

Comportamento da β -caseína na interface água-óleo de emulsões alimentares

β -casein behavior at the water-oil interface in food emulsion

Clarice Navarro Barros*

José Alfredo Gomes Áreas**

* Mestre em Saúde Pública – Nutrição pela Universidade de São Paulo, professora do IMES – Universidade Municipal de São Caetano do Sul dos cursos de Farmácia e Nutrição.

** Professor titular doutor da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – Departamento de Nutrição.

RESUMO

O conhecimento dos determinantes da estruturação de alimentos, da forma como ingredientes funcionais colaboram na formação da estrutura supramolecular e a relação entre percepção da textura e a estrutura do alimento é fundamental para que se produzam alimentos de texturas adequadas a programas de intervenção nutricional que causem impacto na saúde pública. Neste trabalho, investigamos por RMN de ^1H a dinâmica da β -caseína na interface óleo-água de emulsões. Um sistema-modelo constituído por β -caseína, água e decano foi empregado, com substituição de cada componente por seu derivado

deuterado. Foram detectadas três principais populações de prótons, representando mobilidades moleculares muito menores que as dos componentes puros isolados. Pode-se dizer, analisando os resultados obtidos, que as emulsões restringiram a mobilidade molecular da água, lipídeo e proteína. A água, decano e β -caseína livres foram detectados nos sistemas emulsificados em quantidades muito pequenas.

Palavras-chave: ingredientes funcionais, RMN de ^1H , emulsões alimentares.

ABSTRACT

The knowledge of the way the supramolecular arrangements are built and structure is formed in the food processes, are of paramount importance for producing designed food with adequate structure and acceptability able to be used in malnutrition intervention programs that can impact public health. In this work, we investigated, by ^1H NMR, the dynamics of β -casein emulsions. A model system constituted by β -casein, water and decane was employed with replacement of each component by its deuterated

derivative. Three main proton populations were detected representing molecular motilities much lower than the individual pure component. It can be said from the results that the emulsions restrained the molecular mobility of water, lipid and protein. Free water, free decane and free β -casein were detected in the emulsified system in very low amounts.

Keywords: functional ingredients, ^1H NMR, food emulsions.

INTRODUÇÃO

A aceitação de produtos alimentares pelo consumidor está ligada de maneira bastante estreita à sua aparência e estrutura. Entender a relação entre percepção da textura e a estrutura do alimento é fundamental para que se produzam alimentos de texturas atrativas. ⁽¹⁾

Alguns autores defendem que a aceitabilidade no uso de uma substância como alimento depende de um conjunto de características detectadas pelos nossos órgãos dos sentidos como aparência, textura e "flavor". Apesar do consumidor se influenciar muito por fatores nutricionais, há fortes determinantes no consumo de alimentos: o sabor, a aparência e o preço. ⁽²⁾

Entende-se que, no futuro, a tecnologia de alimentos, no aperfeiçoamento de produtos alimentícios mais sofisticados, deverá orientar-se segundo duas direções: a elaboração de produtos mais atrativos e convenientes e também mais nutritivos e com apelo funcional. Assim, o desenvolvimento de processos tecnológicos deverá estar dirigido para a introdução de novas matérias-primas, para aproveitamento de subprodutos e produção de alimentos funcionais ou de alimentos mais nutritivos e atraentes, que possam ser utilizados por grande parte da população mundial. ⁽²⁾

Para isso, é necessária uma abordagem multidisciplinar, combinando técnicas sensoriais, estudos de fisiologia e determinações físico-químicas de propriedades de alimentos. ⁽¹⁾

Neste contexto, o conhecimento das propriedades funcionais de ingredientes de alimentos é útil para obtenção de produtos de grande aceitação, já que elas influenciam o caráter sensorial do alimento e serão determinantes de sua aceitabilidade. ^(3,4)

Nossa proposta foi analisar as propriedades da β -caseína, quando utilizada como emulsificante em sistemas alimentares, de modo a colaborar para o entendimento das mudanças que ocorrem durante o processamento de alimentos onde proteínas são utilizadas como emulsificantes, permitindo, assim, melhor controle da estrutura, manipulação e controle da textura. ⁽¹⁾

EMULSÕES

Os alimentos industrializados, em grande parte, são produzidos de maneira que seus componentes formam em água sistemas aparentemente com uma única fase, que constituem dispersões coloidais.

