



UNIVERSIDADE
E D U A R D O
MONDLANE

Faculdade de Engenharia

Departamento de Engenharia Química

Licenciatura em Engenharia Química

RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA

**ESTUDO DO EFEITO DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA E PARCIAL DAS
PROTEÍNAS DO LEITE DE COCO (*Cocos nucifera* L.) NA ESTABILIDADE FÍSICA
DA EMULSÃO**

Autor:

Edson Elias Paulino Matsimbe

Supervisor:

Prof. Doutor Borges Chambal, Eng^o.

Maputo, Abril de 2024



UNIVERSIDADE
E D U A R D O
MONDLANE

Faculdade de Engenharia

Departamento de Engenharia Química

Licenciatura em Engenharia Química

RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA

**ESTUDO DO EFEITO DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA E PARCIAL DAS
PROTEÍNAS NA ESTABILIDADE FÍSICA DA EMULSÃO DO LEITE DE COCO
(*Cocus nucífera L.*)**

Autor:

Edson Elias Paulino Matsimbe

Supervisor:

Prof. Doutor Borges Chambal, Eng.º

Maputo, Abril de 2024

TERMO DE ENTREGA DO RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA

Declaro que o estudante Edson Elias Paulino Matsimbe entregou no dia ____/____/20____ as ____ cópias do relatório do seu Trabalho de Licenciatura intitulado:

Estudo do efeito da desnaturação térmica e parcial das proteínas do leite de coco (*Cocus nucifera L.*) na estabilidade física da emulsão

Maputo, ____ de _____ de 20____

O(a) Chefe de Secretaria

DECLARAÇÃO SOB PALAVRA DE HONRA

Eu, Edson Elias Paulino Matsimbe, declaro por minha honra que o presente trabalho foi realizado inteiramente por mim, no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade Eduardo Mondlane, no âmbito da conclusão do curso de Licenciatura em Engenharia Química.

Maputo, _____ de _____ de 20____

(Edson Elias Paulino Matsimbe)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família,
o meu pilar e inspiração.*

*Olhai para as aves do céu, que nem semeiam, nem regam, nem ajuntam em celeiros; e
vosso Pai celestial as alimenta. Não tendes vós muito mais valor do que elas?
(Mateus 6:26)*

AGRADECIMENTOS

Quero em primeiro lugar agradecer a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade única de trilhar este caminho repleto de sonhos realizados e desafios que possibilitaram o meu crescimento pessoal e profissional.

O meu especial agradecimento vai para o meu maior suporte, a minha família. À minha avó, Luísa Buvane, pela sua incansável luta para transmitir-nos os mais importantes valores da vida, a integridade, empatia e persistência na luta pelos nossos sonhos. À minha mãe, Joana Buvane, pela confiança e suporte em todos os momentos desta caminhada. À minha irmã, primeira mentora e professora, Nércia Ulemba, pelos maiores e mais importantes ensinamentos que carrego comigo, que Deus a tenha. À minha irmã, Neidy Milisse, pelo companheirismo, amizade, suporte e extrema confiança para comigo. Aos meus dois irmãos, Milton e David, pelo suporte e paciência. Aos tios David e Orlando, pelo enorme e incondicional apoio. Ao meu primo, Adriano, pelo companheirismo. À tia Hortência, pela disponibilidade e abertura demonstrada para fornecer-me os cocos usados para a materialização do presente trabalho.

Ao supervisor, Prof. Doutor Eng.º Borges Chambal, por ter acreditado em mim, pelo suporte, partilha de conhecimentos e experiências durante as longas conversas, paciência, rigorosidade e por se mostrar sempre aberto para clarificar qualquer dúvida. Às Engenheiras Cândida, Asmina, Virgínia e Nazira, pelo suporte e compreensão para comigo durante a realização dos testes laboratoriais. De igual modo, ao técnico Adércio, pela abertura demonstrada durante a construção da prensa. À turma de Engenharia Química 2018, pelos bons momentos compartilhados e batalhas enfrentadas. Em especial ao Cândido António, Lile Ndzevo e Raúl Raposo, pelo carinho e suporte. À Chaquila Semente, pelo suporte durante a realização dos testes laboratoriais e pela transmissão de boas energias em momentos de tensão.

À Stela Dirce e Mirson Semente, pelo companheirismo, amizade, boas energias, momentos de alegria e paz proporcionados, serei eternamente grato.

