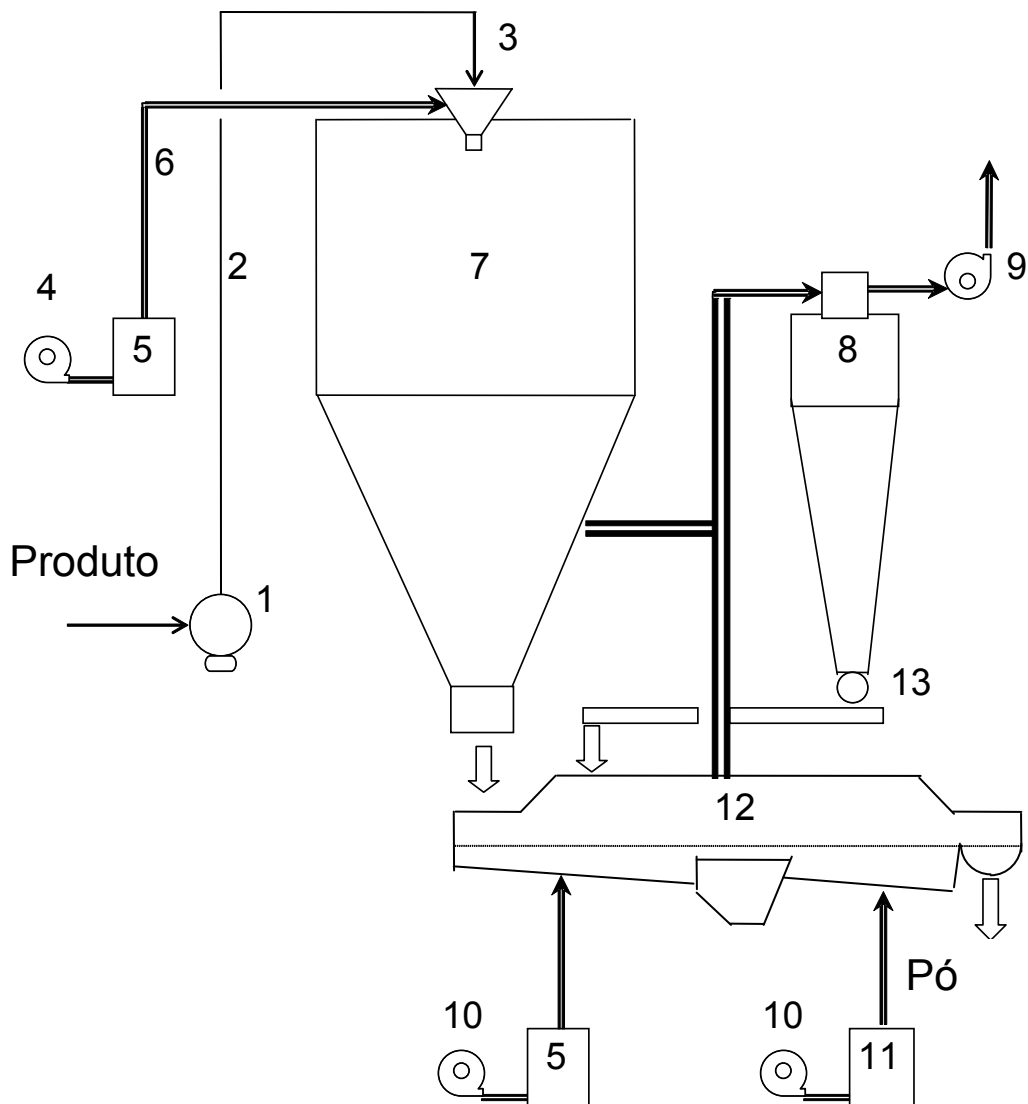


Figura 7. Esquema do princípio da torre de secagem ‘dois estágios’ (1: Bomba de alimentação, 2: Circuito de alimentação, 3: Atomizador, 4: Ventilador de ar de entrada, 5: Aquecedor de ar, 6: Canalizador de ar quente, 7: Câmara de secagem, 8: Ciclone, 9: Ventilador de ar de saída, 10: Ventilador de leito fluidizado externo, 11: Resfriamento de ar, 12: Leito fluidizado externo, 13: Válvula rotativa).

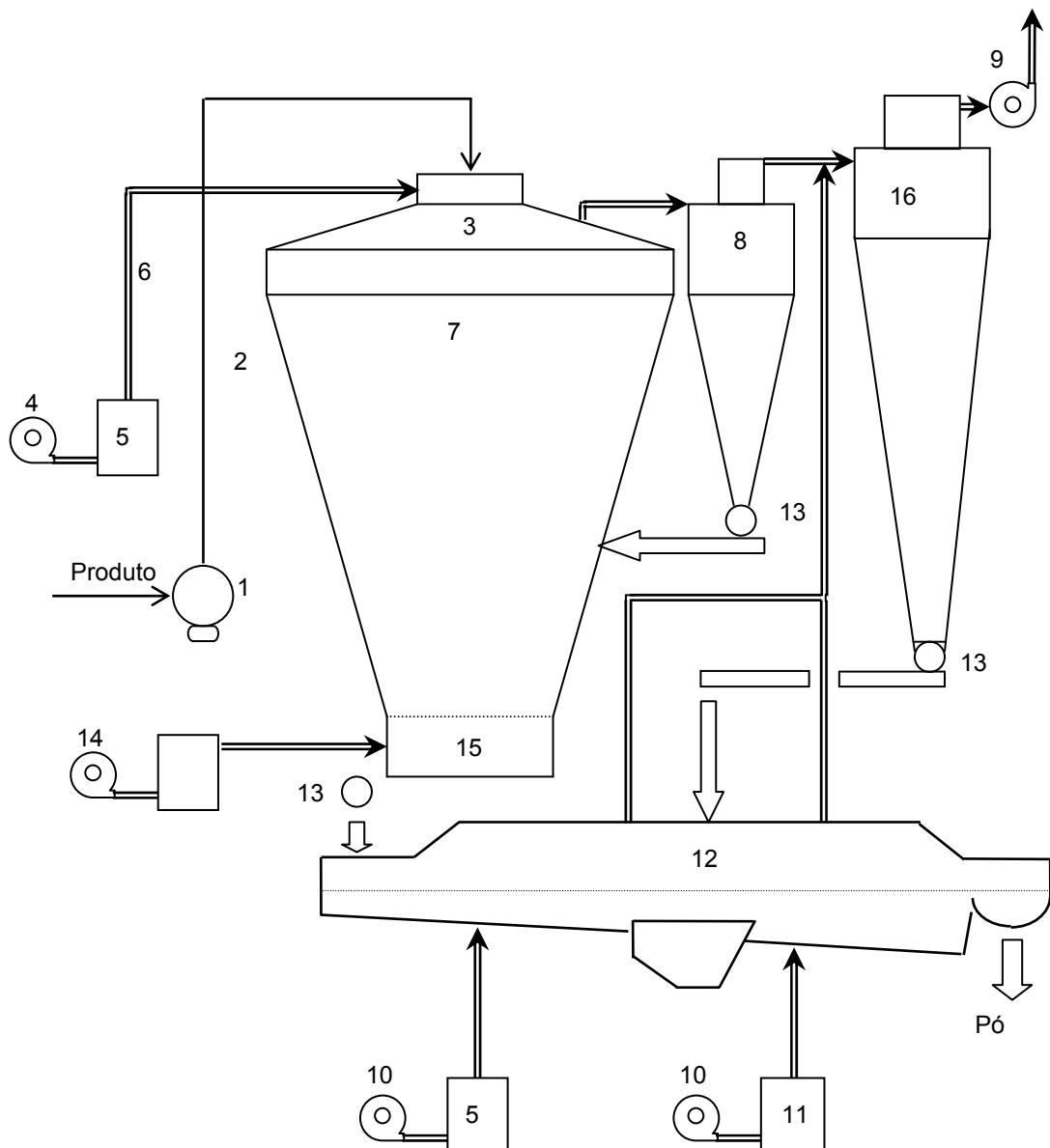


Figura 8. Esquema do princípio da torre de secagem ‘três estágios’ (1: Bomba de alimentação, 2: Circuito de alimentação, 3: Atomizador, 4: Ventilador de ar de entrada, 5: Aquecedor de ar, 6: Canalizador de ar quente, 7: Câmara de secagem, 8: Ciclone, 9: Ventilador de ar de saída, 10: Ventilador de leito fluidizado externo, 11: Resfriamento de ar, 12: Leito fluidizado externo, 13: Válvula rotativa, 14: Ventilador do ar do leito estático, 15: Leito fluidizado interno, 16: Ciclone secundário).

A pulverização tem como objetivo formar uma nuvem de pequenas gotículas a fim de aumentar a área de troca e facilitar a transferência de água entre o produto e o ar quente e influencia o rendimento energético, a velocidade de secagem e a granulometria do pó (Filkova & Mujumdar, 1987).

Existem três tipos de atomizadores: o disco centrífugo, o atomizador de pressão e o atomizador duplo fluido. Para a turbina centrífuga, o líquido é

dispersado pela força centrífuga. A velocidade de rotação se situa entre 10000 a 40000 rotações por minuto, e a quantidade de líquido injetado pode atingir 75 toneladas por hora em certas instalações (Kessler, 1981; Sougnez, 1983). O diâmetro das gotículas pode ser controlado variando a velocidade de rotação ou o diâmetro do disco. O disco centrífugo é largamente utilizada nas indústrias de alimentos graças a sua compatibilidade com os concentrados viscosos alimentados por uma bomba positiva (Filkova & Mujumdar, 1987).

O atomizador de pressão dispersa o líquido pela pressão do próprio. A pulverização é efetuada pela passagem do líquido sobre pressão entre 0,15 a 1,5 MPa, através de uma pastilha que se encontra em baixo de um ponto no bico. Para obter uma vazão elevada, vários bicos são frequentemente instalados em uma torre de secagem industrial. Neste caso, a quantidade do produto injetado pode variar de 1 a 1,5 toneladas por hora e por bico (Kessler, 1981; Hayashi, 1989; Westergaard, 1994).

O bico duplo fluido funciona com ar comprimido, este tipo de bico permite a pulverização de produtos que, devido às características físicas, não podem suportar uma pressão elevada.

1.5 Proteínas na interface

A identificação de alguns parâmetros físico-químicos de proteínas que determinam suas propriedades interfaciais, é ainda incompleta e representa um desafio, especialmente para as proteínas de origem alimentar. Proteínas são macromoléculas biológicas que estabilizam emulsões e espumas (Dickinson, 1998 b; Murray & Ettelaie, 2004). Esta capacidade deriva, em parte, da natureza anfífilica destas moléculas, que lhe permitem adsorver em interfaces hidrofóbicas e hidrofílicas, mas que também é relacionada com a sua propensão à se agregarem na interface, formando um filme viscoelástico. Outros parâmetros importantes, tais como a carga líquida, hidrofobicidade superficial e estabilidade intrínseca, também tem de ser levados em conta para explicar os mecanismos de formação e as propriedades das camadas interfaciais (Dickinson, 1998 b; Wierenga et. al., 2003; Perriman & White, 2006). O conhecimento destas reações é de suma importância na tecnologia de alimentos, particularmente quando ingredientes complexos tais como

proteínas da clara de ovo são utilizados para modular a textura de produtos alimentares (Desfougères et al., 2011) Proteínas e moléculas surfactantes de baixa massa molar são conhecidas por suas capacidades de formar camadas interfaciais. No entanto, os mecanismos pelos quais esses componentes estabilizam a interface têm sido descritos de maneiras diferentes (Bos & Vliet, 2001; Wilde et al., 2004). As moléculas surfactantes de baixa massa molar são capazes de se difundirem livremente na interface, criando um gradiente de pressão superficial através da interface. Esse efeito é conhecido como o efeito Gibbs-Marangoni. Para as proteínas alguns autores sugerem que a estabilização da superfície esta relacionada com a formação de uma rede contínua (Dickinson et al., 1988 a; Damodaran et al., 1997).

Esta rede resultaria em uma resistência à deformação da interface por uma força mecânica, o módulo de elasticidade. A existência de uma rede desse tipo tem sido muitas vezes estudada por análises reológicas de cisalhamento interfacial. A técnica foi discutida em 1979 por Izmailova (Izmailova, 1979) e por Bos e van Vliet (Bos & Vliet, 2001; Wilde et al., 2004). Vários autores argumentam que a camada de proteína adsorvida resulta de uma rede de partículas altamente interagidas (Bantchev & Schwartz, 2003; Murray, 2002; Clarck et al., 1990; Wijmans & Dickinson, 1998 b).

A rede interfacial semi-rígida que se desenvolve ao longo do tempo é única para cada proteína e condições da solução. O estudo de misturas complexas, geralmente não permitem o esclarecimento de quais modificações estruturais da cadeia peptídica contribui para a alteração das propriedades interfaciais. Além disso os tratamentos tecnológicos aplicados em um contexto industrial conduzem frequentemente a modificações nas estruturas proteicas que são difíceis de se elucidar. Embora muita atenção tenha sido dada na literatura para a caracterização reológica de camadas de proteínas adsorvidas, a relação entre reologia interfacial e a estrutura das proteínas permanece obscuro. Desfougères et al. mostraram que o tratamento térmico de soluções desidratadas de lisozima (*Dry-Heating*) leva à formação de moléculas com melhores propriedades de formação de espuma (densidade e estabilidade mais elevada de espuma) e que pequenas alterações estruturais podem fortemente afetar o comportamento interfacial ar/água de uma proteína modelo. Em condições experimentais, lisozima nativa adsorve na interface ar/água,

produzindo uma única camada de moléculas com propriedades mecânicas semelhantes as de outros sistemas de proteínas globulares. Em contraste, o aquecimento a seco de lisozima de clara de ovo, leva à formação de agregados de proteínas que têm a capacidade de se acumular na interface ar/água, formando multicamadas de polipeptídios sem alterações em suas conformações gerais. Além disso, o filme resultante apresenta comportamento do tipo-sólido e propriedades similares as de sólidos amorfos (Desfougères et. al., 2011). (Desfougères et. al., 2008).

A adsorção de proteínas em interfaces desempenha um papel importante em muitas matrizes biológicas, biomédicas e de utilização farmacêutica para aplicação na área de alimentos. No entanto, a termodinâmica e a cinética de adsorção de proteínas em interfaces líquidas é uma questão complexa, uma vez que o comportamento de filmes de proteínas adsorvidas difere de moléculas surfactantes de baixa massa molar: (i) as proteínas se desdobram nas interfaces devido a desnaturação interfacial, em especial a baixas pressões de superfície ou cobertura da superfície, (ii) a área interfacial ocupada por uma molécula de proteína adsorvida é grande comparada com a de uma pequena molécula de surfactante e não pode ser assumido como sendo constante, (iii) o número de configurações das moléculas de proteínas adsorvidas na interface é superior à da fase contínua da solução, e (iv) adsorção de proteínas e alterações posteriores dentro da camada adsorvida, ocorrem em escala de tempo com várias ordens de magnitude maior do que para a de pequenas moléculas surfactantes de baixa massa molar (Wilde, 2000).

Devido ao seu caráter globular anfifílico macromoléculas de proteínas, tais como proteínas do soro de leite, apresentam uma alta atividade superficial, e têm um efeito estabilizador sobre espumas e emulsões (Mahmoudi, et. al., 2010). As propriedades de formação de espuma de proteínas globulares são determinadas pela sua taxa de difusão e de adsorção na interface (Borcherding, et. al., 2008). No entanto, frações de proteínas de soro de leite diferem em seus comportamentos de adsorção à interface. O desdobramento da estrutura molecular, suas estruturas terciárias, durante a adsorção de um α -lactalbumina realiza-se mais rapidamente do que a β -lactoglobulina (Cornec, et. al., 1999).

Espuma é geralmente definida como uma dispersão coloidal de uma fase gasosa em uma fase líquida. O volume da fase dispersa (ar) é geralmente grande em comparação com o volume da fase contínua (água). A grande área interfacial e a diferença de densidade das duas fases, resulta em uma alta tensão interfacial e, portanto, em um sistema instável. A função das proteínas em espumas é estabilizar o sistema, reduzindo a tensão interfacial. A capacidade de formar espumas (*Foamability*) pode ser caracterizada através do tempo necessário para se obter um volume de espuma específico (Marinova et al., 2009). As características de formação de espuma em dispersões alimentares são importantes para se determinar atributos de qualidade de muitos alimentos (leite, carne, maionese, sorvetes, bolos, pães, dentre outros). A estrutura de muitos destes produtos dependem da formação e estabilidade de espumas, o que facilita a mistura e contribui para as qualidades sensoriais. Estas dispersões são termodinamicamente instáveis, e sua relativa estabilidade depende das propriedades dos componentes tensoactivos no sistema (Carrera & Patino, 2005; Patino & Niño, 2008).

Na indústria alimentar, as espumas são estabilizadas principalmente por proteínas (Rullier, Novales, & Axelos, 2008), sendo as proteínas do leite umas das mais utilizadas. Em particular a β -lactoglobulina (β -Lg), que representa cerca de 50% da massa total das proteínas do soro de leite, é amplamente utilizada devido à sua elevada capacidade de se adsorver na interface ar/água, diminuir a tensão superficial e formar redes interfaciais elásticas após o desdobramento nas interfaces (Kinsella, 1984; Murray, 1998; Phillips et. al., 1994). Esta proteína forma finas camadas interfaciais até próximo de seu ponto isoelétrico (pI 5,2) (Kinsella, 1984; Phillips et al., 1994) e, sob tratamento térmico, uma agregação muito forte a um pH próximo de seu pI pode ser produzido. Assim, a formação de agregados de proteínas através de ligações covalentes de pontes dissulfeto (Schmitt et. al., 2005) pode alterar as propriedades de formação de espuma destas proteínas. No entanto, a pH neutro foi demonstrado que um desdobramento parcial de β -Lg através de um tratamento térmico, melhora suas propriedades de formação e estabilidade de espumas (Bals & Kulozik, 2003; Davis & Foegeding, 2007; Kim et. al., 2005). Neste contexto, a busca de processos que podem melhorar a eficiência de

propriedades funcionais de proteínas e, por conseguinte, aumentar seu grau de aplicabilidade é de interesse crescente.