Dentre essas, as dispersões do tipo líquido-líquido, as emulsões, são de grande importância e freqüentemente observadas em alimentos de grande consumo. Os principais tipos de emulsões alimentares são chamadas óleo-em-água (ex.: leite, creme, massa de bolo, sorvete, mousse) e água-em-óleo (ex.: manteiga, margarina, maionese). ⁽⁵⁾

Emulsões são misturas de aparência homogênea, onde os componentes, quase sempre dois líquidos, são imiscíveis. Um deles se encontra na forma de pequenas partículas que estão

dispersas no segundo componente que está em uma fase contínua, o dispersante. ⁽⁶⁾

Estas misturas tendem a se desestabilizar já que, na maior parte dos casos, é necessário um grande aporte de energia para dispersar as partículas. Para que isso não ocorra, prejudicando a aparência do produto ou alguma etapa de processamento, são empregados os emulsificantes, substâncias que apresentam propriedades interfaciais importantes, como a de manter agregadas as duas fases da dispersão, impedindo o reagrupamento do material disperso. ^(6,7)

Os emulsificantes possuem grupos lipofílicos e hidrofílicos e, quando adicionados à uma dispersão coloidal, provocam diminuição na tensão interfacial pela sua adsorção na interface da mistura, projetando seus grupos hidrofílicos e lipofílicos para a fase em que cada um apresenta maior afinidade. Com a diminuição da tensão superficial, pode ocorrer aumento da área de contato entre a fase aquosa e a lipídica, melhorando a agregação dos componentes do sistema. ⁽⁵⁾

As proteínas, como a β -caseína, apresentam importante papel estabilizador, muito provavelmente por serem adsorvidas na interface. ^(8,9)

Pelas razões apresentadas, o estudo do comportamento desse tipo de proteína é fundamental para que se possa entender e melhorar algumas interações ocorridas em processos de fabricação de alimentos, principalmente os que levam à formação e estabilização de emulsões.

 β -CASEÍNA

Diversos estudos mostram que a β -caseína é uma proteína que possui perfil bastante adequado para emulsionar ingredientes de polaridades diferentes com muita eficiência. Faz parte do grupo das caseínas, que são uma família de fosfoproteínas produzidas nas glândulas mamárias, em resposta aos hormônios lactogênicos e outros estímulos. São secretadas como grandes agregados coloidais, com a estrutura de grandes micelas, que são responsáveis por muitas das propriedades físicas únicas do leite. ⁽¹⁰⁾

Suas estruturas terciárias ainda não foram determinadas, uma vez que, devido a suas características anfílicas, é impossível cristalizá-las para a difração de raios-X e seu peso molecular excede o limite de resolução das técnicas de ressonância magnética nuclear. Os modelos empregados até o presente são empíricos, baseados nas poucas informações estruturais disponíveis.

A notável seqüência de aminoácidos revela um segmento N-terminal (1-42) com elevada densidade de carga e bastante hidrofílico com quatro radicais fosfato esterificando resíduos de serina no segmento (15-19) e um quinto radical no resíduo 35. ^(6,11)

O restante do polipeptídeo é fortemente hidrofóbico, contendo elevada concentração de prolina, 35 resíduos ao longo da cadeia. Apesar destes resíduos de prolina

potencialmente inibirem a formação de estrutura secundária⁽¹²⁾, foram detectadas de 6-14% de estruturas α -hélice e 20-23% de folhas β na β -caseína, determinadas por espectroscopia raman, infravermelho e dicroísmo circular.⁽¹³⁾

Foi demonstrado por modelagem molecular que essa estrutura distendida era instável em meio aquoso, evoluindo em pouco tempo para uma forma enovelada, que se compactava ainda mais quando a β -caseína entrava no meio lipídico.⁽¹⁴⁾ Essa estrutura molecular, mesmo compacta, foi capaz de explicar a maioria dos dados experimentais descritos na literatura⁽¹⁵⁾ e respondia pelas propriedades anfífilas desta proteína. A presença dos resíduos serina fosforilados foi demonstrada como essencial para as propriedades interfaciais observadas, tanto em trabalhos experimentais,⁽¹⁶⁾ como por modelagem molecular.⁽¹⁷⁾

MATERIAL E MÉTODOS

A β -caseína foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, USA) e purificada em FPLC (Fast Polymer Liquid Chromatographic System – Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden), usando uma coluna Superdex 200, que resultou em produto livre de outras proteínas (não detectadas por SDS-PAGE). Todas as soluções preparadas para FPLC foram filtradas em sistema Millipore 0,45 μ m, usando membranas de acetato de celulose. Na injeção, foi usada membrana de diâmetro menor e de porosidade 0,22 μ m. As soluções também foram desgaseificadas antes da injeção, usando a técnica de ultrassonicação. A água utilizada para preparo das soluções e outros procedimentos necessários foi de alto grau de pureza, conseguido através da passagem da água destilada pelo sistema Milli-Q (Resistividade < 18m Ω .cm).