E por último e não menos importante, à todos os que directa ou indirectamente apoiaram-me e contribuíram para a materialização deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

O leite de coco é uma emulsão de óleo-em-água estabilizada pelas suas proteínas naturais (globulinas e albuminas). Devido a baixa capacidade emulsificante de suas proteínas, esta emulsão rapidamente separa-se em uma camada cremosa e outra aquosa relativamente densa. Com a separação, o leite adquire uma aparência que leva a insatisfação dos consumidores, pois estes esperam ver um produto com um aspecto homogêneo, de tal modo que a indústria recorre ao uso de estabilizantes externos para contornar o problema. Entretanto, a adição dos estabilizantes não só implica custos adicionais de processamento (de aproximadamente \$10/kg de estabilizante), como também pode causar problemas de saúde nos consumidores (inflamação gastrointestinal, por exemplo) e, nalguns casos, observa-se a ineficiência deste método em garantir a estabilização completa. Estudos recentes indicam que a desnaturação térmica controlada pode melhorar a estabilidade cinética pela formação de uma rede tridimensional de gotículas, que prendem a fase contínua no seu interior. É neste sentido que o presente trabalho procura estudar o efeito da desnaturação térmica e parcial das proteínas na estabilidade física da emulsão do leite de coco, pelo tratamento térmico das amostras de leite a diferentes temperaturas de aquecimento (40 a 120 °C, com incrementos de 10 °C por tratamento durante 30 minutos) seguida da estimativa do intervalo de desnaturação pelo método de *CBB-G250 binding*, análise do efeito da desnaturação parcial na taxa de floculação pela observação microscópica, na coalescência pela análise das imagens microscópicas com o auxílio do *software IC Measure*, no índice de sedimentação e na microestrutura da emulsão. Com base nos resultados obtidos, constatou-se que as proteínas do leite de coco (53,36% de humidade, 34,73% de lípidos e 4,62% de proteínas) apresentam um intervalo de desnaturação com início entre 70 e 80 °C e término entre 110 e 120 °C; o aumento da taxa de desnaturação causa a diminuição da extensão de separação de fases (19,83% a 100 °C), ligeira coalescência (aumento em 1,5 µm a 90 °C) e o aumento na taxa de floculação, o que levou a formação de uma rede tridimensional de gotículas ou flóculos interconectados (emulsão-gel particulada).

Palavras-chave: leite de coco, proteínas, estabilidade da emulsão, desnaturação parcial, capacidade emulsificante.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Formulação do problema.....	1
1.2. Objectivos.....	2
1.2.1. Objectivo geral	2
1.2.2. Objectivos específicos	2
1.3. Justificativa	3
1.4. Metodologia	4
1.4.1. Pesquisa bibliográfica	4
1.4.2. Análise laboratorial	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Cultura do coqueiro	5
2.1.1. Origem e distribuição geográfica	5
2.1.2. Classificação taxonómica	5
2.1.3. Variedades.....	5
2.1.4. Morfologia do coco.....	6
2.1.5. Produção mundial do coco	7
2.2. Leite de Coco	8
2.2.1. Propriedades químicas do leite de coco e sua comparação com o leite de vaca	8
2.3. Proteínas	10
2.3.1. Classificação de Osborne	10
2.3.2. Estrutura das proteínas.....	11
2.4. Desnaturação das proteínas	12
2.4.1. Desnaturação térmica.....	12
2.5. Emulsão	14
2.5.1. Estabilidade de emulsões	14
2.5.2. Distribuição do tamanho das gotículas de óleo de emulsões	16