Quando a interface estabilizada pelas proteínas não é composta por uma única proteína, interações e fenômenos de separação de fase nas camadas interfaciais podem ocorrer (Dickinson, 1999). A determinação direta da cinética de adsorção foi estudada por técnicas como 'radio-labeling' e elipsometria (Benjamins et al., 1975; Graham & Phillips, 1979; Hunter et al., 1990; Russev et al., 2000; Xu & Damodaran, 1993).

Parece ter havido um ressurgimento do interesse no tema de reologia interfacial. Sem dúvida, há uma série de razões como: em primeiro lugar, tem havido crescente reconhecimento de que a reologia interfacial pode ter uma importante contribuição para vários processos biológicos, tais como a função de alvéolos pulmonares (Ueno, 2002), vários processos digestivos e de adsorção (Reis et al., 2008; Proctor et al., 2005), formação de fibras (Vezy et al., 2009) e função de membranas (Khattari et al., 2005); em segundo lugar, novas técnicas experimentais para reologia interfacial foram desenvolvidas; em terceiro lugar, parece haver um aumento do uso de técnicas de reologia interfacial para estudar as interações dentro dos filmes adsorvidos.

Vários grupos de pesquisas têm estudado as interações que contribuem para a estabilidade das proteínas (Fersht, 1999; Tanford, 1970). Recentemente uma revisão abrangente enumerou a importância de parâmetros reológicos para a compreensão de processos interfaciais (Miller et al., 2010). Propriedades reológicas dilatacionais e de cisalhamento, de camadas adsorvidas de β -caseínas em presença de surfactantes em forma neutra e carregada têm sido experimentalmente estudadas, e modelos teóricos para compreender a difusão para a interface nestes sistemas binários têm sido desenvolvidos (Kotsmar et al., 2009). Lakshmanan et al. e Muthuselvi et al. estudaram diferentes propriedades interfaciais de proteínas na presença de aditivos e observaram um comportamento viscoelástico anômalo nestes sistemas (Lakshmanan et al., 2008; Muthuselvi et al., 2008).

A adsorção de proteínas em interfaces resulta na formação de multicamadas viscoelásticas devido à flexibilidade e agregação de proteínas (Bos & Vilet, 2001). As propriedades destas multicamadas podem ser caracterizada pela reologia interfacial, onde a influência do estresse mecânico

sobre a interface é analisado. De acordo com a literatura, reologia dilatacional e de cisalhamento são as mais comumente aplicadas (Kraegel et al., 2008; Rodriguez Patino et al., 2008). Reologia dilatacional refere-se a medidas tomadas durante mudanças na área interfacial, enquanto reologia de cisalhamento refere-se a mudanças na forma da interface sem alterar a área (Bos & Vilet, 2001; Ravera et al., 2005).

Todos os métodos de reologia interfacial são baseados em uma perturbação mecânica do equilíbrio da interface e na posterior avaliação da resposta do sistema. Na Figura 9, podemos observar que após a compressão, as proteínas globulares (proteínas do soro) respondem como esferas rígidas e são resistentes à compressão e produzem altos módulos de armazenamento. Proteínas flexíveis, tais como a β -caseína, comportam-se como esferas moles, favorecendo a compressão e a produção de baixos módulos de armazenamento. Devemos distinguir a reologia de dilatação interfacial da reologia de cisalhamento interfacial. A reologia de dilatação interfacial concerne em induzir uma alteração na área de uma solução calculando-se simultaneamente sua tensão interfacial. O método da reologia de cisalhamento induz um cisalhamento no filme, sem alterar a área e muitos arranjos diferentes existem para este método.

Para a reologia de cisalhamento interfacial, a dificuldade experimental reside em separar as contribuições viscoelásticas da fase contínua e da medida interfacial. A importância deste problema aumenta com o aumento da viscosidade do bulk, mas para a maioria das proteínas que adsorvem na interface entre o ar / água ou até mesmo água / óleo, a baixa viscosidade, o módulo de elasticidade interfacial é grande o suficiente para negligenciar este problema (Murray, 2011).

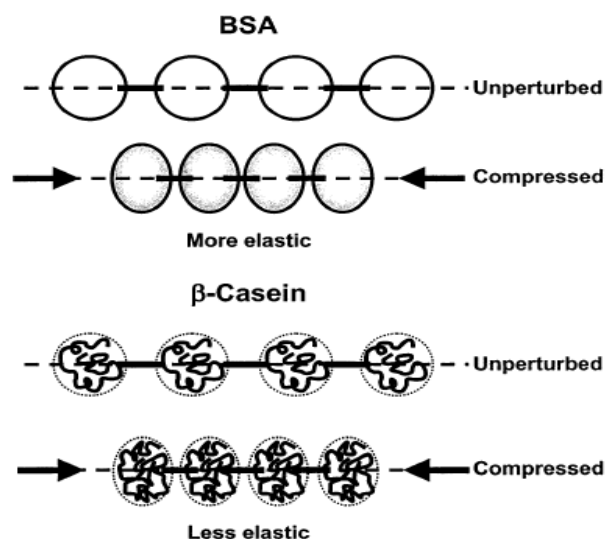


Figura 9. Esquema das camadas de proteína adsorvida na interface, submetidos à compressão da área interfacial, como em uma experiência de reologia de dilatação. Moléculas de proteínas adsorvidas, representados como esferas, são conectados por interações intermoleculares, representado pelas linhas escuras (Pereira et. al., 2003).

A reologia de cisalhamento interfacial é uma ferramenta importante para estudar a estrutura da interface líquido / ar. Ela pode igualmente fornecer informações preciosas sobre a formação da estrutura de camadas adsorvidas na interface. Este fato conduz a elaboração de inúmeras técnicas de medidas das propriedades reológicas de interfaces (Kragel et al., 1994; Warburton, 1996; Miller et al., 1997; Bos and van Vliet, 2001; Jones and Middelberg, 2002; Murray, 2002). Frequentemente, quando discos, anéis, bicones ou geometrias similares são utilizadas como reômetros interfaciais, o fluxo interfacial é considerado ser totalmente separado do fluxo da fase continua, e a dissipação do stresse interfacial na fase continua é negligenciado.

Na superfície de um meio denso (líquido ou sólido) ou na interface entre dois meios densos, a matéria não esta estritamente no mesmo estado. A este novo estado local, corresponde uma energia um pouco maior. Na superfície (ou interface) é associado uma certa energia por unidade de área (expressa em joules por metro quadrado – $J \cdot m^{-2}$), cuja origem é a força de coesão entre moléculas idênticas. Outra forma de expressar a mesma coisa é dizer que existe nas proximidades da superfície ou interface, uma tensão ao estresse, uma força por unidade de comprimento, expressa em $N \cdot m^{-1}$. Falamos, então, de energia ou tensão. Para a interface entre um meio denso e um gás, dizemos

tensão superficial (Dickinson, 1996). Medidas de tensão superficial, é um instrumento analítico importante para se determinar propriedades de moléculas surfactantes na formação e estabilização de espumas e emulsões (Marinova et al., 2009). Uma rápida queda da tensão superficial indica uma adsorção rápida dos agentes tensoativos na superfície e, portanto, uma rápida estabilização da fase dispersa contra a coalescência (Tamma et. al., 2012).

A adsorção de proteínas é um processo complexo e, portanto é difícil de sabermos quais são as características das proteínas, tais como a hidrofobicidade, a carga, a estabilidade no estado nativo, a estrutura secundária e o peso molecular, que influenciam na tendência das proteínas a se adsorverem na interface ar/água. A compreensão das interações entre camadas insolúveis de fosfolipídios e de proteínas tem uma importância particular em várias aplicações biotecnológicas (Roberts, et. al. 2005)

2. Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA, Rennes, França) na Unidade Mista de Pesquisa – Ciência e Tecnologia do Leite e do Ovo (UMR – STLO). Todos os métodos analíticos, onde os resultados são expressos em função da temperatura, foram realizados a temperatura de 40°C, sendo esse o valor da temperatura de entrada da dispersão concentrada na torre de secagem, antes do processo de atomização (figura 5).

2.1 Materiais

As misturas protéicas estudadas são:

– Caseína micelar em pó (PPCN) (ProMilk 872B) produzido por Ingredia (Arras, França), obtido a partir da tecnologia de membranas por microfiltração tangencial (0,1 µm) de leite desnatado, seguido de uma diafiltração com água, e secagem por spray dryer.

– Isolado protéico de soro (PS) (Prolacta) produzido por Lactalis (Retiers, França), obtido por ultrafiltração membrana tangencial (10 kDa) e diafiltração do microfiltrado estéril, coletado durante a produção do PPCN. A dispersão resultante a uma concentração de cerca de 20% a 25% de proteínas solúveis, segue para um processo de secagem em spray dryer, sofrendo um tratamento térmico de cerca de 45°C por 60 segundos. Como o binômio tempo/temperatura para a obtenção do isolado protéico de soro é baixo, o tratamento térmico ocorre apenas na torre de secagem, a desnaturação protéica é baixa. Solução de fosfolipídios (TM Solec MB-45), contendo 42 % (m/m) de fosfolipídios, 25 % (m/m) de gordura e 33 % (m/m) de oleína.

2.2 Preparação das dispersões protéicas

Os isolados protéicos, PPCN e PS, foram reidratados durante 24 horas a um conteúdo de 15 % (m/m) de proteínas e ficaram sob agitação durante cerca de 12 horas a temperatura de 20 °C, para obter uma hidratação total da micela

de caseína das dispersões preparadas a partir de PPCN. Esta concentração de proteínas é próxima a concentração de micelas de caseínas presentes em um leite desnatado concentrado a 50% (m/m) de sólidos totais. Azida de sódio foi adicionada em uma concentração de $0,02 \text{ g.L}^{-1}$, para impedir a multiplicação microbiana. Para verificar se houve uma total reidratação das dispersões de PPCN foi realizada uma análise granulométrica no dia dos experimentos (figura 10).

As diferentes dispersões, em concentrações diferentes de proteínas, foram preparadas pela combinação das soluções de fosfolipídios (PL) e das dispersões à 15 % (m/m) de PS e PPCN. As soluções utilizadas neste trabalho foram:

- Dispersões de PPCN e PS a 15 %, 10 % e 5 % (m/m), de proteínas.

Para verificar as propriedades interfaciais e bioquímicas de uma dispersões de proteína pura.

- Para estudar a interação entre os dois tipos de proteínas e suas influências nas propriedades bioquímicas / interfaciais, preparou-se dispersões de PPCN/PS a uma proporção de 50 % (m/m) de PPCN e 50 % (m/m) de PS (PPCN/PS 50-50) em concentrações de 15 %, 10 % e 5 % (m/m) de proteínas.

- Preparou-se, também, dispersões de PPCN/PS na proporção de 80 % (m/m) de PPCN e 20 % (m/m) de PS, em concentrações de 15 %, 10 % e 5 % (m/m) de proteínas (PPCN/PS 80-20). Esta relação foi escolhida porque é a mesma presente no leite.

Finalmente cada dispersões foi acrescentada de três diferentes concentrações de PL[0 % 0,5 % e 1 % (m/m)]. Portanto, estudou-se 36 diferentes dispersões.

2.3 Análises Físico-químicas

2.3.1 Determinação de Densidade

A determinação da densidade das dispersões foi necessária para os cálculos nos métodos de tensão interfacial, reologia de cisalhamento e de elasticidade interfacial, pois esses métodos analíticos variam em função deste parâmetro. O densímetro Mettler-Toledo DE40 (Mettler-Toledo, Columbus, OH) foi utilizado para determinação da densidade das dispersões a 40 °C. A

precisão do instrumento é de $1 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e cada dispersão foi medida em duplicata.

2.3.2 Nitrogênio

A concentração de nitrogênio total (NT; nitrogênio total x 6,38) foi medida pelo método de Kjeldahl utilizando o equipamento Tecator (Humeau, Nantes, França), Nitrogênio não caseínico (NCN), foi determinado a partir do teor de nitrogênio total do sobrenadante obtido após precipitação isoelétrica da caseína pelo método de Aschaffenburg & Drewry (1959), nitrogênio não protéico (NPN) por determinação do nitrogênio total do sobrenadante, obtido após precipitação de todas as proteínas na presença de ácido tricloroacético com concentração de 12% m/v (Rowland, 1938). A diferença entre NT e NCN foi utilizada para determinar o teor de caseína, a diferença entre NCN e NPN foi utilizada para determinar o teor de proteína solúvel.

2.3.3 Matéria seca

A matéria seca (MS) foi determinada por secagem em estufa (102-105 °C) por 5h.

2.3.4 Cinzas

A matéria mineral ou cinzas (MM) foi determinada após a incineração da MS em estufa a 550 °C até a obtenção de uma cinza branca pelo método da AOAC 942.05 (1945).

2.3.5 Determinação do tamanho das partículas

A determinação da distribuição de tamanho dos agregados proteicos foi realizada usando um equipamento DLS-3000HS Zetasizer (Malvern, UK). A técnica para determinar o tamanho das partículas, consiste em medir o efeito Doppler produzido durante a iluminação das partículas coloidais por um laser He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) (Marchin et al., 2007). O movimento Browniano das partículas é então calculado a partir do efeito Doppler e permite-nos deduzir um

coeficiente de difusão. Este coeficiente, por sua vez permite determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas. Os parâmetros utilizados para estas medidas de tamanho são os recomendadas por Regnault et al, 2004 e recalculado para uma temperatura de 25 °C. Os parâmetros são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros utilizados para as medidas da distribuição de tamanho à 25°C.

Materiais	Viscosidade (m.Pa.s ⁻¹)	Índice de refração
Micela de caseína		1,570
Água	0,89	1,333

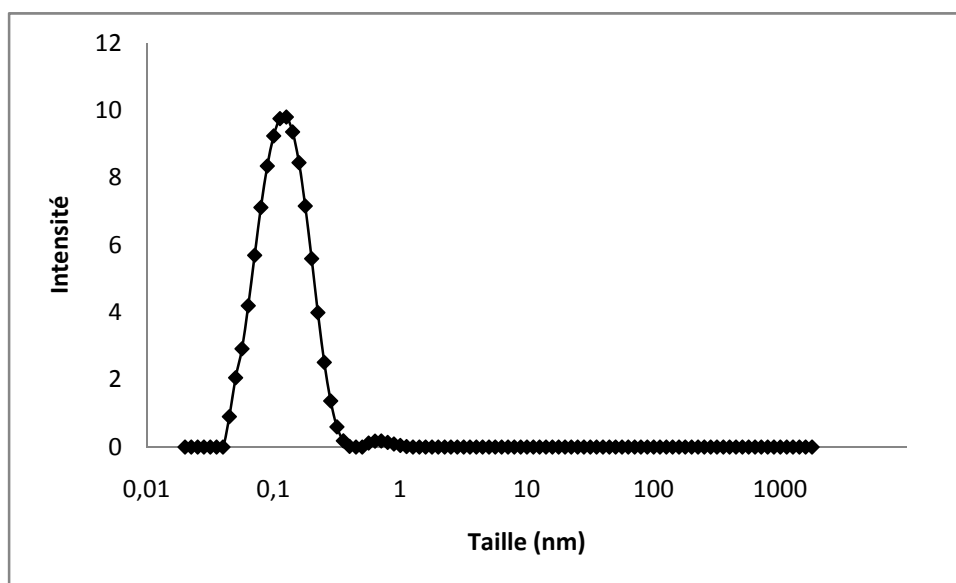


Figura 10. Distribuição de tamanho (intensidade em %) em função do diâmetro hidrodinâmico (nm) das soluções de PPCN a concentração de 15% (m/m) de proteínas.

2.4 Comportamento reológico

Reogramas foram obtidas a 40 °C à partir de um reômetro Physica MCR 301 (Anton PAR), usando sensores de cilindros coaxiais de alumínio (raio interno: 23,05 mm, raio externo: 25 mm; Altura do rotor: 30 mm; gap: 5 mm). As amostras foram equilibradas por 10 minutos a 40 °C e, em seguida, cisalhadas

durante 8 minutos com um aumento da taxa de cisalhamento, de $0,1$ à 500 s^{-1} , após com uma diminuição da taxa de cisalhamento de 500 à $0,1 \text{ s}^{-1}$, durante 4 minutos.

2.5 Análises interfaciais

2.5.1 Tensão superficial

Para a análise de tensão superficial, o método utilizado foi o de gotas pendente. Este método é baseado na forma das gotas em equilíbrio com os efeitos gravitacionais, que dependem do volume da gota. Quando os efeitos da tensão superficial e efeitos gravitacionais estão em equilíbrio, pode-se determinar a tensão superficial de um líquido em função da forma da gota obtida. Este método é comumente utilizado, e requer uma pequena quantidade de líquido (cerca de 4 mL de dispersão). Ele fornece uma medida rápida e relativamente precisa da tensão superficial. O procedimento consiste em formar, usando uma agulha, uma gota em equilíbrio. A medida da tensão superficial da dispersão, foi feita usando um dispositivo Tracker TECLA®, consistindo de uma seringa micrométrica com um volume de 2 mL, um tubo e uma agulha de aço inoxidável (Figura 11). As imagens das gotas são adquiridas por uma câmera CCD (*charge coupled device*) capaz de fornecer 25 imagens por segundo em formato de 640×512 pixels. Em seguida, é transmitida a um computador com uma placa gráfica e software para processamento de imagens. As medidas foram realizadas em condições livres de correntes de ar ou qualquer movimento do dispositivo. Primeiro foi verificado a tensão superficial da água destilada, que deve ser igual a 73 mN.m^{-1} , o mesmo que da água pura. Sucessivamente, foram realizadas medidas em dispersões de proteína a uma temperatura constante de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Em dispersões de proteína (na ausência e presença de PL) medidas da tensão superficial foram feitas com uma cinética de 600 segundos. Todas as medidas foram realizadas duas vezes para verificar a repetibilidade.