- A β -caseína deuterada foi obtida por tratamento da β -caseína com D₂O para troca dos prótons lábeis por deutério, em tubos de concentração de soluções de proteína (Amicon – Millipore) com membrana de corte de PM de 3000.
- O decano e o decano deuterado (99,5%) foram obtidos da Merck e utilizados sem purificação prévia.

COMPORTAMENTO DAS EMULSÕES ÁGUA/ÓLEO POR RMN

Emulsões foram preparadas com β -caseína, água ultra pura (MilliQ) e decano. Tais emulsões-modelo foram construídas com o objetivo de simular produtos alimentícios do tipo maionese. As proporções típicas utilizadas foram 1% β -caseína, 24,5% água e 74,5% decano. Foi adotada metodologia descrita na literatura,⁽¹⁸⁾ com adaptações para adequá-la ao sistema escolhido. O procedimento consistiu de dispersão da

β -caseína em água, em homogeneizador tipo Turrax (Marconi modelo TE-102 n° de série 892580) para pequenos volumes. Foi empregada a velocidade máxima do homogeneizador, em períodos de tempo variando entre cinco e dez minutos, sob refrigeração, adicionando-se então, de modo constante o decano (25 mL/min), até ser observada a inversão da emulsão, pela queda de corrente elétrica em voltímetro.

Essas emulsões foram então submetidas a RMN de prótons em equipamento Maran SFC (da Resonance Instruments – Inglaterra), utilizando-se de seqüência de pulsos CPMG^(19,20) e parâmetros ajustados até o completo decaimento do sinal.

Para o estudo da contribuição de cada componente do sistema, várias amostras foram preparadas exatamente nas mesmas condições e utilizando-se a mesma proporção de cada componente:

- *Amostra 1* – β -caseína, água MilliQ e decano, totalmente protonados.
- *Amostra 2* – β -caseína (previamente tratada com D₂O até substituição isotópica dos prótons lábeis), D₂O e decano.
- *Amostra 3* – β -caseína, água MilliQ e decano deuterado.
- *Amostra 4* – β -caseína (previamente tratada com D₂O até substituição isotópica dos prótons lábeis), D₂O e decano deuterado.

Além destas amostras, experimentos de CPMG foram realizados com água pura (MilliQ), decano puro e β -caseína (previamente tratada com D₂O até substituição isotópica dos prótons lábeis) em D₂O.

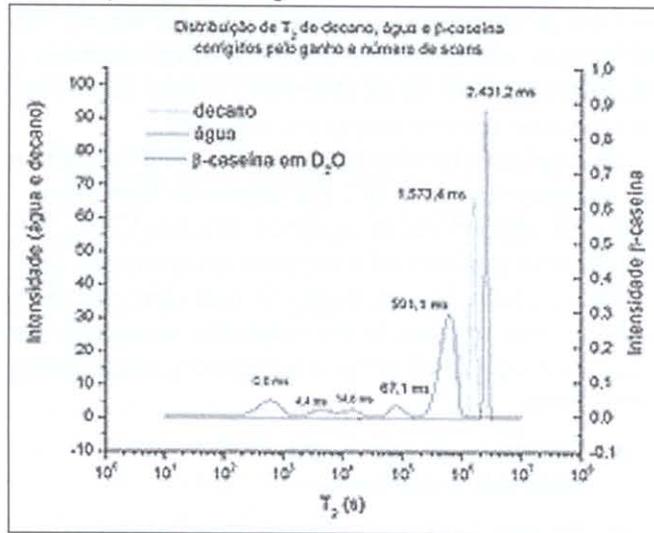
Em todos os casos, o ganho do receptor (RG) foi ajustado em função da intensidade do sinal, bem como o n° de repetições acumuladas (NS) foi determinado para o melhor sinal possível. O n° de pulsos de 180° (NECH) foi também ajustado para o decaimento total do sinal do eco. O intervalo entre os pulsos τ (comando TAU no espectrômetro) foi mantido o menor possível para eliminar os efeitos de difusão (100 – 150 μ s).

Os espectros CPMG obtidos foram submetidos a uma rotação de eixos de referência (comando ROT), e os valores de magnitude dos ecos foram tomados a cada n° par de ecos comandos (comandos MAG e EVEN, respectivamente). Esses espectros foram então processados pelo programa WinFit (Resonance Instruments, Oxford, 2002), que avalia o n° de componentes exponenciais discretos existentes no espectro e pelo programa WinDXP (Resonance Instruments, Oxford, 2002) que avalia o n° de exponenciais existentes no espectro de maneira contínua, criando um mapa de distribuição de populações de T₂ existentes na amostras.

A temperatura das amostras foi controlada e fixada em 20° C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1: Distribuição de T_2 para decano, água e β -caseína corrigidos pelo n° de scans e ganho.