2.5.3.	Mecanismos de instabilidade.....	17
2.5.4.	Transição de fases em sistemas coloidais: interacções atractivas	20
2.5.5.	Géis.....	21
2.6.	Tratamento térmico	21
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1.	Matéria-prima.....	23
3.2.	Substâncias, equipamentos e instrumentos usados	23
3.3.	Métodos.....	24
3.3.1.	Extracção do leite	25
3.3.2.	Determinação das propriedades físico-químicas iniciais do leite de coco	26
3.3.3.	Determinação da variação absorvância da proteína do soro com a temperatura de aquecimento: adaptação do método CBB-G250 <i>binding</i>	27
3.3.4.	Observação da microestrutura das emulsões.....	28
3.3.5.	Determinação da distribuição do tamanho das gotículas de óleo.....	29
3.3.6.	Determinação do índice de sedimentação.....	30
3.3.7.	Determinação da viscosidade aparente.....	30
3.3.8.	Análise de dados	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1.	Extracção do leite de coco	33
4.2.	Caracterização físico-química do leite de coco fresco.....	33
4.2.1.	Distribuição do tamanho de gotículas de óleo do leite de coco	34
4.3.	Determinação da variação da absorvância da proteína do soro com a temperatura de aquecimento: método de CBB-G250 <i>binding</i>	36
4.3.1.	Efeito da centrifugação na absorvância das amostras submetidas ao tratamento térmico	38
4.4.	Mecanismos de instabilidade da emulsão	40
4.4.1.	Floculação	40
4.4.2.	Coalescência	42

4.4.3. Índice de sedimentação	44
4.5. Efeito do aquecimento na viscosidade da emulsão.....	46
4.6. Mudanças na microestrutura da emulsão do leite de coco.....	47
5. CONCLUSÕES.....	48
6. RECOMENDAÇÕES	49
7. BIBLIOGRAFIA	50
7.1. Referência bibliográfica	50
7.2. Outra bibliografia consultada.....	56

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

A/O	Emulsão do tipo água em óleo
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BSA	<i>Borum Serum Albumin</i>
CBB G-250	<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>
CI	Índice de sedimentação (do inglês <i>Creaming Index</i>)
$d_{1,0}$ [μm]	Diâmetro médio numérico
$d_{4,3}$ [μm]	Diâmetro médio ponderado pelo volume
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization: Statistical Databases</i>
O/A	Emulsão do tipo óleo em água
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
UHT	<i>Ultra High Treatment</i>
η_0	Viscosidade da fase contínua
v_{stokes}	Velocidade terminal de Stokes
ρ	Densidade da fase contínua (Lei de Stokes)
ρ_0	Densidade da esfera rígida (Lei de Stokes)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Composição morfológica do coco.....	7
Figura 2: Distribuição da produção mundial de cocos por países.	7
Figura 3: Processo da desnaturação proteica.	12
Figura 4: Transição do estado nativo para o desnaturado em função do <i>stress</i> aplicado.....	13
Figura 5: Diagrama de estabilidade termodinâmica e cinética de uma emulsão genérica	15
Figura 6: Estabilização de uma emulsão pela acção de um emulsificante.	15
Figura 7: Separação da emulsão do leite de coco em creme e soro.....	17
Figura 8: Mecanismos de instabilidade de emulsões do tipo O/A.....	18
Figura 9: Diagrama de fases da temperatura em função da fracção volumétrica da fase dispersa.....	20
Figura 10: Fluxograma das actividades laboratoriais e análise dos dados.....	24
Figura 11: Fluxograma da operação de extracção do leite de coco.	25
Figura 12: Sistema <i>Soxhlet</i> usado para a extracção de lípidos.	27
Figura 13: Tratamento térmico do leite de coco em banho-maria.	28
Figura 14: Interface do <i>software</i> IC Measure.....	29
Figura 15: Tubos de ensaio contendo amostras de leite submetidas a diferentes níveis de aquecimento, 24 horas depois do aquecimento.	30
Figura 16: Processo cooperativo da desnaturação proteica.....	32
Figura 17: Distribuição do diâmetro primário das gotículas de óleo da emulsão do leite de coco fresco.	35
Figura 18: Imagens microscópicas das emulsões do leite de coco e de vaca, obtidas pela objectiva 10x.....	35
Figura 19: Leite de coco depois da centrifugação, separado nas camadas de creme, soro e proteína precipitada	36
Figura 20: Variação da absorbância das proteínas do soro com o aumento da temperatura de aquecimento e pela centrifugação a 3790 rpm.....	37
Figura 21: Variação da energia livre de Gibbs com a temperatura de aquecimento do soro.	39
Figura 22: Variação das fracções de proteínas desnaturadas com a temperatura de aquecimento.....	40