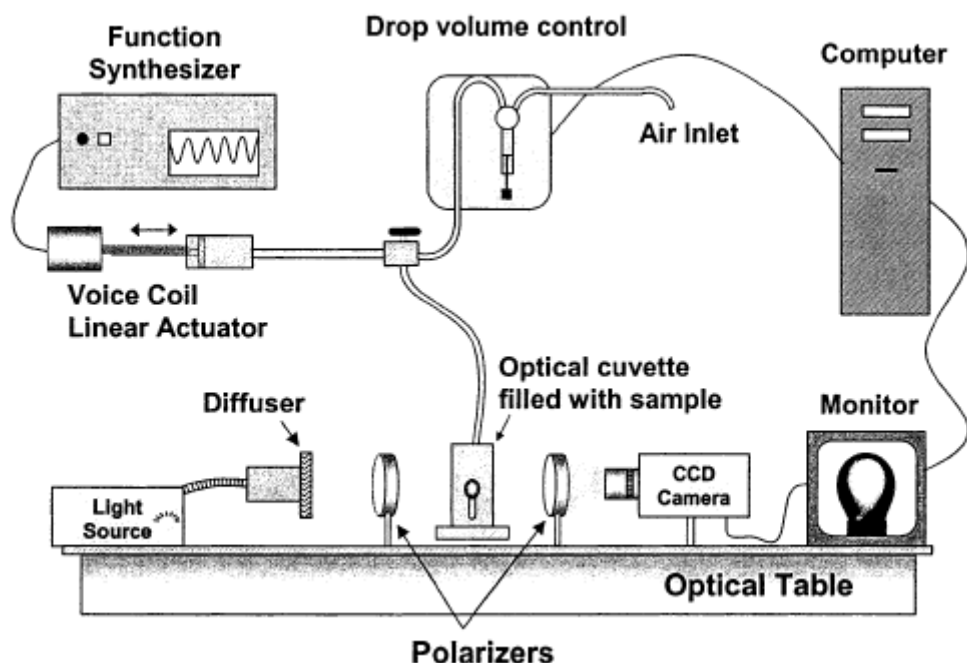


Figura 11. Esquema de um goniômetro à gota pendente e de um reômetro de dilatação de interfaces (Pereira et. al., 2003).

2.5.2 Reologia de cisalhamento interfacial

Todos os experimentos foram conduzidos em deformação e stress controlados usando um reômetro Physica MCR 301 (ANTON PAR). Detalhes completos sobre a configuração instrumental do reômetro de sensor de cone duplo e a análise do campo de fluxo podem ser encontradas no artigo de Erni et al 2002. Usou-se uma geometria no formato de cone duplo ($R_2 = 34,14$ mm de raio, ângulo do cone $\alpha = 5^\circ$, $R_1 =$ raio de 40,00 milímetros). O disco foi posicionado com a sua borda situada sobre a superfície da fase aquosa (Figura 11). A posição da medida na interface pode ser detectada através de um sensor de força normal e o sistema pode ser alinhado afim de garantir condições de medidas reproduzíveis (Figura 13). Todos os testes foram realizados na região viscoelástica linear a 40 C, frequência de oscilação variando de 0,05 à 5 Hz e stress de 1 %. Os resultados foram expressos em módulo de elasticidade interfacial (G'_i) e módulo de perda interfacial (G''_i), em função da frequência (Hz). As dispersões foram colocadas no recipiente e permaneceram por uma hora antes de se efetuar as medidas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

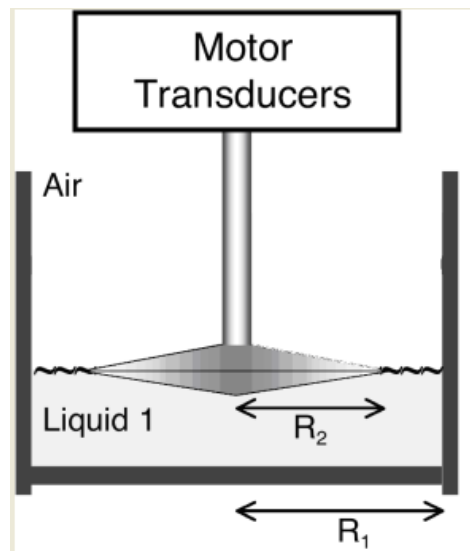


Figura 12. Reometro de sensor de cone duplo (Erni et.al., 2002).

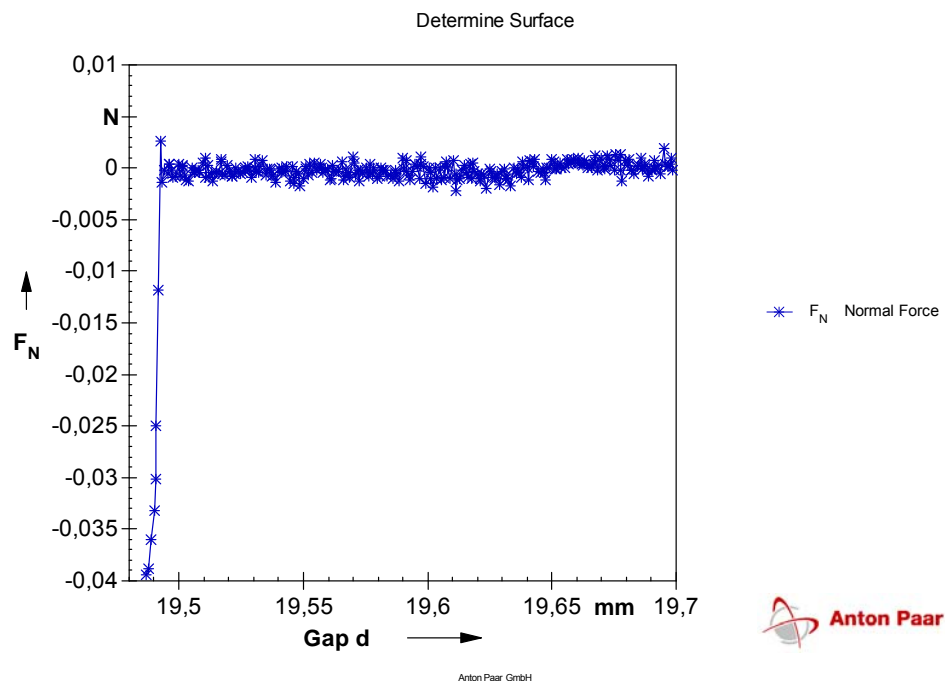


Figura 13. Detecção da posição do disco na interface ar/água pelo captor de força normal.

2.5.3 Reologia de dilatação interfacial

Para as medidas de dilatação interfacial, o método utilizado envolve aplicações de compressão e expansão sinusoidal na interface. Realizadas através do aumento e da redução do volume da gota a uma amplitude desejada ($\Delta A/A$) e a uma determinada frequência (Hz). O módulo de dilatação interfacial (E) proveniente da variação da tensão interfacial (σ), resultante de

uma pequena mudança da interface, pode ser descrita pela equação (1) (Lucassen et al,1972..):

$$E = \frac{d\sigma}{\frac{dA}{A}} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde A é a área da interface ar/água e σ é a tensão superficial da água.

O modulo de dilatação superficial (E , mN.m^{-1}) é uma medida da resistência do material a uma deformação dilatacional total (viscosa + elástica).

As medidas de dilatação superficial para os filmes adsorvidos na interface ar/água foram realizados com um goniômetro automático de gota pendente (Rastreador TECLA ®), Figura 9, conforme descrito por (Patino et al., 1999). Os experimentos foram realizados a temperatura de 40° C. Os parâmetros de reologia interfacial (E) foram medidos em função do tempo de adsorção e da tensão superficial, a 10% de amplitude de deformação ($\Delta A / A$) e 0,1 Hz de frequência. As medidas foram realizadas pelo menos duas vezes.

2.6 Análises estatísticas

Esse estudo foi dividido em três experimentos. Todos seguiram o delineamento inteiramente casualizado com três repetições e nove tratamentos. Em cada experimento, existem dois fatores diferentes: os tipos de proteínas e a adição de fosfolipídeos nas dispersões. Os níveis do fator proteína as diferentes concentrações destas e os níveis do fator fosfolipídeos são os seus diferentes teores nas dispersões, combinado com os níveis do fator proteína. Os dados foram analisados por meio de análise de variância, e as análises de médias por meio de teste de Tuckey.

3. Resultados

3.1 Caracterização físico-química dos sistemas protéicos

Os isolados protéicos de PPCN e PS foram inicialmente caracterizados em função de suas composições bioquímicas. Essa caracterização se deve ao fato de que as condições e o tempo de armazenamento desses produtos podem influenciar em suas composições físico-químicas, sendo assim as tabelas 8 e 9 apresentam a composição físico-química dos isolados protéicos estudados.. Esses produtos apresentaram um alto teor protéico. Como previsto, as cinzas foram sistematicamente mais elavadas para o isolado protéico de PPCN (tabela 8), pois a caséina é rica em minerais, principalmente cálcio e fósforo, provenientes da fração coloidal. O isolado protéico de PS, apresentou um baixo teor em caséinas (tabela 9), as quais são em grande parte extraídas no processo de microfiltração, 0,1 μm , etapa que antecede a concentração das PS pelo processo de ultrafiltração. Para a solução de PL, foi-se utilizado os valores fornecidos pelo fabricante (tabela 7). A composição das dispersões preparadas apartir dos isolados protéicos, foi calculada por balanço de massa, pois ocorreu um porcesso de diluição desses produtos desidratados. A comparação das características físicas das dispersões preparadas, à mesma concentração de proteínas, mostra que suas composições em extrato seco total e densidade foram similares (Tabelas 10 e 11). Para as dispersões em presença de PL os valores de sólidos totais (ST) (tabela 10) foram sempre superiores em relação às soluções de mesma concentração protéica em ausência de PL, onde a adição deste contribuiu para o aumento dos ST (tabela 7).

Tabela 7. Composição bioquímica do fosfolípídeo utilizado. Dados fornecidos pelo fornecedor.

Atributos	$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ dispersão
Sólidos Totais	100
MG vegetal	25
Oleína	33
Fosfolípidios	41-42

Tabela 8. Composição bioquímica do PPCN utilizado (média de três determinações \pm desvio padrão).

Atributos	$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pó
Sólidos Totais	$93,1 \pm 0,2$
Caseínas	$79,2 \pm 0,3$
Proteínas Solúveis	$4,8 \pm 0,5$
Nitrogênio não Protéico	$0,4 \pm 0,2$
Cinzas	$7,0 \pm 0,1$
Lipídeos	$1,0 \pm 0,3$

Tabela 9. Composição bioquímica do PS utilizado (média de três determinações \pm desvio padrão).

Atributos	$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pó
Sólidos Totais	$94,4 \pm 0,1$
Caseínas	$0,9 \pm 0,3$
Proteínas Solúveis	$79,6 \pm 0,2$
Nitrogênio não Protéico	$1,3 \pm 0,2$
Cinzas	$1,2 \pm 0,1$
Lipídeos	$< 0,05$

Tabela 10. Composição protéica e sólidos totais das dispersões preparadas.

	ST (g·100g ⁻¹)	Caséínas (g·100g ⁻¹)	PS (g·100g ⁻¹)	NPN (g·100g ⁻¹)
PPCN 5%	5,37	5,0	0,3	0,03
PPCN 5% 0,5PL	5,87	5,0	0,3	0,03
PPCN 5% 1PL	6,87	5,0	0,3	0,03
PPCN 10%	11,72	10,0	0,61	0,06
PPCN 10% 0,5PL	12,22	10,0	0,61	0,06
PPCN 10% 1PL	12,72	10,0	0,61	0,06
PPCN 15%	17,62	15,0	0,91	0,09
PPCN 15% 0,5PL	18,12	15,0	0,91	0,09
PPCN 15% 1PL	18,62	15,0	0,91	0,09
PS 5%	5,92	0,62	5,0	0,08
PS 5% 0,5PL	6,42	0,62	5,0	0,08
PS 5% 1PL	5,92	0,62	5,0	0,08
PS 10%	11,85	1,24	10,0	0,16
PS 10% 0,5PL	12,35	1,24	10,0	0,16
PS 10% 1PL	12,85	1,24	10,0	0,16
PS 15%	17,78	1,87	15,0	0,24
PS 15% 0,5PL	18,28	1,87	15,0	0,24
PS 15% 1PL	18,78	1,87	15,0	0,24
PPCN/PS (50-50)	5,87	2,5	2,5	0,05
PPCN/PS (50-50)	5,37	2,5	2,5	0,05
PPCN/PS (50-50)	6,87	2,5	2,5	0,05
PPCN/PS (50-50)	11,79	5,0	5,0	0,11
PPCN/PS (50-50)	12,29	5,0	5,0	0,11
PPCN/PS (50-50)	12,79	5,0	5,0	0,11
PPCN/PS (50-50)	17,71	7,5	7,5	0,16
PPCN/PS (50-50)	18,21	7,5	7,5	0,16
PPCN/PS (50-50)	18,71	7,5	7,5	0,16
PPCN/PS (80-20)	5,88	4,0	1,0	0,04
PPCN/PS (80-20)	5,38	4,0	1,0	0,04
PPCN/PS (80-20)	5,88	4,0	1,0	0,04
PPCN/PS (80-20)	11,77	8,0	2,0	0,08
PPCN/PS (80-20)	12,27	8,0	2,0	0,08
PPCN/PS (80-20)	12,77	8,0	2,0	0,08
PPCN/PS (80-20)	17,66	12,0	3,0	0,12
PPCN/PS (80-20)	18,16	12,0	3,0	0,12
PPCN/PS (80-20)	18,66	12,0	3,0	0,12

Tabela 11. Composição bioquímica das dispersões preparadas.

	Lípidios (g.100g ⁻¹)	Cinzas (g.100g ⁻¹)	Densidade (cm.g ⁻³)
PPCN 5%	0,06	0,44	1,0105
PPCN 5% 0,5PL	0,06	0,44	1,0108
PPCN 5% 1PL	0,06	0,44	1,0103
PPCN 10%	0,13	0,9	1,0286
PPCN 10% 0,5PL	0,13	0,9	1,028
PPCN 10% 1PL	0,13	0,9	1,0276
PPCN 15%	0,19	1,33	1,476
PPCN 15% 0,5PL	0,19	1,33	1,0441
PPCN 15% 1PL	0,19	1,33	1,0397
PS 5%	x	0,07	1,0095
PS 5% 0,5PL	x	0,07	1,0087
PS 5% 1PL	x	0,07	1,0086
PS 10%	x	0,15	1,0253
PS 10% 0,5PL	x	0,15	1,0257
PS 10% 1PL	x	0,15	1,0253
PS 15%	x	0,22	1,0432
PS 15% 0,5PL	x	0,22	1,0391
PS 15% 1PL	x	0,22	1,0366
PPCN/PS (50-50)	0,03	0,25	1,099
PPCN/PS (50-50)	0,03	0,25	1,0094
PPCN/PS (50-50)	0,03	0,25	1,0091
PPCN/PS (50-50)	0,06	0,51	1,0274
PPCN/PS (50-50)	0,06	0,51	1,0265
PPCN/PS (50-50)	0,06	0,51	1,0269
PPCN/PS (50-50)	0,09	0,78	1,0455
PPCN/PS (50-50)	0,09	0,78	1,0424
PPCN/PS (50-50)	0,09	0,78	1,0399
PPCN/PS (80-20)	0,05	0,36	1,0104
PPCN/PS (80-20)	0,05	0,36	1,0104
PPCN/PS (80-20)	0,05	0,36	1,0097
PPCN/PS (80-20)	0,10	0,74	1,0283
PPCN/PS (80-20)	0,10	0,74	1,0287
PPCN/PS (80-20)	0,10	0,74	1,0278
PPCN/PS (80-20)	0,15	1,10	1,0467
PPCN/PS (80-20)	0,15	1,10	1,0438
PPCN/PS (80-20)	0,15	1,10	1,0415

3.2 Comportamento reológico

As figuras 14 a 17 mostram os gráficos dos comportamentos reológicos das dispersões protéicas em presença e ausência de PL. Dois comportamentos reológicos diferentes foram observados neste estudo. Para as dispersões em concentração de 15 % (m/m) de PPCN, em presença e ausência em PL (figura 17), observou-se um comportamento pseudoplástico; ou seja, a viscosidade diminui em relação ao aumento da taxa de deformação. Para todas as outras dispersões, observou-se um comportamento Newtoniano: a viscosidade manteve-se constante em qualquer fosse à taxa de deformação (figuras 14 à 16).

Para as dispersões a alta concentração de PPCN (15%) (Figura 17), um comportamento pseudoplástico pode ser devido a uma diminuição da densidade de enovelamento e de um aumento da orientação em três dimensões das estruturas macromoleculares em altas taxas de deformação (Varesano & Tonin, 2008). A maior parte das dispersões de PPCN tiveram um comportamento newtoniano, a viscosidade não se modificou com a taxa de deformação (figura 16).

O termo “viscosidade aparente” foi utilizado para descrever precisamente a resistência ao escoamento dos sistemas protéicos, pois um grande número entre eles são não-newtonianos, com uma viscosidade que se modifica em função da taxa de deformação. A fim de se fazer comparações diretas entre as diferentes dispersões protéicas, a viscosidade aparente a uma taxa de deformação de 100 s^{-1} (η_{100}) foi utilizada. Este valor de taxa de deformação foi escolhido, pois ele é associado à agitação, ao escoamento nas tubulações, na pulverização e em outras operações de transformações (Steffe, 1996; Carr, et. al., 2003).