Intensidade de sinal RMN x T_2

Foram efetuadas determinações de T_2 utilizando-se a seqüência CPMG para os componentes isolados, para então serem comparados aos sinais da emulsão. Submetendo-se alíquotas de componentes isolados da emulsão, foram obtidos os seguintes resultados, de acordo com a Distribuição de T_2 apresentada na Figura 1, corrigida pelo ganho e n° de scans.

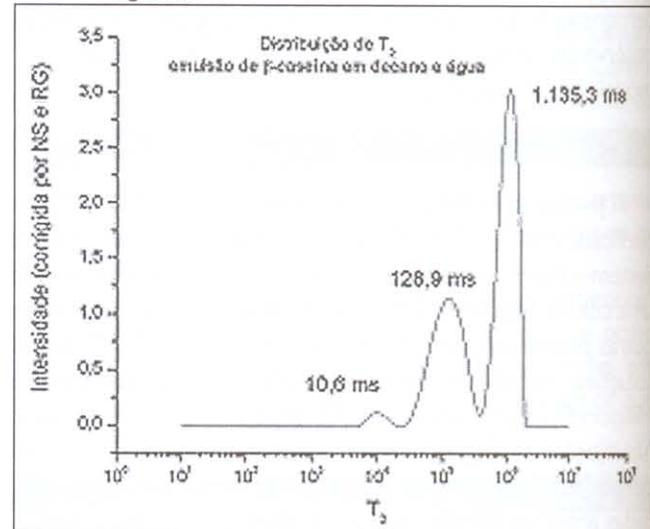
Água pura – como era esperado, apresentou praticamente uma única população de prótons, relaxando em média a 2.431 ms, sendo observadas contribuições de populações variando de um mínimo de 2.181 ms e um máximo pouco maior que T_2 médio = 2.431 ms.

Decano – apresentou também uma única população de prótons relaxando com T_2 médio de 1.573 ms, onde foram observadas contribuições de populações variando entre um mínimo de 1.266 ms e um máximo $T_2 = 1.754$ ms.

β -caseína – apresentou uma combinação de populações relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo estes os valores encontrados respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 0,6 ms com mínimo em 0,2 ms e máximo em 1,2ms; $T_{2(2)}$ médio = 4,4 ms com mínimo em 2,6 ms e máximo em 7,6 ms; $T_{2(3)}$ médio = 14,6 ms com mínimo em 8,5 ms e máximo em 22,6 ms; $T_{2(4)}$ médio = 67,1 ms com mínimo em 54 ms e máximo em 128,9 ms e população de prótons mais significativa com $T_{2(5)}$ médio = 591 ms com mínimo em 247,6 ms e máximo em 913,3 ms. Esses dados indicam a presença de cinco populações, provavelmente em razão da proteína se apresentar em diferentes graus de polimerização em solução preparada em pH neutro. (21,22,23,24)

Uma amostra de emulsão não deuterada (amostra 1) foi então submetida à espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Analisando-se os gráficos apresentados nas Figuras 1 e 2, comparando-se as populações de prótons em cada experimento, observa-se um comportamento diferente do verificado com os componentes isolados, sugerindo forte comprometimento dos constituintes na interface, já que as intensidades dos sinais para os T_2 encontrados mostram pequena disponibilidade de prótons na emulsão quando comparados a cada componente puro.

Figura 2: Distribuição de T_2 para amostra 1 corrigido pelo n° de scans e ganho.