Figura 23: Imagens microscópicas do leite de coco fresco e aquecido a 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C.....	41
Figura 24: Pontes de flocculação entre as gotículas de óleo. A imagem foi obtida pela objectiva de 100x.....	42
Figura 25: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo de amostras de leite de coco submetidas a diferentes temperaturas de aquecimento.	43
Figura 26: Variação do índice de sedimentação da emulsão do leite de coco com o aumento da temperatura aquecimento e tempo de incubação.....	45
Figura 27: Efeito do aquecimento na viscosidade do leite de coco, à uma taxa de cisalhamento de 1194 s ⁻¹	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais características agronómicas dos grupos varietais do coqueiro.	6
Tabela 2: Composição química do leite de coco reportada por alguns autores.....	9
Tabela 3: Descrição das estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas.....	11
Tabela 4: Diferentes formas de expressar a média do diâmetro das gotículas de emulsões.	17
Tabela 5: Condições operacionais do tratamento térmico de diferentes variedades de leite vegetal.	22
Tabela 6: Substâncias, materiais, equipamentos, instrumentos usados durante a realização dos ensaios.	23
Tabela 7: Características físico-químicas do leite de coco.	34
Tabela 8: Variação do tamanho médio das gotículas com o aumento da temperatura de aquecimento.	44

1. INTRODUÇÃO

O leite de coco é essencialmente uma emulsão de óleo-em-água, estabilizada pelas suas proteínas naturais (Birose et al., 1963), através da protecção das gotículas da emulsão contra a floculação, coalescência e sedimentação (Hamad, 2011).

A emulsão do leite de coco tem sido amplamente usada como ingrediente na cozinha, por dar um aspecto cremoso e um aroma único aos alimentos (Tangsuphoom e Coupland, 2008a). Paralelamente é também a via usada na indústria para a produção de óleo virgem, pelo processamento a húmido do coco, no qual a desestabilização da emulsão é necessária (Patil e Benjakul, 2017).

O tratamento térmico é uma etapa essencial no processamento do leite de coco. Este tratamento tenciona prolongar o tempo de prateleira pela redução da carga microbiana e, por conseguinte, a minimização do risco de degradação e consequente intoxicação do consumidor (Qian et al., 2017).

Dependendo das condições do processo, o tratamento térmico a temperaturas iguais ou superiores a 80 °C, pode causar a desnaturação irreversível das proteínas do leite de coco. Estas mudanças a nível molecular podem ter um impacto nas propriedades funcionais das proteínas, que nalgumas vezes são desejáveis e noutras indesejáveis (Raikos, 2009), isto é, podem promover a estabilidade ou instabilidade da emulsão e mudanças de suas propriedades organolépticas (textura, sabor e aroma).

1.1. Formulação do problema

Estabilidade de uma emulsão é a sua capacidade de resistir a mudanças de suas propriedades ao longo do tempo. Portanto, o leite de coco é termodinamicamente instável, pois 5 a 10 horas após a sua extracção, separa-se em duas fases distintas, uma camada cremosa e outra aquosa relativamente densa (Tangsuphoom e Coupland, 2005). A razão para essa instabilidade deve-se a fraca capacidade emulsificante das proteínas presentes na sua composição, associada aos grandes tamanhos de suas gotículas (Chambal, 2015).

As tentativas de reduzir a instabilidade cinética do leite de coco na indústria incluem a redução do tamanho das gotículas acompanhadas pela adição de estabilizantes comerciais (como exemplos: a lecitina, goma acácia, carboximetilcelulose, etc.), alguns deles são quimicamente sintetizados ou com o uso restrito em alguns países. O uso

destes aditivos não apenas aumenta os custos de produção e/ou altera a identidade do produto, como também pode estar associado a problemas de saúde nos consumidores e, por vezes, mostra-se ineficiente em evitar a separação. A procura por uma alternativa tecnológica segura e natural, que demande menos custos e livre de aditivos alimentares é a via que tem suscitado enorme interesse pela investigação (Chambal, 2015)

Portanto, o presente trabalho propõe-se a estudar o papel que a desnaturação térmica e parcial das proteínas pode desempenhar no melhoramento da estabilidade cinética da emulsão do leite de coco, de modo a coloca-las em um nível de aplicabilidade comparável a caseína. Para este propósito, o presente trabalho procura responder a seguinte questão de fundo:

- Qual é o efeito da desnaturação térmica e parcial das proteínas na estabilidade física do leite de coco?