Quando comparamos os quatros sistemas protéicos (Tabela 11), observamos que as dispersões a 10 % e 15 % (m/m) de PPCN, tiveram uma viscosidade aparente mais elevada que as dispersões de PS a mesma concentração. O que reflete a estrutura molecular destes dois tipos de proteínas. As micelas de caséina conferem um aumento superior a viscosidade das dispersões. No entanto as PS, moléculas globulares, de forma mais compacta em relação às micelas de caséina, demonstraram uma viscosidade que permaneceu praticamente constante. Para as dispersões de

PPCN, a viscosidade aparente aumenta de maneira significativa com o aumento da concentração em proteínas, em particular na passagem da concentração de 10 % a 15 % (m/m). Testes realizados em dispersões de 18 % (m/m) de PPCN, mostraram uma viscosidade aparente (η_{100}) de 284 m.Pa.s, valor muito superior ao encontrado para as dispersões de 15% (m/m) de PPCN. Portanto podemos dizer que a relação entre a viscosidade aparente e a concentração de PPCN, segue uma curva exponencial (figura 14).

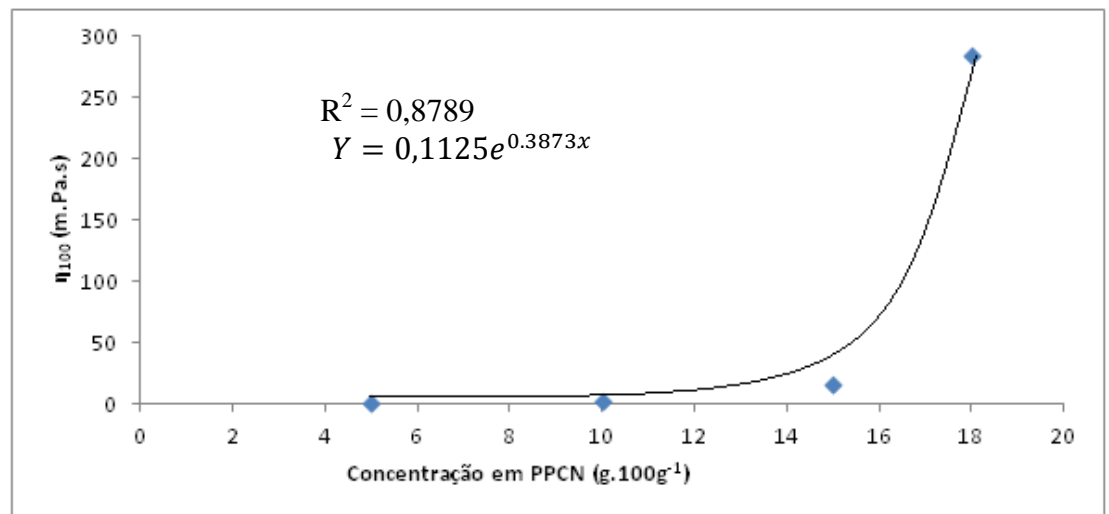


Figura 14. Viscosidade de dispersões a diferentes concentrações de PPCN. (♦) viscosidade aparente.

Os valores de viscosidade aparente de todos os sistemas protéicos PPCN/PS foram intermediários entre os de PPCN e de PS na mesma concentração (tabela11).

Tabela 12. Viscosidade a taxa de deformação de 100s^{-1} (η_{100}) das dispersões protéicas.

	$\eta_{100} \pm$ desvio padrão
PPCN 5%	$1,31 \pm 0,2$
PPCN 5% 0,5PL	$1,31 \pm 0,2$
PPCN 5% 1PL	$1,32 \pm 0,1$
PPCN 10%	$3,3 \pm 0,1$
PPCN 10% 0,5PL	$3,2 \pm 0,2$
PPCN 10% 1PL	$3,88 \pm 0,10$
PPCN 15%	$16,4 \pm 0,1$
PPCN 15% 0,5PL	$18,48 \pm 0,10$
PPCN 15% 1PL	$23,83 \pm 0,20$
PS 5%	$1,09 \pm 0,10$
PS 5% 0,5PL	$1,14 \pm 0,10$
PS 5% 1PL	$1,14 \pm 0,20$
PS 10%	$2,04 \pm 0,20$
PS 10% 0,5PL	$2,08 \pm 0,20$
PS 10% 1PL	$2,08 \pm 0,20$
PS 15%	$4,22 \pm 0,10$
PS 15% 0,5PL	$4,22 \pm 0,20$
PS 15% 1PL	$4,33 \pm 0,10$
PPCN/PS (50-50) 5%	$1,18 \pm 0,10$
PPCN/PS (50-50) 5% 0,5PL	$1,2 \pm 0,20$
PPCN/PS (50-50) 5% 1PL	$1,27 \pm 0,10$
PPCN/PS (50-50) 10%	$2,03 \pm 0,10$
PPCN/PS (50-50) 10% 0,5PL	$2,08 \pm 0,20$
PPCN/PS (50-50) 10% 1PL	$2,26 \pm 0,20$
PPCN/PS (50-50) 15%	$4,15 \pm 0,20$
PPCN/PS (50-50) 15% 0,5PL	$4,21 \pm 0,10$
PPCN/PS (50-50) 15% 1PL	$4,59 \pm 0,10$
PPCN/PS (80-20) 5%	$1,19 \pm 0,20$
PPCN/PS (80-20) 5% 0,5PL	$1,28 \pm 0,10$
PPCN/PS (80-20) 5% 1PL	$1,36 \pm 0,20$
PPCN/PS (80-20) 10%	$2,38 \pm 0,10$
PPCN/PS (80-20) 10% 0,5PL	$2,46 \pm 0,10$
PPCN/PS (80-20) 10% 1PL	$2,83 \pm 0,20$
PPCN/PS (80-20) 15%	$6,19 \pm 0,10$
PPCN/PS (80-20) 15% 0,5PL	$6,45 \pm 0,20$
PPCN/PS (80-20) 15% 1PL	$7,37 \pm 0,10$

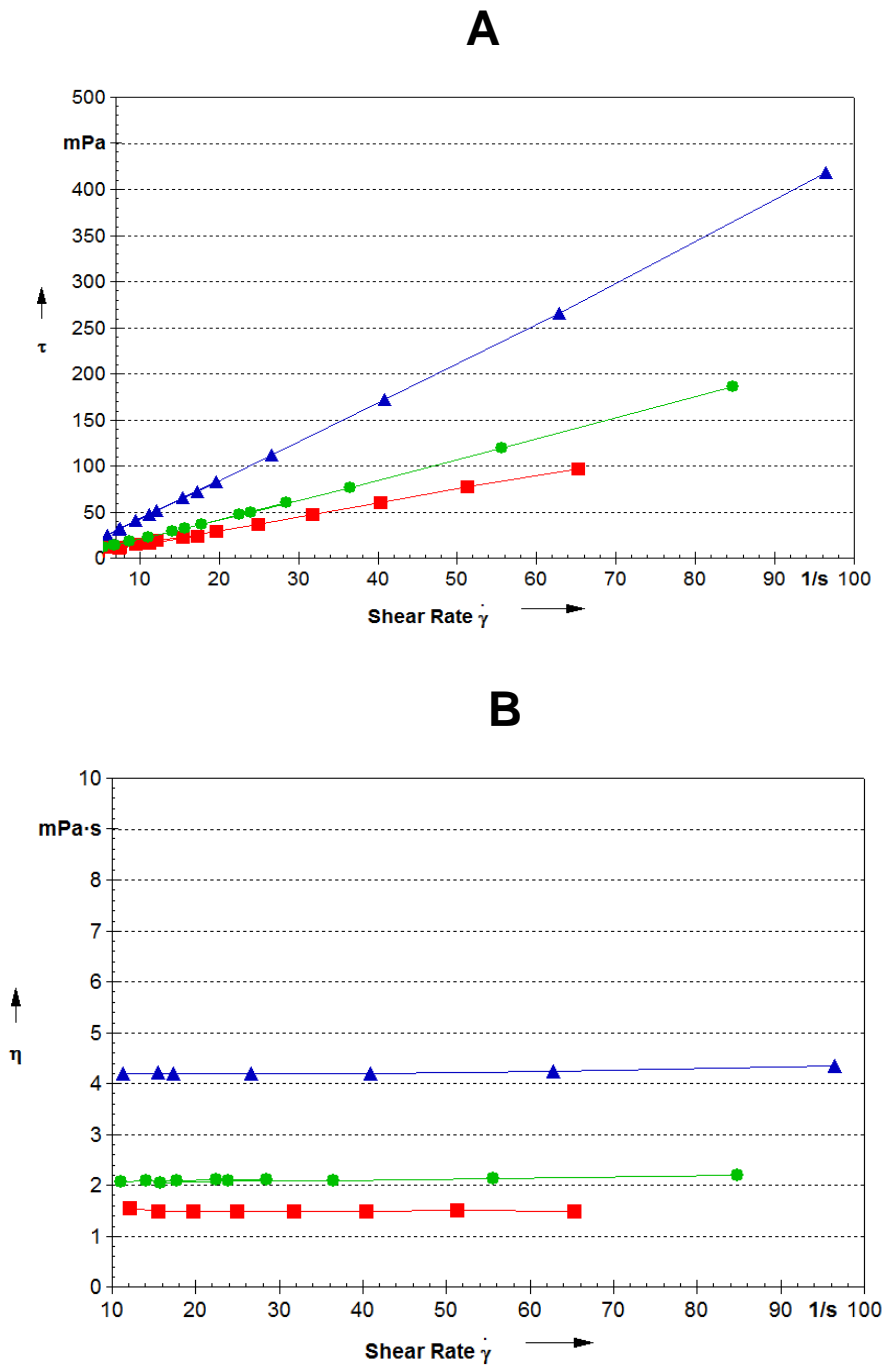


Figura 15. Comportamento reológico de todas as dispersões de PS e PPCN/PS (50-50) em ausência e presença de PL. (▲) dispersões a 15% (m/m) de proteínas, (●) dispersões a 10% (m/m) de proteínas e (■) dispersões a 5% (m/m) de proteínas, em presença e ausência de PL. (A) Reograma, tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.

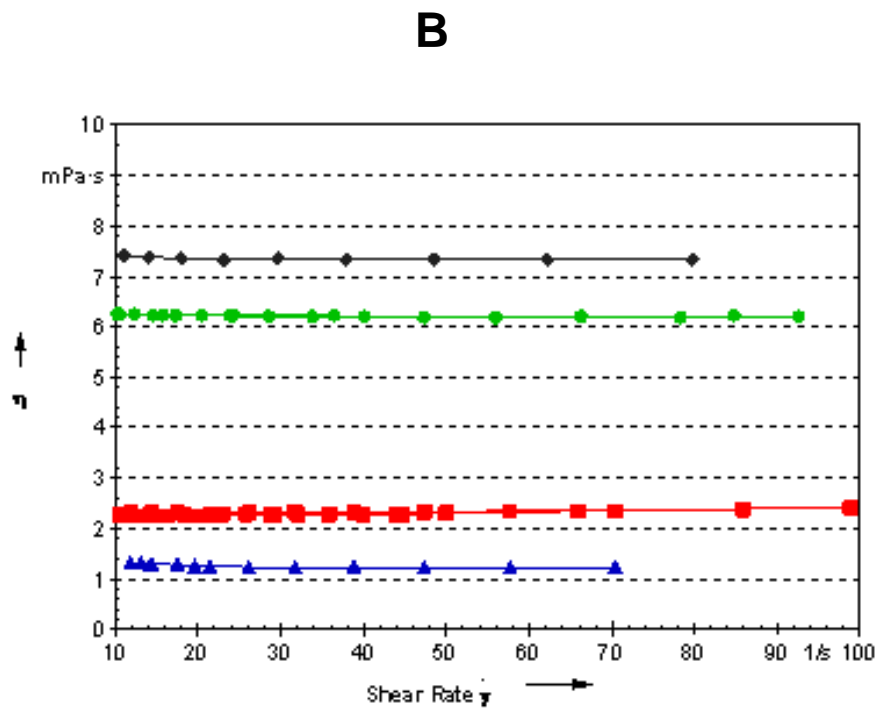
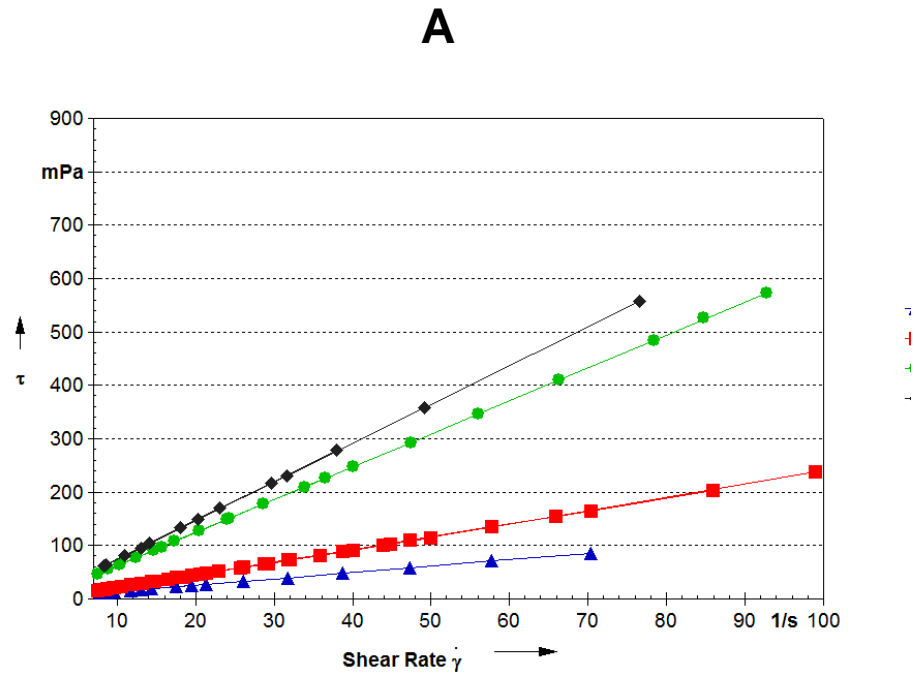


Figura 16. Comportamento reológico de todas as dispersões de PPCN/PS (80-20) em ausência e presença de PL. (▲) dispersões a 5% (m/m) de proteínas e (■) dispersões a 10% (m/m) de proteínas, em presença e ausência de PL; (●) dispersões a 15% (m/m) de proteínas em ausência e presença de 0,5% de PL; e (◆) dispersões a 15% (m/m) de proteínas em presença de 1% de PL. (A) Reograma, tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.

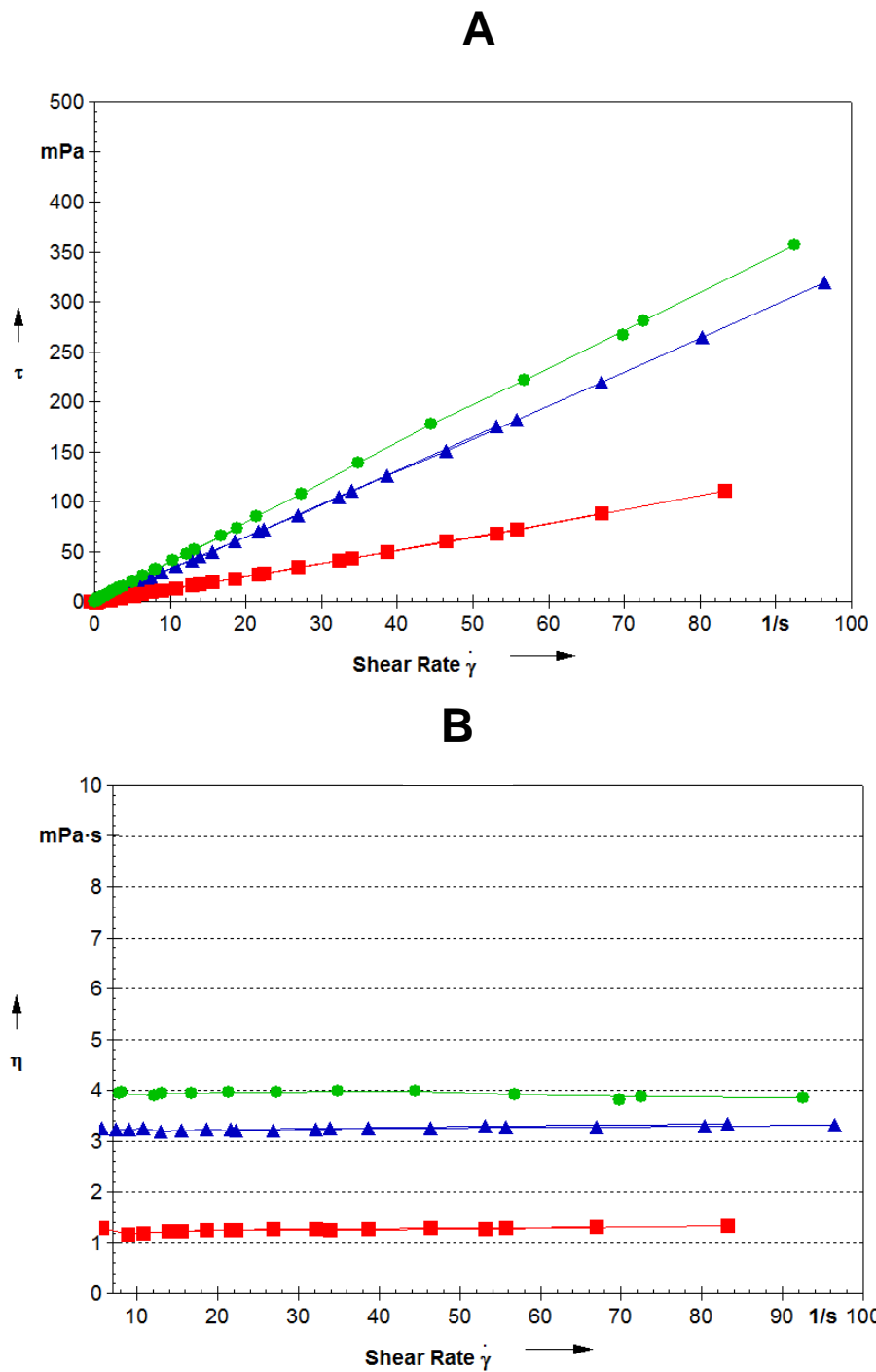


Figura 17. Comportamento reológico de todas as dispersões de PPCN, a concentração de proteínas inferior a 15%, em ausência e presença de PL. (●) dispersões a 10% (m/m) de PPCN em presença de 1% de PL, (▲) dispersões a 10% (m/m) de PPCN em ausência de PL; e (■) dispersões a 5% (m/m) de proteínas, em presença e ausência de PL. (A) Reograma, tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.