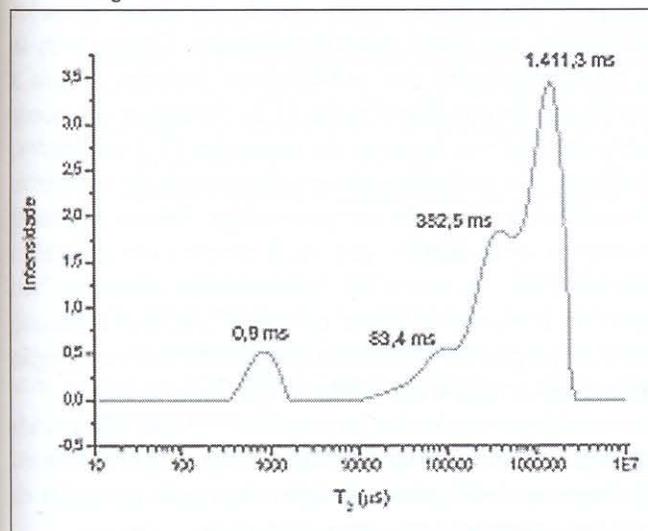


(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μ s

Em estudos anteriores,⁽²⁵⁾ foi observado que o comportamento da proteína, após as condições turbulentas da homogeneização, se altera e a estrutura dos agregados e submicelas formados através das interações hidrofóbicas entre os resíduos apolares também. Provavelmente esse grande aporte de energia possa dissociar os agregados em monômeros antes de ocorrer adsorção, alterando o perfil da proteína após a formação da emulsão. Também é conhecido que, através de um mecanismo de hidratação, as caseínas demonstram ter grande capacidade de acomodação de água no espaço interior de suas estruturas,⁽²⁶⁾ o que pode contribuir para não serem observados registros de água livre no sistema estudado. Os registros dessa amostra apresentaram uma combinação de três principais populações relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 10,6 ms, com mínimo em 6,1 ms e máximo em 18,2 ms $T_{2(2)}$ médio = 128,9 ms, com mínimo em 31,3 ms e máximo 382,5 ms e $T_{2(3)}$ médio = 1.135,5 ms, com mínimo em 382,5 ms e máximo em 1.754,3 ms. Provavelmente, as três populações verificadas (Fig.2) referem-se a diferentes arranjos dos três constituintes na interface da emulsão. Não sendo possível identificar cada componente nos registros apresentados, em razão da não

correspondência dos tempos de relaxação T_2 verificados nas determinações dos componentes puros, iniciou-se uma nova fase de determinações, com substituição um a um dos componentes da emulsão pelos seus derivados deuterados, para investigar mais profundamente o sistema.

Figura 3: Distribuição de T_2 para amostra 2 corrigida pelo n° de scans e ganho.

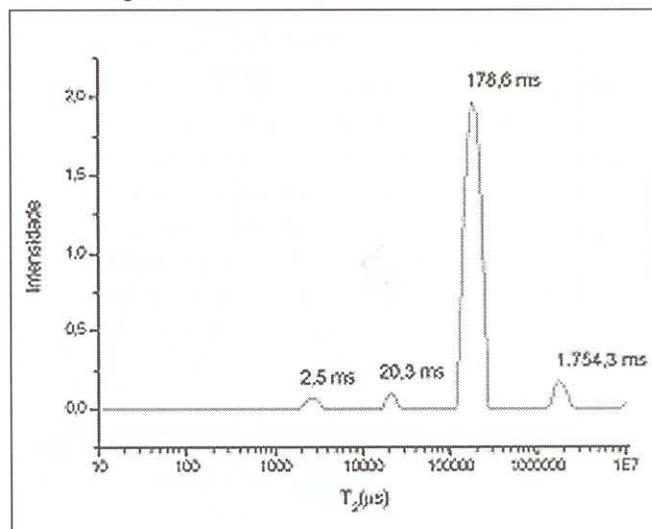


(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μ s

Deste modo, foi preparada uma nova emulsão (Amostra 2) utilizando-se β -caseína deuterada em D_2O e decano. Desta vez, foi submetida à espectroscopia (Fig. 3) uma alíquota de emulsão, não se esperando contribuição de prótons da água, pelo uso de água deuterada e pelo fato dos prótons lábeis da caseína terem sido trocados por deutério anteriormente à preparação da emulsão. Este experimento foi realizado com o objetivo de observar sinais de ressonância, somente dos prótons não lábeis da proteína e dos prótons provenientes do decano não deuterado. Possivelmente o primeiro pico (Fig. 3) está relacionado com uma fração de β -caseína não adsorvida, já que no processo de homogeneização há quebra dos grandes agregados e há uma considerável preferência na adsorção de grandes partículas protéicas. (27) Os outros podem estar relacionados a uma combinação de populações de prótons provenientes de proteína e decano interagindo na interface da emulsão. Não é observado registro para prótons da água, em virtude de ter sido usado D_2O .

Uma terceira amostra foi preparada, utilizando-se β -caseína em H_2O e decano deuterado. Esta, foi submetida à espectroscopia (Fig4) uma alíquota de emulsão, não sendo esperada a contribuição de prótons do decano neste experimento. Este experimento foi realizado com o objetivo de observar sinais de ressonância somente dos prótons da proteína e dos prótons provenientes da água.

Figura 4: Distribuição de T_2 para amostra 3 corrigida pelo n° de scans e ganho.