A baixa eficiência emulsificante das proteínas do leite de coco é observada quando comparadas às proteínas do leite de vaca, pois as últimas são mais flexíveis e conseguem emulsificar pequeníssimas gotículas de óleo, da ordem dos 0,5 – 1 µm de diâmetro, contrastando com a média de 15 - 20 µm das gotículas presentes no leite de coco (Chambal, 2015; Raikos, 2009). A eficiente e completa cobertura das gotículas pela proteína evita a desestabilização da emulsão pela agregação (ou floculação) das gotículas, coalescência, sedimentação e outros mecanismos actualmente identificados, promovendo deste modo a sua estabilidade.

1.2. Objectivos

1.2.1. Objectivo geral

- Estudar o efeito da desnaturação térmica e parcial das proteínas na estabilidade física da emulsão do leite de coco.

1.2.2. Objectivos específicos

- Extrair o leite de coco;
- Determinar as propriedades físico-químicas iniciais do leite (teores de humidade, proteínas, lípidos, pH e a distribuição do tamanho das gotículas de óleo);
- Estimar o intervalo de desnaturação térmica das proteínas pelo método de CBB-G250 *binding*;

- Mensurar o efeito do aquecimento a diferentes temperaturas (40 °C a 100 °C, com incrementos de 10 °C) na floculação, no tamanho médio das gotículas, sedimentação e na microestrutura da emulsão.

1.3. Justificativa

A separação gravitacional leva o consumidor a concluir que o leite de coco esteja deteriorado, enquanto não. Pois este espera ver um produto com uma aparência homogênea e, a separação da emulsão numa camada opaca rica em gotas (creme) e outra menos opaca pobre em gotas (soro) é indesejável.

A estabilidade das proteínas é um factor determinante nas suas funcionalidades em sistemas alimentares, pois, uma determinada propriedade funcional é governada por um estado conformacional específico da proteína e qualquer alteração de estado afecta a sua funcionalidade e, por conseguinte, a estabilidade da emulsão.

Vários estudos anteriores demonstraram que o aquecimento do leite de coco diluído promove o aumento da taxa de floculação e coalescência (Onsaard et al., 2005; Tangsuphoom & Coupland, 2005) a temperaturas inferiores ao ponto de desnaturação da principal proteína (globulina). Muito pouco foi relatado na literatura a respeito do potencial emulsificante das proteínas parcialmente desnaturadas do leite de coco não diluído.

Estudos realizados por Dickinson (2012) evidenciam o potencial que a desnaturação de proteínas globulares (como é o caso das globulinas do coco) tem na estabilização cinética de emulsões através da formação de um gel particulado e fraco (floculação controlada).

Portanto, o presente trabalho é de extrema relevância para o campo científico e industrial, pois, propõe-se a investigar o papel que as proteínas termicamente e parcialmente desnaturadas podem desempenhar no melhoramento da estabilidade física da emulsão do leite de coco não diluído explorando, também, as mudanças microestruturais da emulsão e conformacionais da proteína.

1.4. Metodologia

Para a materialização do presente relatório, recorreu-se aos seguintes métodos: pesquisa bibliográfica, análise laboratorial, colecta de dados, tratamento estatístico, análise e interpretação dos dados e elaboração do relatório final.

1.4.1. Pesquisa bibliográfica

Para a fundamentação teórica do tema, recorreu-se à artigos científicos, livros e *sites* que abordam assuntos relacionados ao tema em questão.

1.4.2. Análise laboratorial

- **Aquisição da matéria-prima:** o coco usado para a produção do leite é proveniente da província de Inhambane, distrito de Zavala;
- **Local de realização:** os ensaios foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Engenharia Química, da Faculdade de Engenharia da Universidade Eduardo Mondlane – UEM;
- **Etapas:** a análise laboratorial consistiu nas seguintes etapas: extracção do leite de coco, caracterização físico-química do leite, tratamento térmico e subsequentes ensaios para a análise da estabilidade da emulsão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do coqueiro

2.1.1. Origem e distribuição geográfica

A hipótese mais aceita é a do coqueiro ser originário das regiões costeiras do sudeste asiático (Malásia, Indonésia e Filipinas) e Melanésia (Lima et al., 2015). Acredita-se que em tempos pré-históricos, variedades selvagens (*niu kafa*) tenham sido arrastadas do leste, pelas correntes do oceano, para as ilhas tropicais do pacífico (Melanésia, Polinésia, e Micronésia) e do oeste para as regiões costeiras da Índia, Sri Lanka, este africano e ilhas tropicais (Seicheles, Andaman e Maurícias) do Oceano Índico (Chan e Elevitch, 2006).