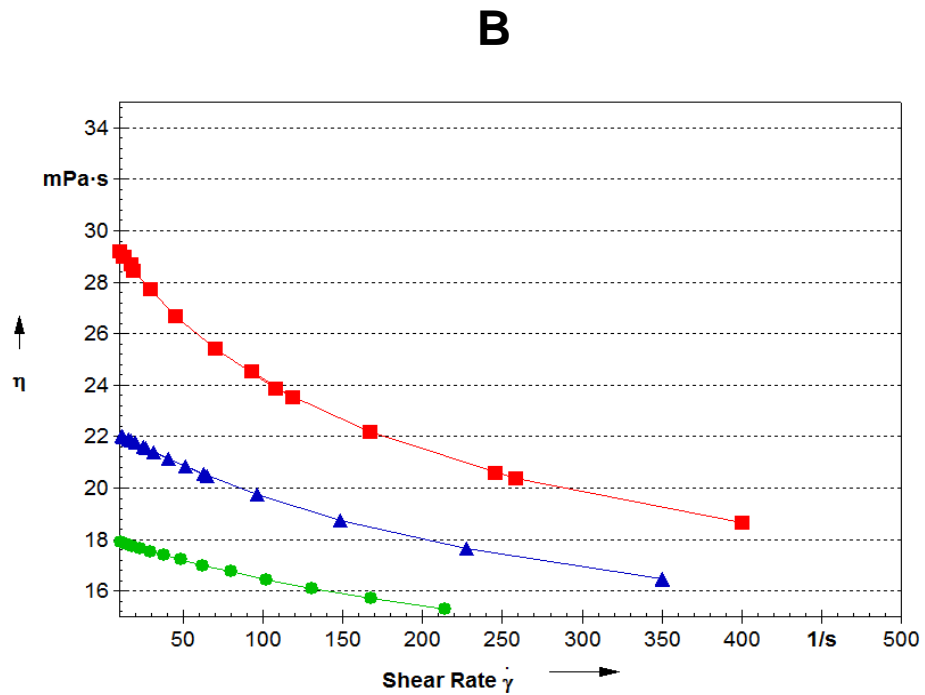
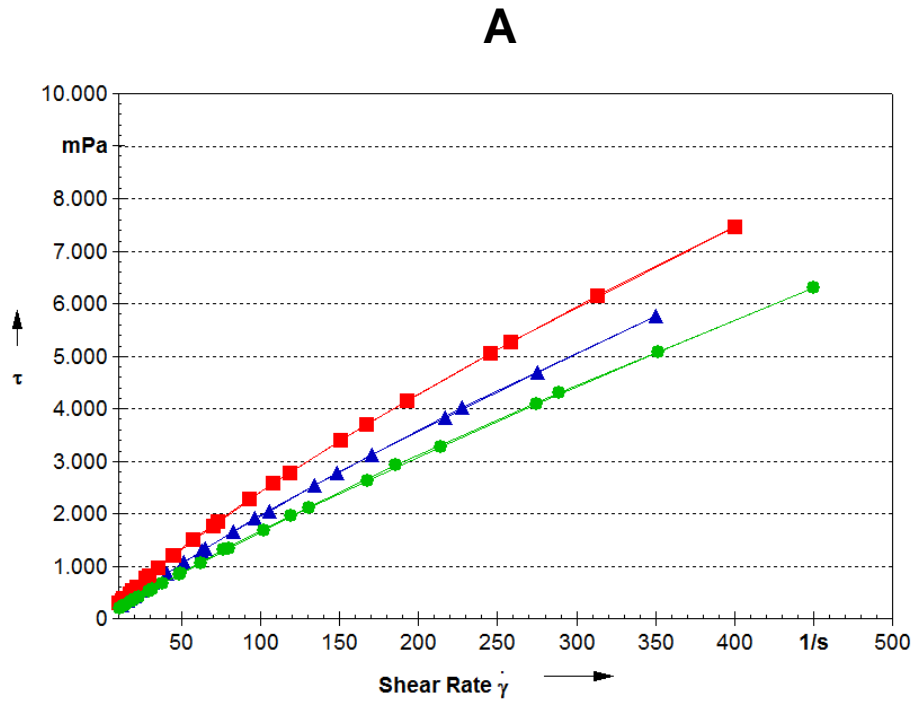


Figura 18. Comportamento reológico de todas as dispersões de PPCN, a concentração de 15% (m/m) de PPCN, em ausência e presença de PL. (●) ausência em PL; (▲) presença de 0.5% (m/m) em PL; e (■) presença de 1% (m/m) em PL. (A) Reograma, tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento; (B) Viscosidade vs. Taxa de cisalhamento.

3.3 Tensão interfacial

Os resultados das tensões interfaciais das diferentes dispersões protéicas realizadas nesse trabalho estão apresentados nas figuras 18 e 19. Para as dispersões em ausência de PL (figura 18), quando aumenta-se a concentração de proteínas, a tensão interfacial diminui, o que confirma que as proteínas do leite são naturalmente tensoativas (Davis & Foegeding et. al., 2007). Esta redução é mais pronunciada nas dispersões de PS e menos para as de PPCN. Em que se concerne às dispersões protéicas de PPCN/PS, a tensão interfacial mais baixa foi a da mistura de 50 % (m/m) de PS para 50 % (m/m) de PPCN. Esses dados confirmam que as PS são mais tensoativas, pois quando a concentração de PPCN aumenta (80 % (m/m) de PPCN para 20 % (m/m) de PS), a tensão interfacial das dispersões também aumentam (figura 18).

A evolução temporal da tensão interfacial das dispersões protéicas mostra que o aumento da tensão interfacial em relação ao tempo é diferente entre esses dois tipos de proteínas (figura 19), e que a molécula que se adsorve mais rapidamente são as PPCN, o que está de acordo com (Perez et. al. 2010). De maneira geral a inclinação das curvas de tensão interfacial em função do tempo, depende da velocidade de adsorção das moléculas na interface, assim quanto maior a velocidade das moléculas a se adsorberem na interface, menor será o valor do módulo da inclinação da curva. Na tabela 12 estão representados os módulos das inclinações das curvas de tensão interfacial em função do tempo. As caseínas com uma atividade interfacial elevada e uma estrutura flexível e supramolecular, se adsorvem e se ligam à interface ar/água rapidamente, em comparação com uma proteína mais compacta e globular, como as proteínas solúveis (Gaiani et. al., 2011; Perez et. al. 2011).

Tabela 13. Inclinações das curvas de tensão iterficial em função do tempo, das dispersões à 15% (m/m) de proteínas. Mesmas letras em uma mesma coluna não diferem significativamente.

Soluções	Inclinação	Soluções	Inclinação	Soluções	Inclinação
PPCN 1PL	0,0090 a	PPCN 0,5PL	0,0045 a	PPCN	0,0003 a
PS 1PL	0,0077 a	PS 0,5PL	0,0102 b	PS	0,0086 b
PPCN/PS 50-50 1PL	0,0137 b	PPCN/PS 50-50 0,5PL	0,0103 b	PPCN/PS 50-50	0,0056 c
PPCN/PS 80-20 1PL	0,0140 b	PPCN/PS 80-20 0,5PL	0,0063 a	PPCN/PS 80-20	0,0032 c

Para as dispersões em presença de PL, os valores de tensão interfacial, foram sempre inferiores em relação às dispersões em ausência de PL (figura 18), foi mostrado que em misturas de proteínas e surfactantes de baixas massas molares onde pequenas quantidades destes, em relação a uma certa concentração de proteínas, podem aumentar a taxa de declínio da tensão interfacial em relação a observada por proteínas em ausência de surfactantes de baixas massas molares (Wilde et. al., 2004, Davis & Foegeding, 2007). No entanto com o aumento da concentração de proteínas, existe um aumento da tensão interfacial (figura 18), o que contraria o comportamento das dispersões em ausência de PL. Esse comportamento indica que a lecitina, um surfactante de características iônicas, interage com as moléculas de proteínas, mais provavelmente com as caseínas, pois o aumento da tensão interfacial foi superior neste caso. Esse efeito pode ser explicado pelo fato de as caseínas terem uma área molecular superior, em relação as PS, pois sua estrutura é naturalmente aberta, pois não apresenta estrutura terciária,, portanto poderá existir mais sítios disponiveis para a interação com os PL.

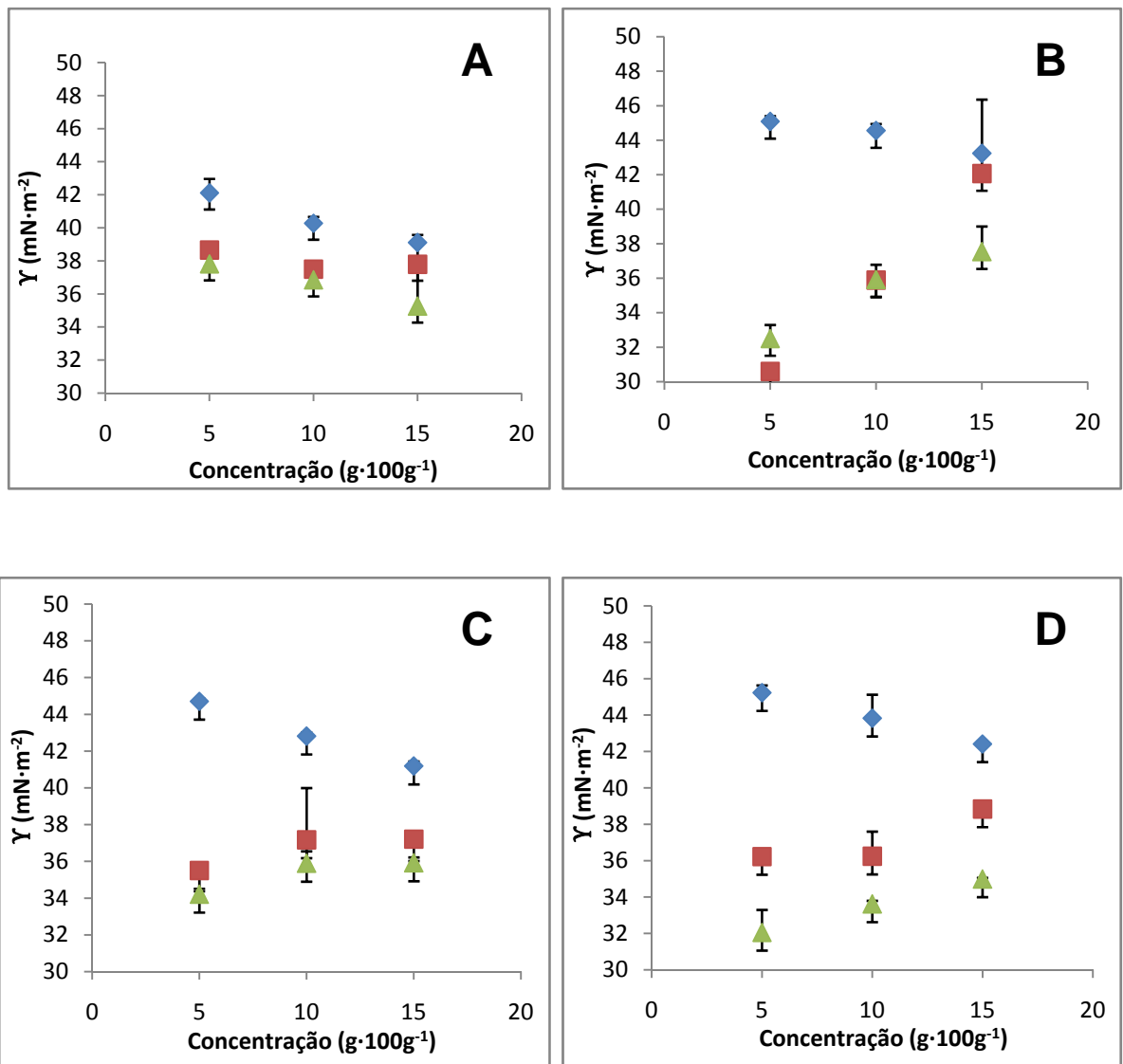


Figura 19. Tensão interfacial da superfície ar/água, medida a 40 °C com uma cinética de 600 segundos em função da concentração de proteínas em ausência de PL (◆); presença de 0,5% (m/m) de PL (■); e presença de 1% (m/m) de PL (▲). (A) dispersões de PS; (B) dispersões de PPCN; (C) dispersões de PPCN/PS (50-50); e (D) dispersões de PPCN/PS (80-20).

Para melhor compreensão do comportamento da adsorção de diferentes dispersões protéicas em presença e ausência de PL, a resposta dinâmica da tensão interfacial de todas as dispersões a 15 % (m/m) de proteínas, é igualmente apresentada na figura 19. Não foi esperado o tempo de estabilização da tensão interfacial, pois durante a atomização, o tempo de secagem é cerca de 20 – 60 segundos, o que não é suficiente para a estabilização da camada interfacial, ar/água.

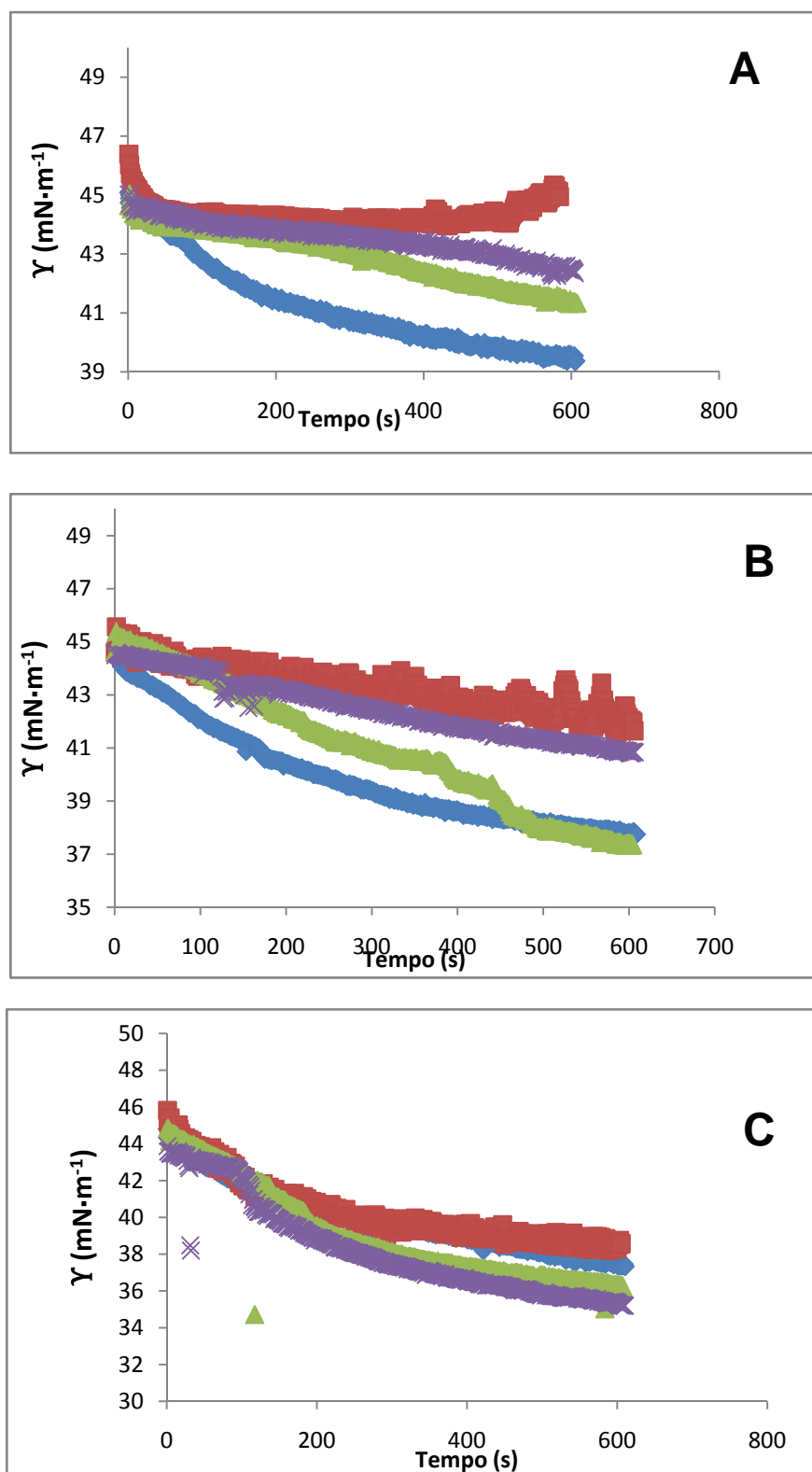


Figura 20. Evolução temporal da tensão interfacial da interface ar/água, medida a 40 °C, das dispersões protéicas à concentração de 15 % (m/m) em: (♦) PS; (■) PPCN; (▲) PPCN/PS (50-50); e (×) PPCN/PS (80-20). (A) dispersões em ausência de PL; (B) dispersões em presença de 0,5 % (m/m) de PL; e (C) dispersões em presença de 1% (m/m) de PL.