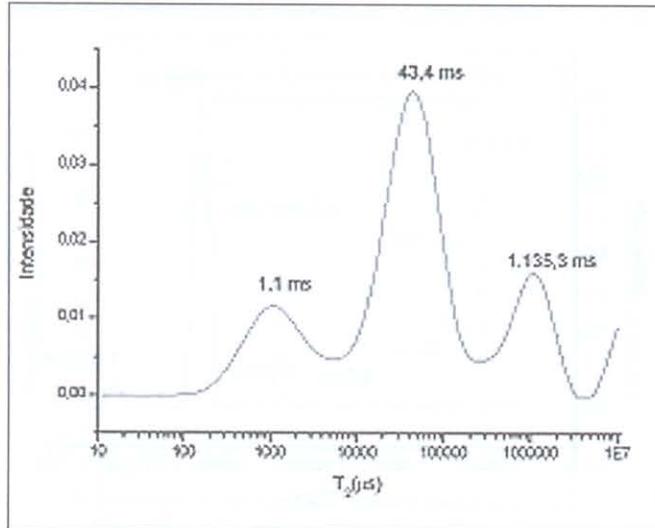
(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μ s

O espectro gerado para a amostra apresentou quatro populações de prótons relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo, respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 2,6 ms, com mínimo em 2,1 ms e máximo em 3,6 ms; $T_{2(2)}$ médio = 20,3 ms, com mínimo em 18,2 ms e máximo em 25,2 ms; $T_{2(3)}$ médio = 178,6 ms, com mínimo em 128,9 ms e máximo em 247,6 ms, sendo o grande contribuinte, $T_{2(4)}$ médio = 1.754,3 ms com mínimo em 1.411,3 ms e máximo em 2.431,2 ms. Os dados encontrados sugerem picos para um tipo de água, muito comprometida com os demais componentes e com a mobilidade muito mais restrita, já que os valores de T_2 encontrados são bem menores que os observados no espectro da água pura. Quanto maiores os valores de T_2 , as espécies apresentam-se mais livres, com movimento menos restrito. (28)

A quarta emulsão foi preparada, β -caseína deuterada em D_2O e decano deuterado. Desta vez foi submetida à espectroscopia (Fig. 5) uma alíquota de emulsão, não se esperando contribuição de prótons para os outros componentes deuterados neste experimento.

Este experimento foi realizado com o objetivo de observarem sinais de ressonância, somente dos prótons não lábeis da proteína e o espectro gerado para a amostra apresentou três populações de prótons relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo estes os valores encontrados respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 1,1 ms com mínimo em 0,15 ms e máximo ao redor de 4 ms; $T_{2(2)}$ médio = 43,4 ms com mínimo em 8,5 ms e máximo em 247,6 ms; $T_{2(3)}$ médio = 1.135,32 ms com mínimo em 247,6 ms e máximo em 3.022,1 ms. As duas grandes contribuições se referem às populações detectadas nos picos 2 e 3).

Figura 5: Distribuição de T_2 para amostra 4 corrigida pelo n° de scans e ganho.

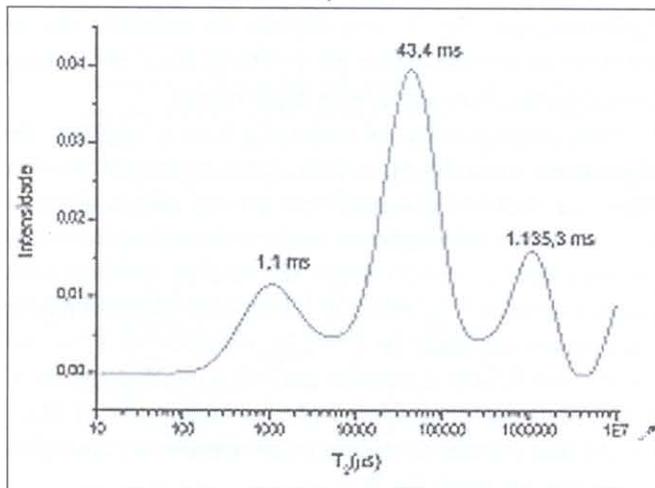


(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μs

Esses registros nos mostram três populações de prótons da proteína, sendo que a população do terceiro pico (Fig. 5), apresenta-se com mobilidade superior quando comparada à proteína pura (Fig. 1). Alguns trabalhos relatam ⁽²⁹⁾ que o equilíbrio da composição interfacial é alcançado porque a flexibilidade e mobilidade de moléculas da proteína permitem rápido intercâmbio entre a solução e a interface.

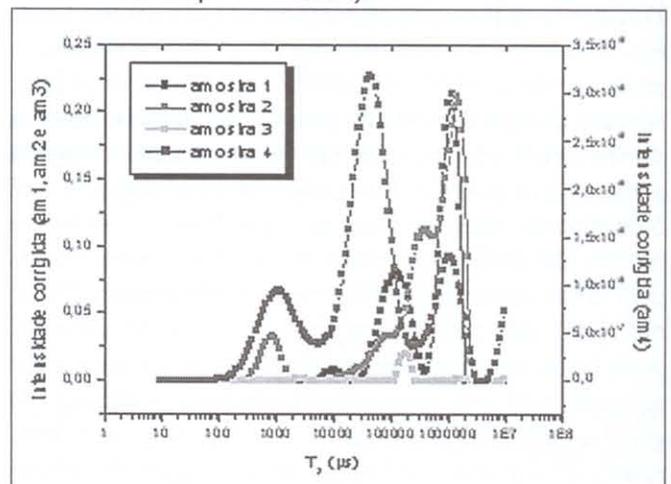
Os espectros das quatro amostras foram então sobrepostos na mesma escala (Figura 6), para se avaliar o comportamento dos constituintes segundo outra ótica. Confrontando os dados, o último pico revela um T_2 da ordem de $1,5 \times 10^6 \mu s$, relacionado provavelmente a populações de prótons envolvidas na interface da emulsão. A última amostra, onde se observam somente sinais para prótons não lábeis da proteína, apresenta sinal de intensidade muito pequena em virtude da pequena concentração de proteína utilizada.