Pela ação humana, o coqueiro propagou-se para o interior dos continentes e actualmente está presente em mais de 200¹ países das regiões tropicais e subtropicais, entre os paralelos 23° ao norte e 23° ao sul (Foale e Harris, 2009).

2.1.2. Classificação taxonómica

Segundo Dransfield et al. (2008), o coqueiro apresenta a seguinte classificação taxonómica:

- Reino: *Plantae*;
- Classe: *Monocotyledoneae*;
- Família: *Areaceae/Palmae*;
- Género: *Cocos* (um dos doze géneros);
- Espécie: *nucifera* (uma única espécie);
- Nome científico: *Cocos nucifera*.

2.1.3. Variedades

Segundo Warwick et al. (2006) e, Martins e de Jesus Júnior (2014), existem três variedades distintas de coqueiros, nomeadamente:

- **Coqueiro-gigante:** é uma variedade rústica, de crescimento rápido e fase vegetativa longa e cujo florescimento tem início entre 5 e 7 anos. Essa variedade

¹ As Nações Unidas reconhecem 251 países e territórios. Os Estados Unidos, no entanto, oficialmente reconhece menos de 200 nações. Em última análise, a melhor resposta é a de que existem 196 países no mundo (*The Number of Countries in the World (thoughtco.com)*)

tem vida útil económica de 60 a 70 anos e pode produzir até 60 frutos/planta/ano, com tamanho variando de médio a grande;

- **Coqueiro-anão (verde, vermelho e amarelo):** apresenta desenvolvimento vegetativo lento, é precoce e inicia a produção, em média, entre 2 e 3 anos após o plantio, tendo uma vida útil de 30 a 40 anos. Produz um grande número de frutos (de 150 a 200 frutos/planta/ano);
- **Coqueiro híbrido intervarietal (gigante/anão):** possui uma série de vantagens em relação ao coqueiro-gigante e ao coqueiro-anão (Tabela 1), porém sua maior dificuldade está na propagação, ou seja, na obtenção das sementes híbridas capazes de abastecer o mercado consumidor, além de apresentar problemas de segregação genética quando utilizadas as sementes oriundas dos próprios híbridos.

Tabela 1: Principais características agronómicas dos grupos varietais do coqueiro.

Características	Variedades de coqueiros		
	Anão	Híbrido	Gigante
Tamanho do fruto	Pequeno	Intermediário	Grande
Crescimento	Lento	Intermediário	Rápido
Produção de frutos (fruto/planta/ano)	150 a 200	130 a 150	60 a 80
Peso do fruto (g)	900	1200	1400
Peso da noz (g)	550	700	800
Peso médio do albúmen sólido (g)	250	400	350
Teor médio de óleo (%)	25,41	66,01	67,02
Teor médio de ácido láurico (%)	50,16	50,65	52,04
Produção de água (ml)	200 a 300	400 a 550	500 ou mais
Destino da produção	<i>In natura</i>	<i>In natura</i>	<i>In natura</i>
		Agro-indústria	Agro-indústria

Fonte: Martins e de Jesus Júnior (2014).

2.1.4. Morfologia do coco

O fruto do coqueiro, coco, é caracterizado como uma drupa fibrosa, formada por uma epiderme lisa (epicarpo ou exocarpo), além de possuir como camadas subjacentes o mesocarpo (fibroso) e o endocarpo, casca que recobre o endosperma (Warwick et al., 2006), conforme ilustrado na Figura 1. O endocarpo possui três “olhos”, próximo ao embrião, um dos olhos é pouco resistente quando comparado aos outros dois. Entre o endocarpo e o endosperma sólido encontra-se uma camada fina e castanha denominada tegumento (Lédo et al., 2018). O endosperma sólido é uma camada carnosa, branca, muito oleosa, principalmente no fruto seco e maduro (entre 11 e 12

meses de maturação). O endosperma líquido, ou água de coco, é armazenado na cavidade central do fruto e passa por modificações ao longo do processo de maturação (da Silva et al, 2020; de Aragão et al., 2002).