De acordo com Nahrungbauer (1995), as curvas podem ser divididas em três etapas:

- Um período de adaptação durante o qual o valor de tensão interfacial não varia, o qual não é visto nos experimentos realizados neste trabalho. A tensão interfacial diminui muito rapidamente. Nestas concentrações protéicas, muito elevadas, o processo de adsorção é terminado em um tempo muito curto, menos de alguns segundos, (Mezdour et. al. 2007). Pelo fato da alta concentração de proteínas na fase contínua, a cobertura da interface já é relativamente elevada, mesmo na etapa inicial do processo de adsorção (Piazza, et. al., 2009). De maneira geral, maior as concentrações protéicas, menor será o tempo para que as moléculas se dispersem para a interface.
- Um período de rápida baixa de tensão interfacial, ao curso do qual as macromoléculas de tensoativas são adsorvidas e a cinética real da adsorção depende da fração da cobertura da interface.
- Uma região a qual uma diminuição muita lenta da tensão interfacial é observada em razão da ordem de arranjos progressivos das proteínas na camada interfacial (Avranas & Tasopoulos, 1999).

De maneira geral maior a concentração de PL, mais rápido é o tempo de estabilização da tensão interfacial. Como dito anteriormente e pode ser confirmada nestas figuras, a caseína tem um tempo de estabilização da interface ar/água mais rápido, em relação às proteínas solúveis (figura 19).

3.4 Reologia de cisalhamento interfacial

A fim de se avaliar o comportamento de filmes interfaciais, é útil examinar os módulos de estocagem e perda em função da frequência. Nas Figuras 20 e 21, esses módulos são apresentados em função da frequência (Hz). O módulo de elasticidade interfacial ou módulo de estocagem interfacial (G_i') descreve a característica sólida de uma interface; o módulo de perda interfacial ou módulo viscoelástico interfacial (G_i'') descreve as características líquidas interfaciais. A interface é do tipo líquido, se seus valores de $G_i'' > G_i'$, caso contrário é de uma interface do tipo sólida.

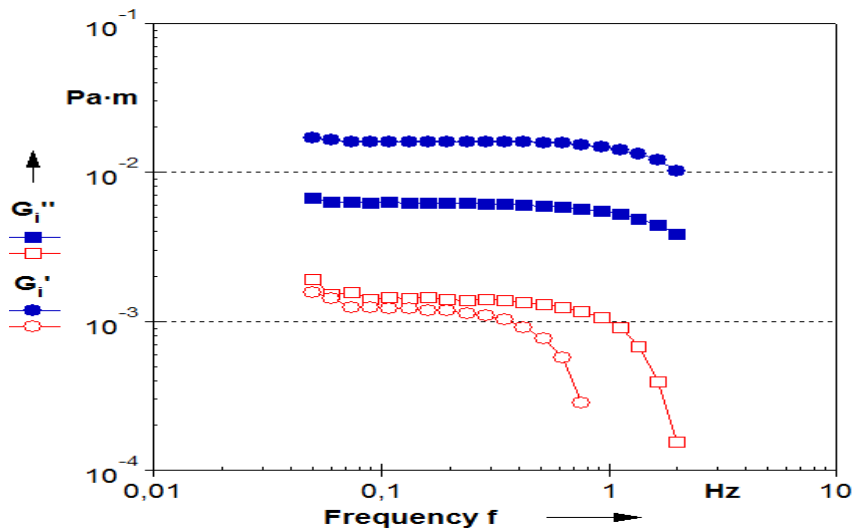


Figura 21. Medidas de G_i' (círculo) e G_i'' (quadrado) em varredura em frequência de todas as soluções em ausência de PL; Soluções de PS (símbolos fechados) e soluções de PPCN/PS 50-50 (símbolos abertos).

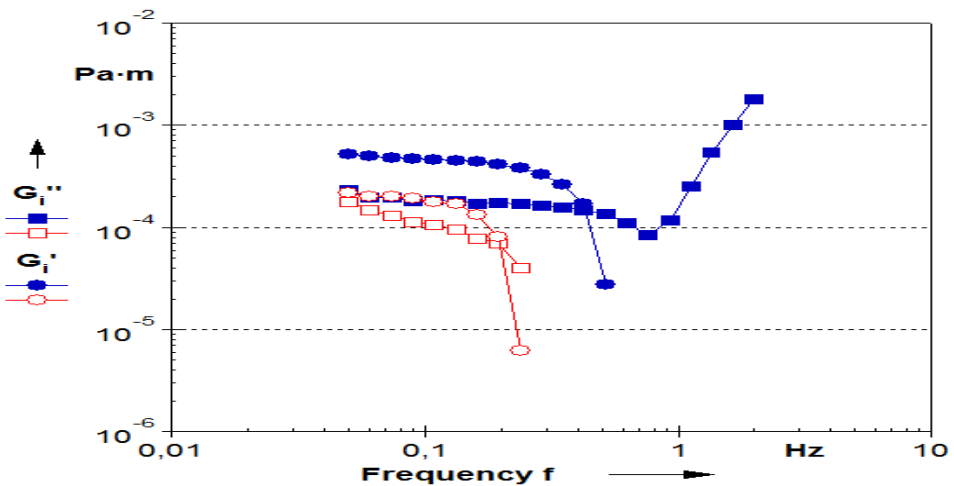


Figura 22. Medidas de G_i' (círculo) e G_i'' (quadrado) em varredura de frequência de todas as soluções em presença de 1% de PL (sinais fechados) e 0,5% de PL (sinais abertos).

Para as dispersões contendo somente PPCN e PPCN/PS 80-20, não foram encontrados valores de G_i' e G_i'' . A natureza das monocamadas de PPCN assim como suas estruturas desordenadas (figura 2) podem ser as possíveis causas. A alta concentração de PPCN nas dispersões pode ter influenciado os resultados, pois as micelas de caseínas têm uma forte contribuição para o aumento da viscosidade das dispersões (figura 14), e a metodologia da reologia de cisalhamento interfacial é fortemente influenciada pela viscosidade da fase contínua, portanto maior a viscosidade da dispersão, maior será as dissipações do stress aplicado, alterando assim os resultados de

G'_i e G''_i do sistema. Mais experiências deverão ser feitas para um melhor entendimento dos efeitos das PPCN nas interfaces ar/água, medidas a partir de um reômetro de cisalhamento interfacial.

As dispersões de PS tiveram valores de G'_i mais elevados em relação a G''_i em todas as faixas de frequências estudadas, típico de uma interface de características sólidas ($G'_i > G''_i$). Mas para as dispersões de PPCN/PS (50-50), o G''_i foi superior do que o G'_i , tendo assim uma interface do tipo líquido ($G'_i < G''_i$). As PPCN influenciaram a característica das interfaces, pois as dispersões de PPCN/PS (50-50) tiveram menores valores de G'_i e G''_i em relação as dispersões de PS, e valores de $G'_i < G''_i$, apresentando uma interface do tipo líquida.

Foram encontrados valores de G'_i e G''_i para todas as dispersões em presença de PL, inclusive para as dispersões de PPCN. Em razão de sua natureza anfifílica, as moléculas de fosfolipídeos podem ser ligadas a interface ar/água e formar monocamadas estáveis (Kragel et al., 1996). Este efeito foi observado para todas as dispersões contendo PL, as quais tiveram as respostas de cisalhamento interfacial constante em relação a suas concentrações de PL (figura 23).

Na figura 21, a partir de valores de frequências superiores a 0.1 Hz, houve a quebra do filme interfacial. Caracterizado pela queda brusca dos valores de G'_i e o aumento dos valores de G''_i .

As dispersões contendo PL (Figura 23) tiveram valores de G'_i (módulo de perda interfacial) maiores que G''_i (módulo de estocagem interfacial) em menores valores de frequência o que indica que as interfaces das dispersões eram mais elásticas que viscosas e que a interface tinha uma estrutura do tipo gel ao repouso. No entanto em maiores valores de frequência, acontece à ruptura da interface, ponto de intercessão das curvas de G'_i e G''_i . Isso resulta uma modificação da interface do tipo gel, a uma interface do tipo líquida, quando o valor de G''_i passa a ser maior que o valor de G'_i .

O resultado do teste de varredura em frequência mostra que as propriedades da rede de proteínas - fosfolipídeos na interface ar/água não são fortemente influenciadas pela composição e a concentração do líquido na fase contínua.

3.5 Reologia de dilatação interfacial

As diferentes concentrações e formas protéicas tiveram efeitos diferentes na elasticidade interfacial. Nas Figuras 24 e 25, o módulo elástico (E) é plotado em função do tempo. O módulo elástico aumenta em função do tempo, para a maioria das dispersões, como foi observado para sistemas multi-componentes (Piazza et. al., 2008). Os dados de reologia de dilatação interfacial para todas as dispersões estudadas neste trabalho, Figura 24, mostra que as proteínas não precisam de um tempo finito para migrar e se adsorverem na interface, pois em alta concentração de proteínas no bulk, o grau de cobertura da interface já é relativamente alto na etapa inicial do processo de adsorção (Kudryashova et al, 2003;. Xu & Damodaran, 1993). Foi demonstrado que o módulo de dilatação interfacial aumenta simplesmente quando a cobertura de saturação é atingida, em razão das interações intermoleculares (Jongh et al., 2004). Mas para as dispersões que contem somente PPCN em ausência e presença de 0,5 % (m/m) de PL (figura 25) o módulo de dilatação foi constante em função do tempo, o que pode ser explicado pelo fato que o módulo de dilatação é limitado e retardado pelos arranjos de conformações em razão do alto grau de cobertura da interface (Kudryashova et al, 2003;. Xu & Damodaran, 1993). Este tipo de comportamento é característico de uma formação de monocamadas. Em conseqüência, para as dispersões de PPCN em presença de PL, a alta concentração de proteínas pode impedir que os PL cheguem e se adsorvam na interface ar/água, durante esta cinética estudada, 300 segundos. As dispersões de PPCN em presença de 1 % (m/m) de PL tiveram um módulo de dilatação crescente em função do tempo. Em conseqüência, as dispersões com as mais baixas concentrações de PPCN em presença de 1 % (m/m) de PL mostraram um maior aumento do módulo de dilatação (figura 25), menor a relação PPCN/PL, menor é o impedimento estérico das moléculas de PPCN.

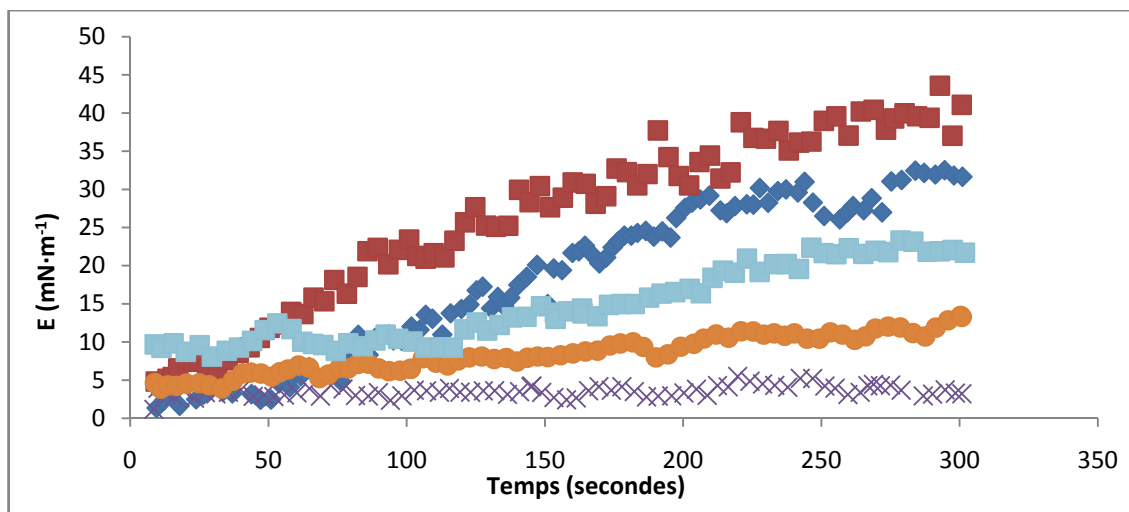


Figura 23. Evolução temporal do módulo de elasticidade na interface ar/água, medido a 40 °C, das dispersões de proteínas a concentração de 15 %. Dispersões de PS em ausência de PL (♦); dispersões de PS em presença de PL (0,5% e 1%) e solução de PPCN/PS 50-50 em ausência de PL (■); Dispersões de PPCN e PPCN/PS 50-50 em ausência de PL (×); Dispersões de PPCN em presença de PL (●); Dispersões de PPCN/PS 80-20 em ausência e presença de PL (0,5% e 1%) (■).

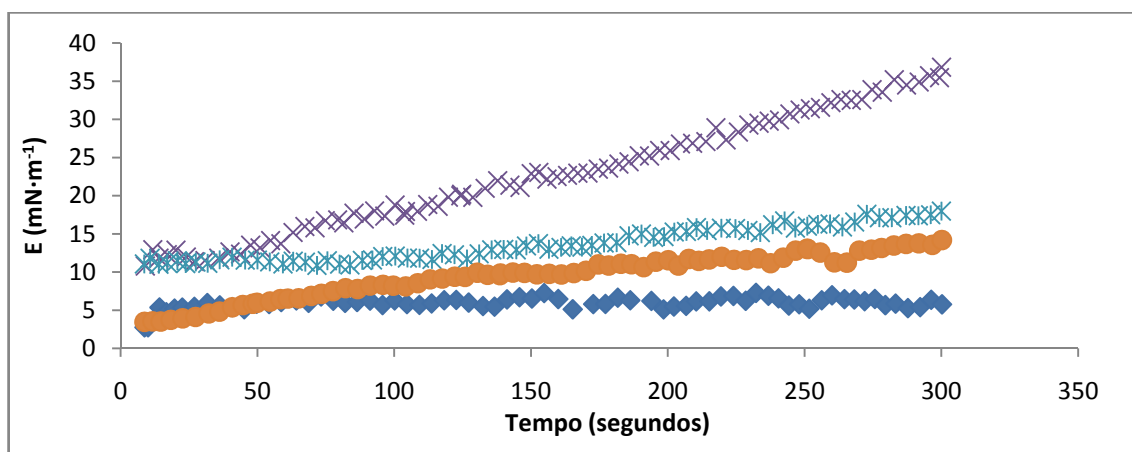


Figura 24. Evolução temporal do módulo de elasticidade na interface ar/água, medido a 40 °C, das dispersões de PPCN; em ausência e presença de 0,5% de PL (♦); dispersões a 15% de PPCN em presença de 1% de PL (●); dispersões a 10% de PPCN em presença de 1% de PL (×); dispersões a 5% de PPCN em presença de 1% de PL (×).

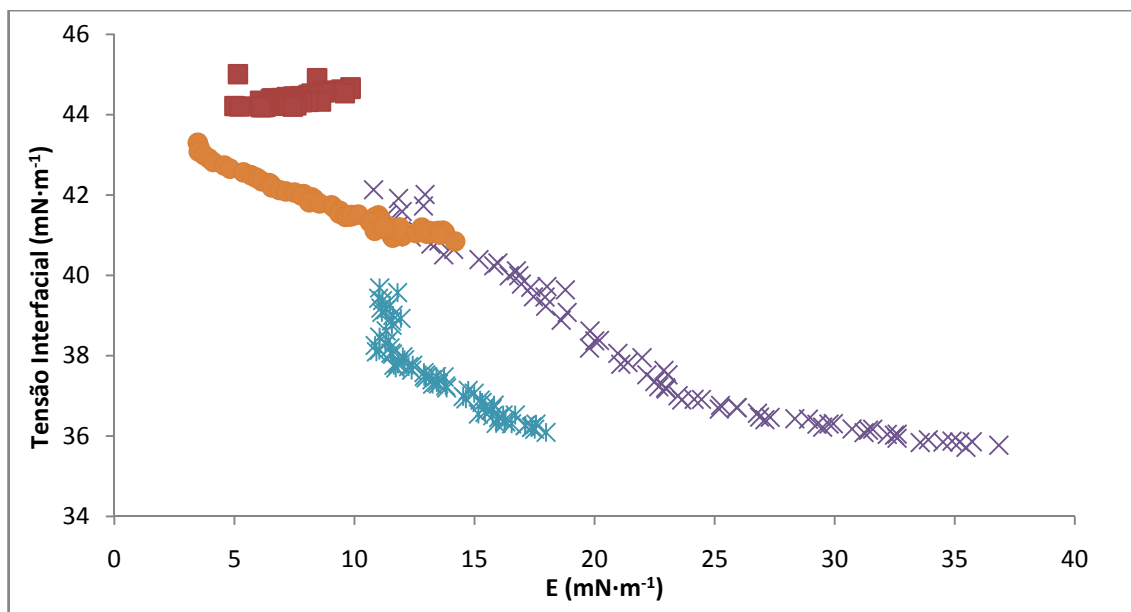


Figura 25. Tensão interfacial da interface ar/água em função do módulo de elasticidade, medida a 40 °C, das dispersões de diferentes concentrações de PPCN: dispersões em ausência de PL (■); dispersões a 15% de PPCN em presença de 1% de PL (●); dispersões a 10% de PPCN em presença de 1% de PL (×); dispersões a 5% de PPCN em presença de 1% de PL (×).