Figura 6: Distribuição de T_2 para as amostras 1, 2, 3 e 4 corrigidas pelo n° de scans, ganho e contribuição de prótons (todos os valores na mesma escala).



Os espectros das três primeiras amostras foram sobrepostos na mesma escala e da quarta amostra em escala diferente (Figura 7), para se observar os tempos de relaxação do último espectro e compará-lo aos demais. É interessante observar que, apesar de muito menor intensidade, o T_2 observado para o último pico também se localiza na mesma região das emulsões anteriores ($1,5 \times 10^6 \mu s$). Isso nos revela um perfil de comportamento semelhante para as emulsões produzidas, nos quatro casos apresentados. Comparando-se o comportamento dos constituintes isolados e após a construção das emulsões (Figuras 1 e 2), observa-se uma queda considerável nos tempos de relaxação (T_2) verificados, indicando que todos sofreram uma acomodação no sistema, estando profundamente comprometidos. Relatos anteriores mostram uma distribuição da β -caseína em emulsões semelhantes, na forma de monocamada altamente não uniforme composta de "trains" e "loops" (75/80% da molécula), com uma região hidrofóbica bem presa à interface e uma região altamente carregada bem distante (20-25% da cadeia). ^(30,22) Por modelagem molecular, foi proposto ^(14,17) que, após entrada da proteína no meio lipídico, quatro dos cinco resíduos de fosfoserinas, localizados na região altamente carregada da molécula, permanecem presos à interface.

Figura 7: Distribuição de T_2 para as amostras 1, 2, 3 e 4 corrigidas pelo n° de scans, ganho e contribuição de prótons (com escala diferente para a amostra 4).



A análise dos espectros gerados para as amostras sugere que não deve existir quantidade apreciável de nenhum dos componentes envolvidos, na forma livre. Comparando-se cada espectro com os registros obtidos dos componentes isolados (Fig. 1) não se verificam os tempos de relaxação correspondentes. Esses dados podem sugerir, que a pequena concentração de proteína utilizada para construir as emulsões é responsável pela agregação de todo o material lipídico e aquoso do meio. Isso porque a eficiente combinação entre

estruturas rígidas e flexíveis dessa molécula favorece alta hidratação pela acomodação de grandes quantidades de água no interior das estruturas de caseína. ⁽²⁶⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Comparando-se os espectros dos componentes isolados, com o da amostra deuterada, cujo único sinal de RMN corresponde ao componente avaliado, observa-se significativa redução no tempo de relaxação T_2 e na intensidade do sinal, o que demonstra menor mobilidade do componente e contribuição de prótons presentes menor do que seria esperado se o comportamento fosse semelhante ao componente puro.
- Pode-se concluir que nos sistemas emulsionados nas proporções estudadas não deve restar água, proteína ou componente apolar (decano) livres, já que não foram observados os valores característicos de T_2 , obtidos nos componentes isolados.
- Os valores de T_2 obtidos por ressonância magnética nuclear de prótons foram úteis para a descrição das emulsões, permitindo uma avaliação da estruturação observada. Nas proporções estudadas, todas as

amostras avaliadas apresentam uma população de prótons bem definida, relaxando em um T_2 médio aproximado de $1,5 \times 10^6$.

- A análise de multicomponentes realizada nos espectros de T_2 obtidos por CPMG permite uma determinação dos vários contribuintes na emulsão podendo se constituir numa ferramenta quantitativa de avaliação de emulsões. Determinações consecutivas de amostras com componentes substituídos um a um por seus derivados deuterados, permite a avaliação do comportamento isolado do componente em questão, influenciado pelo sistema como um todo.