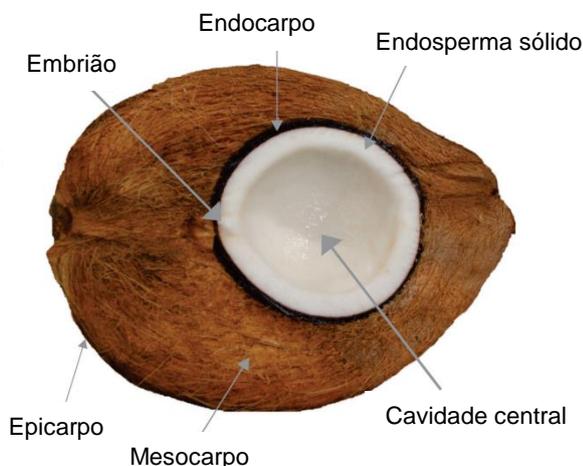


Figura 1: Composição morfológica do coco.
Fonte: adaptado de Léo et al., 2018.

2.1.5. Produção mundial do coco

A área mundial colhida é de 11,8 milhões de hectares, produzindo 62,9 milhões de toneladas de coco. Como ilustrado na Figura 2, os maiores produtores mundiais de coco são, em primeiro lugar a Indonésia seguida de Filipinas e Índia, nesta classificação, Moçambique ocupa a décima sétima posição com 0,40% da produção mundial (FAOSTAT, 2021).

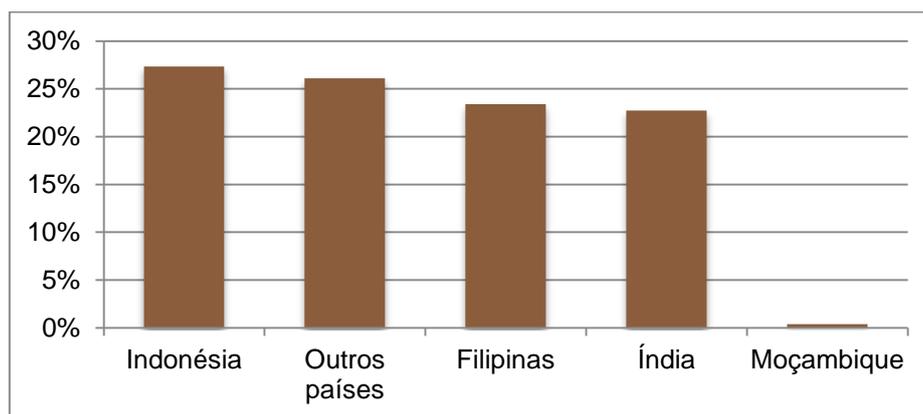


Figura 2: Distribuição da produção mundial de cocos por países.
Fonte: adaptado de FAOSTAT (2021)

Em Moçambique, uma fábrica com capacidade de processar 20 mil cocos por dia está em instalação na província da Zambézia, para a produção de óleo de cozinha, leite, água, fibra e copra. O projecto está avaliado em 4,8 milhões de dólares norte-

americanos e será implantado numa área de 50 mil metros quadrados, no povoado de Guruai, distrito de Mocubela, a norte da província (jornal Notícias, 2023).

2.2. Leite de Coco

O leite de coco é uma emulsão branca e opaca (Figura 7), extraída do endosperma sólido do coco pela sua trituração e subsequente prensagem, com ou sem adição de água potável (Hamad, 2011). Birossel et al. (1963) sustentam a definição anterior, enfatizando que esta é uma emulsão de óleo-em-água (O/A) estabilizada pelas suas proteínas (globulina, albumina, glutelina e prolamina) e fosfolípidos naturais.

Embora a extracção de óleo seja o maior foco da indústria do coco, observa-se uma crescente demanda pelo extracto aquoso do endosperma sólido, o leite de coco, para o uso doméstico e industrial (Seow e Gwee, 1997). Isto é, o mercado mundial de leite de coco foi avaliado em 1,1 bilhão de dólares em 2019 e deve chegar a 2,9 bilhões de dólares, em 2027, com o crescimento anual de 7,1% (Brainer, 2021).

A tendência recente mostra que embora o óleo da copra (processamento a seco) continue a dominar os derivados da indústria do coco, porém, a forma pouco higiénica como a copra é normalmente obtida, torna o óleo e os subprodutos deste processo impróprios para o consumo humano. Isto justifica o interesse actual pelo desenvolvimento da tecnologia a húmido, higiénica, que permite obter simultaneamente o óleo e o leite de coco, ao contrário da copra que só conduz apenas ao óleo, de grau alimentar inferior (Chambal, 2015).