Na figura 26, percebe-se o efeito da tensão interfacial sobre o módulo de dilatação para as dispersões de PPCN. Em geral, observa-se que os valores de E aumentam quando a tensão interfacial diminui (Patino et. al., 1999), o que indica que existe mais moléculas na superfície, que contribui para a redução da tensão interfacial e portanto para o aumento do módulo de dilatação. Para as dispersões de PPCN em ausência de PL (Figura 26), a tensão interfacial foi similarmente constante, assim como o módulo de dilatação, comportamento característico de monocamadas. No entanto, quando foi adicionado PL, a tensão interfacial foi reduzida e o módulo de dilatação aumentou, o que indica que existe uma adsorção das moléculas de PL na interface ar/água e, portanto essa molécula pode, provavelmente, substituir as moléculas de PPCN na interface. Assim sendo, para as dispersões com as menores relações entre a concentração de PPCN/PL na fase contínua, a adsorção das moléculas de PL na interface, se passa em uma velocidade mais elevada.

4. Discussão

Todas as soluções preparadas apresentaram uma viscosidade aparente (η_{100}) mais baixa em relação a um nível máximo para a atomização 200 m·Pa.s (Jeantet, 2008). As soluções a 15 % de PPCN tiveram as maiores viscosidades, o que está ligado à sua estrutura molecular desorganizada, no entanto as PS tiveram a viscosidade praticamente constante em todas as concentrações estudadas, o que confirma que as caseínas são os agentes presentes naturalmente no leite que têm o papel mais importante no aumento da viscosidade durante os processos de concentração.

As PPCN e as PS mostraram um efeito surfactante, pois quando se aumenta as suas concentrações nas dispersões, a tensão interfacial diminui. Em relação a essas duas proteínas as PS tiveram um poder surfactante superior que as PPCN, e estas últimas apresentaram uma velocidade de migração superior no sentido da interface. Quando adicionamos PL às soluções, a tensão interfacial foi sempre inferior, em relação às mesmas concentrações de proteínas em ausência de PL, mas quando as concentrações de proteínas aumentaram, principalmente para as soluções de PPCN, a tensão interfacial também aumentou igualmente, contrariando ao que se era esperado.

Todas as soluções protéicas em presença de PL foram classificadas como do tipo gel, $G'_i > G''_i$, confirmando que existem interações entre as moléculas na interface ar/água. Esses valores de G'_i e G''_i foram similares para todas as soluções. Podemos deduzir que, provavelmente, são os efeitos das moléculas de PL que migram para a interface ar/água que influenciam sobre este efeito. Para as soluções protéicas em ausência de PL, as soluções de PS tiveram os maiores valores de G'_i e G''_i os quais não foram encontrados para as soluções de PPCN em ausência de PL.

Para as análises de elasticidade interfacial, as soluções de PS tiveram os maiores valores do módulo de dilatação, que aumentou em função do tempo, o que confirma que a adsorção ainda estava acontecendo, e que o equilíbrio não foi atingido. No entanto para as soluções de PPCN em ausência de PL, o módulo de dilatação não se alterou em função do tempo, portanto podemos afirmar que após uma cinética de adsorção de 300 segundos, o

equilíbrio foi atingido. Confirmando que as moléculas de PPCN formam monocamadas nas interfaces ar/água.

Quando foi-se adicionado PL nas soluções de PPCN, o módulo de dilatação aumentou em função do tempo, confirmando que os PL tiveram um transporte no sentido da interface.

A relação PPCN/PL mais baixa permite um aumento na tensão interfacial e do módulo de dilatação em função do tempo. No entanto os valores de G'_i e G''_i são constantes para todas as relações proteínas/PL. Esse método foi realizado após uma cinética de 60 minutos, portanto as soluções podem ter atingido o equilíbrio. Sendo assim foi encontrado PL na camada interfacial ar/água. Mas para a metodologia de tensão interfacial e de reologia de dilatação interfacial não foi esperado que as soluções atingissem o equilíbrio, nesta cinética inferior a 600 segundos, a relação proteína/PL principalmente PPCN/PL influenciaram nos resultados.

A secagem por pulverização implica a transformação de uma substância de forma líquida em forma seca devido a uma pulverização em um meio a temperatura elevada e baixa umidade relativa (Figura 5). Procede-se em uma só operação contínua e completamente automatizada. A matéria pode ser sobre forma de solução, suspensão ou de massa. O objetivo da pulverização de um concentrado é de aumentar a área de contato ao máximo para favorecer a evaporação. Menores são as gotas, maior será a área e mais fácil será a evaporação, obtendo assim um melhor rendimento térmico. O ideal seria que todas as gotículas fossem atomizadas a um tamanho uniforme, o que significaria que o tempo de secagem seria o mesmo para todas as gotículas, obtendo assim uma taxa de umidade uniforme (Masters, 1991; Tratnig et. al., 2009). Os parâmetros pertinentes para a formação das gotas são a viscosidade dinâmica do líquido, a densidade e a tensão interfacial da interface ar, o diâmetro e a altura da câmara, assim como o diâmetro do orifício de pulverização (Tratnig et. al., 2009).

A adição de PL tem por efeito diminuir a tensão interfacial da superfície do concentrado e, portanto de formar gotas de pequenos tamanhos, e também, de recobrir a superfície do pó para melhorar suas propriedades de reidratação. Para todas as soluções de PPCN, o efeito da diminuição da tensão interfacial foi atendido, mas quando a concentração de PPCN aumentou em relação à

concentração de PL a tensão interfacial também aumentou. Portanto se adicionarmos PL antes do processo de atomização, em soluções de alta concentração de caseínas, como algumas fórmulas de leites infantis, ou mesmo para a elaboração de PPCN, o tamanho das gotículas formadas e os efeitos da encapsulação dos pós pelos PL não serão influenciados.

5. Conclusão

A utilização simultânea, da tensão interfacial, da reologia de cisalhamento interfacial e da reologia de dilatação interfacial, permitiu a caracterização das propriedades interfaciais de diferentes misturas a alta concentração de micelas de caseínas, proteínas solúveis e fosfolipídios na interface ar/água. Os recentes progressos ao nível da caracterização dos filmes interfaciais permitem a melhor compreensão das propriedades de formação da interface ar/água de soluções concentradas.

As soluções de micelas de caseínas e proteínas solúveis mostraram comportamentos diferentes na interface ar/água. Contrariamente as proteínas solúveis, as micelas de caseínas formam monocamadas na interface ar/água e sua tensão interfacial é notavelmente maior que a obtida para as soluções de proteínas solúveis.

Além de seus comportamentos reológicos distintos, as propriedades interfaciais destas duas proteínas são igualmente diferentes, as micelas de caseínas mostram uma velocidade mais importante de migração para a interface, um poder surfactante mais fraco, e um maior aumento da viscosidade comparado as proteínas solúveis.

Um dos resultados mais importantes deste estudo é sem nenhuma dúvida a interação existente entre as micelas de caseína e fosfolipídeos ao curso de suas adsorções na interface ar/água. Esses resultados não somente foram confirmados pelos dados de tensão interfacial, mas também pelos resultados reológicos de cisalhamento e de dilatação interfacial. A partir desta interação entre as micelas de caseínas e fosfolipídios podemos formular uma teoria que as micelas de caseína formam uma monocamada estável na interface e impedem que as moléculas de fosfolipídios cheguem e se adsorvam a esta, em um tempo definido.

A partir destes resultados, novas perspectivas de pesquisas podem ser propostas. Na verdade, mostra-se necessário de continuar o estudo desta relação existente entre as moléculas de caseína e os fosfolipídios nas propriedades interfaciais. Para a confirmação dessa teoria, mostra-se importante efetuar, por exemplo, uma análise de microscopia de infravermelho na interface (PM-IRRAS) nas soluções de diferentes concentrações de micelas de caseína e fosfolipídios, em função do tempo de estabilização desta

interface, para saber se nas soluções de micelas de caseína - fosfolipídios, são encontradas na interface, matéria gorda, proteínas ou essas duas moléculas.

Outro resultado interessante deste trabalho mostra que a adição de fosfolipídios em soluções de alta concentração de caseínas, antes do processo de atomização, não é suficiente para diminuir os tamanhos das gotículas formadas a partir da atomização. E que a superfície do pó será recoberta por essas proteínas, pois elas migram para interface com uma velocidade mais elevada que os fosfolipídios. Este efeito pode diminuir as propriedades de reidratação dos pós. Uma boa alternativa é de se adicionar os fosfolipídios após o processo de atomização das dispersões, pois o fraco tempo de secagem (cerca de 20 a 60 segundos), não será suficiente para fazer com que as caseínas cheguem à interface do pó substituindo os fosfolipídios. Portanto a superfície do pó se constituiria praticamente de fosfolipídios, melhorando as propriedades de reidratação do produto.

6. Referências Bibliográficas

A

Antunes, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, p. 150, 2003.

Aschaffenburg R., Drewry J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. Proc XV **International Dairy Congress**, London, England, n. 3, p. 1631–1637, 1959.

Avranas, A., Tasopoulos, V.. Aqueous solutions of sodium deoxycholate and hydroxypropyl methyl cellulose: Dynamic surface tension measurements. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 221, p. 223–229, 1999.

B

Bals, A., Kulozik, U. Effect of pre-heating on the foaming properties of whey protein isolate using a membrane foaming apparatus. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 903 – 908, 2003.

Bantchev G, B., Schwartz D. K. Surface shear rheology of beta-casein layers at the air/solution interface: formation of a two-dimensional physical gel. **Langmuir**, v. 19, p. 2673 - 2682, 2003.

Beau, M. La Caséine, **published by the author**. 61 Boulevard des Invalides, Paris, 1932.

Benjamins, J., DE Feijter, J. A., Evans, M. T. A., Graham, D. E., Phillips, M. C.. Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air/water interface. **Discussions of the Faraday Society**, v. 59, p. 218–229, 1975.

Bimbenet J.J., **Le séchage dans les industries agricoles et alimentaires**, SEPAIC, Paris, France, , p. 1–31, 1978.

Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., Beaufrère, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Physiology**, v. 94, p. 14930 – 14935, 1997.

Borcherding, K., Lorenzen, P. C., Hoffmann, W., & Schrader, K. Effect of foaming temperature and varying time/temperature conditions of pre-heating on the foaming properties of skimmed milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 349 – 358, 2008.

Bos, M. A., Van Vliet, T.,. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. **Advanced Colloid Interface Science**. v. 91, p. 437–471, 2001.

C

Cornec, M., Cho, D., & Narsimhan, G. Adsorption dynamics of α -lactalbumin and β -lactoglobulin at air-water interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 214, p. 129 – 142, 1999.

Caron, A., St-Gelais D., Pouliot Y. Coagulation of milk enriched with ultrafiltered or diafiltered microfiltered milk retentate powders, **International Dairy Journal**, v. 7 p. 445–451, 1997.

Carr, A. J., Southward, C. R., Creamer, L. K.. Protein hydration and viscosity of dairy fluids. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), **Advanced dairy chemistry - Proteins**, (3rd ed.), Kluwer Academic, New York (NY) v. 1, p.1289-1323, 2003.

Carrera, C., & Rodríguez Patino, J. M. Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 407 – 416, 2005.

Chandrasekaran, S. K., King, C. J. Volatiles retention during drying of food liquids. **Chemistry. Engenering Journal**, v. 18, p. 520-526, 1972.

Charlesworth, P. H., Marshall, W. R.. Evaporation from drops containing dissolved solid. **Chemistry Engenering Journal**, v. 6, p. 9-23, 1960.

Clark D. C, Dann R., Mackie A. R., Mingins J., Pinder A. C., Purdy P. W. Surface-diffusion in sodium dodecyl sulfate-stabilized thin liquid-films. **Journal Colloid Interface Science**, v. 138, p. 195–206, 1990.

D

Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., Goff, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 1025 – 31, 2004.

Damodaran S., Anand K. Sulfhydryl– disulfide interchange-induced interparticle protein polymerization in whey protein-stabilized emulsions and its relation to emulsion stability. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p. 3813 – 3820, 1997.

Dangin M., Boirie Y., Rodenas C. G., Gachon P., Fauquant J., Callier P., Ballèvre O. Beaufrère B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **Journal Physiology Endocrinol Metabolism.**, v. 208, p. 340 – 348, 2001.

Davis J. P., Foegeding E. A. Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 54, p. 200 – 210, 2007.

De Kruif, C. G., Grinberg, V. Y. Micellisation of β -casein. **Colloids and Surfaces**, v. 210, p. 183 – 190, 2002.

De Kruif, C. G., Hol, T. C., Casein micelle structure, functions and interactions. In: P.F. Fox, P.L.H. Sweeney, Editors , **Advanced Dairy Chemistry —1, Proteins**, (3rd edition, Part A), Kluwer Academic, New York (NY), p. 233–276, 2003.

Desfougères, Y., Lechevalier, V., Pezenec, S., Artzner, F., Nau, F. Dry-heating makes hen egg white lysozyme an efficient foaming agent and enables its bulk aggregation. **Journal. Agricultural and Food Chemistry.**, v. 56, p. 5120 – 5128, 2008.

Desfougères, Y., Saint-Jalmes, A., Salonen, A., Vié, V., Beaufils, S., Pezenec, S., Desbat, B., Lechevalier, V., Nau, F. Strong Improvement of Interfacial Properties Can Result from Slight Structural Modifications of Proteins: The Case of Native and Dry-Heated Lysozyme. **Langmuir**, v. 27, p. 14947 –1 4957, 2011.

Dickinson, E., **Les colóides alimentaires**. Primeira edição; Masson, Paris, France, v. 1, p. 122 – 145, 1996.

Dickinson, E. Proteins at interfaces and in emulsions: Stability, rheology and interactions. **Journal Chemistry Society**, v. 12, p. 1657 – 1669, 1998 a.

Dickinson, E., Murray, B. S., Stainsby, G. Protein adsorption at air-water and oil-water interfaces. In E. Dickinson, & G. Stainsby (Eds.), *Advances in food emulsions and foams* **London Elsevier Applied Science**, p. 123-162, 1988 b.

Dickinson, E.. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. **Colloids and Surfaces B**, v. 15, p. 161–176, 1999.

Dickinson, E.. Review: milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, p. 197- 210, 2001.

Dittman, F. W., Cook, E. M. Establishing the parameters for a spray dryer. **Chemistry Engenering**, p. 108-112, 1977.

E

Erni, P., Fischer, P., Windhab, E. J. Rheology of surfactant assemblies at the air/liquid and liquid/liquid interface. **3^{er} International Symposium on food rheology and structure**, 2002.

F

Fältdt, P. **Surface composition of spray dried emulsions**, Ph.D thesis, Lund University Department of Food Engineering, 1995.

Fältdt, P., Bergenstahl, B.. Spray-dried whey protein/lactose/soybean oil emulsion:. Surface composition and particle structure. **Food Hydrocolloids**, v. 10, p. 421 – 429, 1996.

Farrell, H. M., Jimenez-flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-kwai-hang, K.F., Swaisgood, H.E. Nomenclature of the proteins of cows milk - Sixth revision . **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

Fauquant J., Maubois J.L., Pierre A., Microfiltration du lait sur membrane minérale, **Technology du Lait**. p. 21 – 23, 1988.

Fersht, A. **Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding**; W. H. Freeman: New York, 1999.

Filkova, I., Mujumdar, A. S.. Industrial spray drying systems. In **Handbook of Industrial Drying**, A.S. Mujumdar (ed.). Marcel Dekker, New York, p.243-294, 1987.

Fox P. F. Milk proteins: general and historical behaviour, em: Fox P. F., McSweeney P. L. H., (editores). **Advanced dairy chemistry**. 3rd edn. Proteins, Vol. 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York., 2003.

Fox, P. F., Brodkorb, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**., v. 18, p. 677– 684, 2008.

G

Gaiani, C., Ehrhardt, J. J., Scher, J., Hardy, J., Desobry, S., & Banon, S. Surface composition of dairy powders observed by X-ray photoelectron spectroscopy and effects on their rehydration properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 49, p. 71-78, 2006.

Gaiani, C., Scher, J., Ehrhardt, J. J., Linder, M., Schuck, P., Desobry, S. Relationships between dairy powder surface composition and wetting properties during storage: importance of residual lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6561-6567, 2007.

Gaiani, C., Schuck, P., Scher, J., Ehrhardt, J. J., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M. Native phosphocaseinate powder during storage: lipids released onto the surface. **Journal of Food Engineering**, v. 94, p. 130-134, 2009.

Gaiani, C., Mullet, M., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M.; Perroud, C., Renard A., Scher, J. Milk proteins differentiation and competitive adsorption during spray-drying. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 983 – 990, 2011.

Goudédranche H., Maubois J. L., Ducruet P., Mahaut M. Utilization of the new mineral UF membrane for making semi-hard cheeses. **Desalination**. v. 35, p. 243 – 258, 1980.

Graham, D. E., Phillips, M. C. J. Proteins at liquid interfaces :. Kinetics of adsorption and surface denaturation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 70, p. 403 – 414, 1979.

H

Ha E., Zemel, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal Nutritional and Biochemistry**, v.14, p. 251-258, 2003.

Haraguchi, F. K.; Abreu W. C.; De Paula, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Review of Nutrition**, v. 19, p. 479 - 488, 2006.

Hardas, N., Danviriyakul, S., Foley, J. L., Nawar, W. W., Chinachoti, P.. Accelerated stability studies of microencapsulated anhydrous milk fat. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 506 – 513, 2000.

Hayashi, H. Drying technologies of Foods: Their history and future. **Drying Technology**, v. 7, p. 315 - 369, 1989.

Holt, C. Structure and stability of casein micelles. **Advances in Protein Chemistry**, p. 63 – 151, 1992.

Holt C., De Kruif C.G., Tuinier R., Timmins P.A. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. **Colloids Surface A.**, v. 213, p. 275 – 284, 2003.

Horne, D. S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 171 – 77, 1998.

Horne, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 11, p. 148 – 53, 2006.

Horne, D. S. Casein micelle structure and stability, em: **Milk proteins: from expression to food**. Editado por Thompson A., Boland M., Singh H. Elsevier Inc. New Zealand, p. 133 – 162, 2009.