Essa restrição de mobilidade observada pode ser correlacionada com outras propriedades de emulsões obtidas por outros métodos (reologia, microscopia, turbidimetria) e aceitas como indicadores de qualidade para se ter uma avaliação alternativa da qualidade de emulsões de maneira não destrutiva. Em futuros estudos deve-se contemplar uma abordagem multidisciplinar, combinando técnicas de RMN com análise sensorial, medidas reológicas para se avaliar mais precisamente quais as características que afetam a textura e a aceitação de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilkinson, C.; Dijksterhuis, G. B.; Minekus, M. from food structure to texture. *trends food sci technol*, 2000; 11: 442-50.
2. Gava, A. J. *Princípios de Tecnologia de Alimentos*. 1. edição. São Paulo: Nobel, 1999.
3. Sgarbieri, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. *Bol SBCTA*, 1998 jan/ago; 32: 105-26.
4. Borderías, A. J.; Monteiro P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. *Rev. Agroq. Technol. Alim.*, 1988, 28: 158-69.
5. Bobbio, P. A.; Bobbio F. O. *Química do processamento de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995.
6. Cheftel, J. C.; Cuq J. L.; Lorient; D. *Proteínas alimentarias*. 1. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1989.
7. Arêas, J. A. G.; Gröbner, G. J.; Pellacani, L. B.; Glaubitz C. Watts A. Use of solid state ^2H NMR for studying protein lipid interactions at emulsions interfaces. *Magn Reson Chem*, 1997; 35: 119-24.
8. Srinivasan, M.; Singh, H. Munro, P. A. Adsorption behavior of sodium and calcium caseinates in oil-in-water emulsions. *Int Dairy J*. 1999; 9: 337-41.
9. Fang, Y.; Dalgleish, D. G. Structures and properties of vesicles formed from phospholipids and caseins. *Food Res Int*, 1996; 29: 201-6.
10. Ginger, M. R.; Grigor, M. R. Review: comparative aspects of milk caseins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1999 jan; 124(Pt B): 133-45.
11. Dickinson, E.; Rolfe, S. E. ; Dalgleish, D. G. Competitive adsorption of αs_1 -casein and β -casein in oil-in-water emulsion. *Food Hydrocoll*, 1988; 2: 397-405.
12. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Editora Savier, 1995.
13. Kumosinski, T. F.; Brown E. M.; Farrell, H. M. Jr. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: na energy-minimized β -casein structure. *J. Dairy Sci*, 1993; 76: 931-45.
14. Cassiano, M. M.; Arêas, J. A. G. Study of β -casein at water-lipid interface by molecular modeling. *J mol structure [THEOCHEM]*, 2000; 539: 279-88.
15. Murphy, J. M.; Fox, P. F. Functional properties of alfa, kappa or beta-rich casein fraction. *Food Chem*, 1991; 39: 211-28.
16. Sood, S. M.; Slattery, C. W. Association of the quadruply phosphorylated β -casein from human milk with the nonphosphorylated form. *J. Dairy Sci*, 2000; 83: 2766-2770.
17. Cassiano, M. M.; Arêas J. A. G. Dependence of the interfacial behavior of β -casein on phosphoserine residues. *J. Dairy Sci*, 2003; 86: 3876-80.
18. Furtado, M. A. M; Gomes, J. C.; Silva, C. A. S., Omellas, C. B. D.; Silvestre, M. P. C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. *Ciênc. Agrot. (Lavras)*, 2001; 25: 625-39.
19. Carr, H. Y.; Purcell, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys Rev*. 1954; 94: 630-8.
20. Meiboom, S.; Gill, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum*, 1958; 29: 688-91.
21. Swaisgood, H. E. Symposium: Genetic perspectives on milk proteins. Comparative studies and nomenclature [Review and update of casein chemistry]. *J. Dairy Sci*, 1993; 10: 3054-61.
22. Leclerc, E.; Calmettes, P. Interactions in micellar solutions of β -casein. *Phys Rev Letters*, 1997; 78: 150-153.
23. Casanova, H.; Dickinson, E. Rheology and flocculation of oil-in-water emulsions made mixtures of αs_1 -casein + β -casein. *J. Colloid Interface Sci*, 1998; 207: 82-9.
24. Srinivasan, M.; Singh, H.; Munro, P. A. Influence of retorting (121°C for 15 min), before or after emulsification, on the properties of calcium caseinate oil-in-water emulsions. *Food Chem*, 2003; 80: 61-69.
25. Qi, P. X.; Brown, E. M.; Farrell, Jr. H. M. New views on structure-function relationships in milk proteins. *Trends Food Sci Technol*, 2001; 12: 339-346.
26. Hore, P. J. *Nuclear magnetic resonance*. 1. ed. Oxford (Great Britain): Oxford Science Publications, 1996.
27. Courthaudon, J. L. ; Dickinson, E. Competitive adsorption of lecithin an β -casein in oil in water emulsions. *J. Agric Food Chem*, 1991; 39, 1365-8.
28. Dickinson, E. Protein-stabilized emulsions. *J. Food Eng*, 1994; 22: 59-74.