Hunter, J. R., Kilpatrick, P. K., Carbonell, R. G. Lysozyme adsorption at air/water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 137, p. 462 – 482, 1990.

I

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), 1997. **Compendium of chemical terminology**. Vol. 1994, 66, 1169. 2nd ed.

<http://www.iupac.org/goldbook/S06153.pdf>. 1997. Acessado em 02 abril de 2012.

Izmailova V. N. Structure formation and rheological properties of proteins and surface-active polymers of interfacial adsorption layers. **Program of Surface Membrane Science**; p. 141 –209, 1979.

J

Jeantet R., Schuck P., Famelart M.H., Maubois J.L., Intérêt de la nanofiltration dans la production de poudres de lactosérum déminéralisées, **Lait**, v. 76 , p. 283 – 301, 1996.

Jeantet, R.; Croguennec, T.; Mahaut, M.; Schuck, P.; Brulé, G.; **Les Produits Laitiers**. 2nd ed., Lavoisier, France, 2008.

Jones, D. B., Middelberg, A. P. J. Direct determination of the mechanical properties of an interfacially adsorbed protein film. **Chemistry Engeneering Science**, v. 57, p 1711 – 1722, 2002.

Jongh, H. H. J., Kusters, H. A., Kudryashova, E., Meinders, M. B. J., Trofimova, D., Wierenga, P. A. Protein adsorption at air-water interfaces: a combination of details. **Biopolymers**, v. 74, p. 131–135, 2004.

K

Kessler, H.G. Drying - Instantizing. In :**Food engineering and dairy technology** (Verlag A. Kessler, ed). Freising, Germany, p. 269 - 328, 1981.

Khattari Z., Ruschel Y., Wen H. Z., Fischer A., Fischer T. M. Compactification of a myelin mimetic Langmuir monolayer upon adsorption and unfolding of myelin basic protein. **Journal of Physics and Chemistry B**, v. 109, p. 3402 – 3407, 2005.

Kim, D. A., Cornec, M., Narsimhan, G. Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, p. 100 – 109, 2005.

Kim, E. H. J.. **Surface composition of industrial spray-dried dairy powders and its formation mechanisms**. PhD thesis, Department of Chemical and Material Engineering, University of Auckland, 2008.

Kinsella, J. E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. **CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 21, p. 197 – 262, 1984.

Kinsella, J. E., Whitehead, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food and Nutritional Research.**, v. 33, p. 343 - 437, 1989.

Knipschildt, M. E. Drying of milk and milk products. In: **Modern dairy technology. Advances in milk processing** (Robinson RK, ed). Elsevier, London, England, p. 131-234, 1986.

Kotsmar, C.; Kragel, J.; Kovalchuk, V. I.; Aksenenko, E. V.; Fainerman, V. B.; Miller, R. J. Dilation and Shear Rheology of Mixed β -Casein/Surfactant Adsorption Layers **Physic and Chemistry B**, v. 113, p. 103–113, 2009.

Kragel, J., Siegel, S., Miller, R., Born, M., Schano, K. H. Measurement of interfacial shear rheological properties: an apparatus. **Colloids Surfaces A**, v. 91, p. 169 – 180, 1994.

Kragel, J., Kretschmar, G., Li, J. B., Loglio, G., Miller, R., Mohwald, H. Surface rheology of monolayers. **Thin Solid Films**, v 284, p. 361 – 364, 1996.

Kraegel J., S., Derkatch R., Miller R. Interfacial shear rheology of protein–surfactant layers, **Advance Colloid Interface Science**. v. 144, p. 38 – 53, 2008.

Kudryashova E. V., Meinders M. B. J., Visser A. J. V. G., Van Hoek A., De Jongh H. H. J. Structure and dynamics of egg white ovalbumin adsorbed at the air/water interface. **European Biophysics Journal**, v. 32, p. 553 – 562, 2003.

L

Lakshmanan, M.; Dhathathreyan, A.; Miller, R. Synergy between Hofmeister effect and coupled water in proteins: Unusual dilational moduli of BSA at air/solution interface. **Colloids and Surfaces**, v. 324, p. 194 – 201, 2008.

Landström K., Alsins J., Bergenstahl, B. Competitive protein adsorption between bovine serum albumin and β -lactoglobulin during spray-drying. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 75 – 82, 2000.

Landström K., Arnebrant T., Alsins J., Bergenstahl, B. Competitive protein adsorption between β -casein and β -lactoglobulin during spray-drying: effect of calcium induced association. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 103 – 116, 2003.

Le Graët Y., Maubois J. L. Fabrication de fromages à pâte fraîche à partir de poudres de rétentat et de préfromage, **Lait**. Fr. p. 23 – 26, 1979.

Lucassen J., Van den Tempel M. Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface **Chemistry Engineering. Science**, v. 27, p. 1283 – 1291, 1972.

M

Madsen R. F., Bjerre P. Production of cheese base, **Nordeuropaeisk Mejeri Tidsskrift** p. 135 – 139, 1981.

Mahmoudi, N., Gaillard, C., Boué, F., Axelos, M. A. V., & Riaublanc, A. Self similar assemblies of globular whey proteins at the air-water interface: effect of the structure. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 345, p. 54 – 63, 2010.

Marchin S., Putaux J. L., Leonil J. Effets of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, 2007.

Marinova, K. G., Basheva, E. S., Nenova, B., Temelska, M., Mirarefi, A. Y., Campbell, B. Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: sodium caseinate and whey protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1864 – 1876, 2009.

Masters, K. **Spray drying**. 5th ed. England : Longman Scientific & Technical and John Wiley & Sons Inc. New York. P. 725, 1991.

Maubois J. L., Pierre A., Fauquant J., Piot M., Industrial fractionation of main whey proteins, **Bull. International Dairy Federation**, v. 212, p.154 – 159, 1987.

Maubois J.L., Fauquant J., Famelart M.H., Caussin F. Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives. Proceedings of the **3rd International Whey conference**, "The importance of whey and whey components in food and nutrition", Munich 2001.

McClements, D. J. Proteins stabilized emulsions. **Current Opinion in Colloids and Interface Sciences**, v. 9, p. 305 – 313, 2004.

Mezdour, S., Cuvelier, G., Cash, M. J., Michon, C. Surface rheological properties of hydroxypropyl cellulose at air–water interface. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 776 – 781, 2007.

Miller, R., Fainerman, V. B., Kragel, J., Loglio, G. Surface rheology of adsorbed surfactants and proteins. **Current Opinion in Colloid and Interface Sciences**. V. 2, p. 578 – 583, 1997.

Miller, R., Ferri, J. K., Javadi, A., Kragel, J., Mucic, N., Wüstneck, R. Rheology of interfacial layers. **Colloid Polymeres Science**, v. 288, p. 937 – 950, 2010.

Murray, B. S. Interfacial rheology of mixed food protein and surfactant adsorption layers with respect to emulsion and foam stability. In R. Miller, & D. Möbius (Eds.), **Proteins at liquid interfaces**. Amsterdam: Elsevier Science, p. 179 – 220, 1998.

Murray, B. S. Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 426 – 431, 2002.

Murray, B. S., Ettelaie, R. Foam stability: proteins and nanoparticles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 314 – 320, 2004.

Murray B. S. Rheological properties of protein films. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, p. 27 – 35, 2011.

Muthuselvi, L., Miller, R., Dhathathreyan, A. How does urea really denature myoglobin?. **Chemical Physics Letters**, v. 465, p. 126 – 130, 2008.

N

Nahringbauer, I. Dynamic surface tension of aqueous polymer solutions, I. Ethyl (hydroxyethyl) cellulose (BERMOCOLL cst-103). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 176, p. 318 – 328, 1995.

Nijdam, J. J., Langrish, T. A. G. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 919 – 925, 2006.

O

Okos, M. R., Narsimhan, G., Singh, R. K., Weitnauer, A. C. Food dehydration. In: **Handbook of food engineering** (heldman DR, Lund DB, eds). Dekker M, New York, 1992.

Onwulata, C. I., Konstance, R. P., Holsinger, V. H. Flow properties of encapsulated milk fat powders as affected by flow agent. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 1211 – 1215, 1996.

P

Patino, J. M. R., M. Rodriguez R. N., Carrera C. S. Dynamic Interfacial Rheology as a Tool for the Characterization of Whey Protein Isolates Gelation at the Oil-Water Interface. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v, 47, p. 3640 – 3648, 1999.

Pereira, L. G. C., Théodoly, O., Blanch, H. W., Radke, C. J. Dilatational rheology of BSA conformers at the air/water interface. **Langmuir**, v. 19, p 2349 - 2356 , 2003.

Perriman, A. W.; White, J. W. Kinetics of adsorption of lysozyme at the air_water interface and the role of protein charge. **Physica B**, p. 716 – 718, 2006.

Perez, A. A., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R., Rubiolo, A. C., Santiago, L. G. Milk whey proteins and xanthan gum interactions in solution and at the air–water interface: A rheokinetic study. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 81, p. 50 – 57, 2010.

Perez A. A., Carrera C., Patino J.M. R., Rubiolo A.C., Santiago L.G. Surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air–water interface saturation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 306 – 315, 2011.

Phillips, L. G., Whitehead, D. M., Kinsella, J. Structure and function properties of food proteins. **San Diego: Academic Press**, 1994.

Piazza, L., Gigli, J., Bulbarello, A. Rheological interfacial properties of espresso coffee foaming fractions. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 420 – 429, 2008.

Piazza, L., Durr-Auster, N., Gigli, J., Windhab, E. J., Fischer, P. Interfacial rheology of soy proteins – High methoxyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2125 – 2131, 2009

Pierre A., Fauquant J., Le Graët Y., Piot M., Maubois J.L., Préparation de phosphocaséinate natif par microfiltration sur membrane, **Lait**, v. 72, p. 461 – 474, 1992.

Pisecky, J. Technological advances in the production of spray dried milk. **Journal Society Dairy technology**, v. 38, p. 60-64, 1985.

Pisecky, J.. 20 years of instant whole milk powder. **Scandinavian Dairy Information**, v. 4, p. 74, 1990.

Proctor G. B, Hamdan S, Carpenter G. H, Wilde P. A statherin and calcium enriched layer at the air interface of human parotid saliva. **Biochem Journal**; v. 389,p. 111 – 116, 2005.

Q

Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker H. M., Baker, E. N., Jameson, G. B. Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin. **Biochemistry**, v 37, p. 14014 – 14023, 1998.

R

Ravera F., M. Ferrari, E. Santini, L. Liggieri. Influence of surface processes on the dilational viscoelasticity of surfactant solutions, **Advance Colloid Interface Science**, v, 117 p. 75 – 100, 2005.

Refstrup, E. **Recent advances in agglomeration during spray drying**. Niro Atomizer, Copenhaguen. Reprint N° S-351, from Zeitschrift für Lebensmitteltechnologie, 1992.

Regnault S., Thiebaud M., Dumay E., Cheftel J.C. Pressuration of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: effects on casein micelle size distribution. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 55 – 68, 2004.

Reis P., Holmberg K., Miller R., Kragel J., Grigoriev D. O., Leser M. E., Watzke H. J. Competition between lipases and monoglycerides at interfaces. **Langmuir**, v. 24, p. 7400 – 7407, 2008.

Roberts, S. A., Kellaway I. W., Taylor, K. M.G., Warburton, B., Peters, K. Combined surface pressure-interfacial shear rheology studies of the interaction of proteins with spread phospholipids monolayers at the air–water interface. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 300, p.48 – 55, 2005.

Rodríguez Patino, J. M., Carrera, C., & Rodríguez Niño, M. R. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, p. 95 -113, 2008.

Rowland S. J. The determination of nitrogen distribution of milk. **Journal Dairy Research**, v. 9, p. 42–46, 1969.

Rullier, B., Novales, B., Axelos, M. A. V. Effect of protein aggregates on foaming properties of b-lactoglobulin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 330, p. 96 – 102, 2008.

Russev, S. C., Arguirov, T. V. I., urkov, T. D. β -Casein adsorption kinetics on air–water and oil–water interfaces studied by ellipsometry. **Colloids and Surfaces B**, v. 19, p. 89 – 100, 2000.

S

Schmitt, C., Bovay, C., Frossard, P. Kinetics of Formation and Functional Properties of Conjugates Prepared by Dry-State Incubation of β -

Lactoglobulin/Acacia Gum Electrostatic Complexes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9089 – 9099, 2005.

Schuck P., Piot M., Méjean S., Fauquant J., Brulé G., Maubois J. L., Déshydratation des laits enrichis en caséine micellaire par microfiltration ; comparaison des propriétés des poudres obtenues avec celles d'une poudre de lait ultrapropre, **Lait** , v. 74 p. 47 – 63, 1994 a.

Schuck P., Piot M., Méjean S., Le Graët Y., Fauquant J., Brulé G., Maubois J. L., Déshydratation par atomisation de phosphocasinat natif obtenu par microfiltration sur membrane, **Lait** , v. 74 , p. 375–388, 1994 b.

Schuck, P., Briard, V., Mejean, S., Piot, M., Famelart, M. H., Maubois, J. L. Dehydration by desorption and by spray drying of dairy proteins: Influence of the mineral environment. **Drying Technology** v. 17, p. 1347 -1357, 1999.

Schuck, P. Spray drying of dairy products: state of the art. **Lait**, v. 82, p. 375 – 382, 2002.

Sgarbieri, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, p. 517, 1996.

Sgarbieri, V. C. **Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite**. **Rev. Nutr.**, v. 17, p. 397 - 409, 2004.

Singh, H., Interactions of milk proteins during the manufacture of milk powders. **Lait** , v. 87 p. 413 – 423, 2007.

Sloth, P. Hard-sphere fluids inside spherical, hard pores - grand canonical ensemble monte-carlo calculations and integral-equation approximations. **Journal of chemical physics**, v. 93, p. 1292 - 1298, 1990.

Sougnéz, M. L'évolution du séchage par atomisation. **Chimie Magazine**, , p. 1-4, 1983.

Steffe, J. F. **Rheological methods in food process engineering** (2nd ed.). USA: Freeman Press, 1996.

Swaisgood H. E. Chemistry of the caseins. In: P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), **Advanced Dairy Chemistry** (Vol. 1, 3rd edition, pp. 139–201). New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

T

Tamma, F., Sauer G., Scampicchio M., Drusch S. Pendant drop tensiometry for the evaluation of the foaming properties of milk-derived proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 371 – 377, 2012.

Torres, D.P.M. Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. Comportamento de sistemas aquosos mistos péptidospolissacarídeos. Braga: Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. (**Dissertação, Mestrado em Biotecnologia/ Engenharia de Bioprocessos**), p.118p, 2005.

Tratnig, A., Brenn, G., Strixner, T., Fankhauser, P., Laubacher, N., Stranzinger, M. Characterization of spray formation from emulsions by pressure-swirl atomizers for spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 126 – 134, 2009.

U

Ueno M. Colloidal and interfacial properties of lung surfactants : A comprehensive review of the different lipids and surface active proteins important to lung function. **Journal of Biological Chemistry**.. v. 27, p. 233 – 243, 2002.

V

Varesano, A., Tonin, C. Improving Electrical Performances of Wool Textiles: Synthesis of Conducting Polypyrrole on the Fiber Surface. **Textile Research Journal**, p. 1110 – 1115, 2008.

Vezy C., Hermanson K. D., Scheibel T., Bausch A. R. Interfacial rheological properties of recombinant spider-silk proteins. **Biointerphases**, v. 4, p. 43 – 46, 2009.

W

Walstra, P.; Wouters J. T. M.; Geurts, T. J.; **Dairy Science and Technology**. 2nd ed., Taylor & Francis Group, USA, 2006.

Walzem, R. L.; Dillard, C. J.; German, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 353 - 375, 2002.

Warburton, B. Interfacial rheology. **Current Opinion in Colloid Interface Science**. V. 1, p. 481 – 486, 1996.

Waugh, D. F., and P. H. Von Hippel. K-Casein and the stabilization of casein micelles. **Journal America Chemistry Society**, v. 78, 1956.

Waugh, D. F., Noble, R. W. Jr. Casein micelles. Formation and structure, II. **Journal America Chemistry Society**, v. 87, p. 22 – 46, 1965.

Waugh, D. F., B. Talbot. Equilibrium casein micelle systems. **Biochemistry**, v. 10, p. 4153 – 4162, 1971.

Westergaard, V. Milk powder technology. In: **Evaporation and spray drying**. 4 edn. Niro A/S, Copenhagen, Denmark, 1994.

Wierenga, P. A., Meinders, M. B. J., Egmond, M. R., Voragen, A. G. J., De Jongh, H. H. Protein exposed hydrophobicity reduces the kinetic barrier for adsorption of ovalbumin to the air-water interface. **Langmuir**, v. 19, p. 8964 – 8970, 2003.

Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, 73, 1965 – 79.

Wijmans C. M., Dickinson E. Simulation of interfacial shear and dilatational rheology of an adsorbed protein monolayer modeled as a network of spherical particles. **Langmuir** v. 14, p. 7278 – 7286, 1998.

Wilde, P. J. Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, p. 176–181, 2000.

Wilde, P., Mackie, A., Husband F., Gunning, P., Morris V. **Advance Colloid Interface Science**, v. 63, p. 108 – 109, 2004.

Wit J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 597 - 608, 1998.

X

Xu, S. Q., Damodaran, S. Comparative adsorption of native and denatured egg-white, human, and t(4)-phage lysozymes at the air-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 159, p. 124 – 133, 1993.

Z

Zhang, Z., Goff, H. D. Protein distribution at air interfaces in dairy foam and ice cream as affected by casein dissociation and emulsifiers. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 647 – 657, 2004.

Zinsly P. F., Sgarbieri V. C., Pereira Dias N. F. G., Jacobucci H. B., Pacheco M. T. B., Baldini V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazil Journal Food Technology**, v. 4, p. 1 – 8, 2001.