2.2.1. Propriedades químicas do leite de coco e sua comparação com o leite de vaca

A composição do leite de coco varia com a variedade, idade, ambiente de cultivo do coqueiro, práticas culturais, método de preparo e com as condições do processo de extracção, por exemplo, a quantidade de água adicionada e a temperatura usada para a extracção (Cancel et al., 1971).

Na tabela abaixo, está presente a composição do leite, reportada por diferentes autores.

Tabela 2: Composição química do leite de coco reportada por alguns autores.

Componente (%)	Leite de coco		Leite de vaca
	USDA (2014)	Chambal (2015)	Walstra et al. (2006)
Humidade	54,0	50	87,2
Lípidos	35	36	4,0
Proteínas	3,6	3,7	3,35
pH	6 ^a		6,7

- ^a: Raghavendra e Raghavarao, (2010).

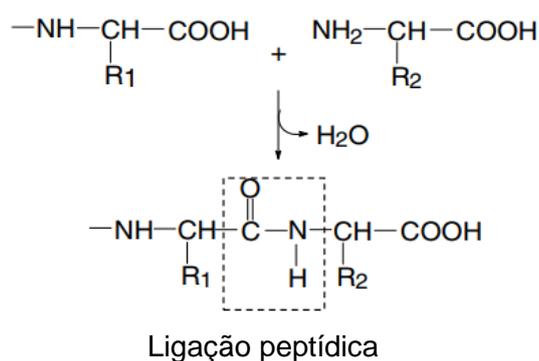
Tanto o leite de vaca assim como o leite de coco, apresentam praticamente a mesma composição qualitativa, diferindo de forma significativa apenas no teor de lípidos, os quais são aproximadamente 10 vezes maior no leite de coco (Hagenmaier et al., 1974).

O leite da vaca constitui a emulsão mais estável de que há conhecimento no campo alimentar, facto associado a elevada qualidade e capacidade emulsificante da α -caseína, que não tem termo de comparação. Encontrar uma alternativa tecnológica a emulsão do leite de vaca é um objectivo perseguido por vários especialistas de alimentos, na tentativa de responder a inúmeros desafios de actualidade, como sejam, por exemplo, a satisfação do segmento de mercado que não pode consumir produtos ou derivados de origem animal (Chambal, 2015).

O leite de coco é de origem vegetal e tem potencial para se tornar candidato de eleição. Entretanto, há diferenças fundamentais e limitações sérias quanto ao seu desempenho face a certas propriedades que a emulsão deve observar, a começar pelo gosto, estabilidade e propriedades funcionais.

2.3. Proteínas

Proteínas são polímeros de aminoácidos, nos quais aminoácidos individuais, chamados de monómeros, estão unidos por ligações peptídicas. Um grupo amino pertencente a um monómero forma uma ligação peptídica com o grupo carboxilo de um segundo monómero (reacção abaixo); e o grupo amino do segundo forma uma ligação peptídica com o grupo carboxilo de um terceiro aminoácido e assim sucessivamente (McMurry, 2008).



2.3.1. Classificação de Osborne

De acordo com a solubilidade, Osborne (1909) classificou as proteínas do seguinte modo:

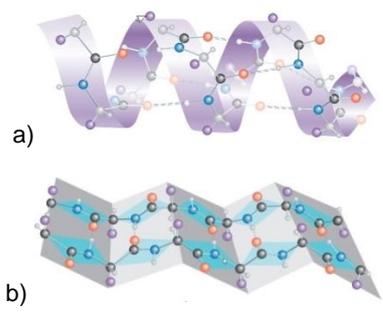
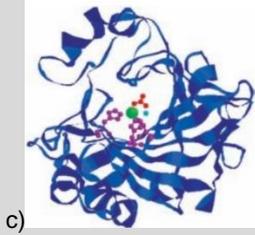
- **Albuminas:** proteínas solúveis em água e que coagulam (desnaturam) quando submetidas ao aquecimento;
- **Globulinas:** proteínas solúveis em soluções salinas neutras;
- **Glutelinas:** são insolúveis em soluções aquosas neutras, salinas e álcoois. Patil e Benjakul (2018) sustentam o posicionamento de Osborne (1909) destacando que estas proteínas são solúveis em soluções ácidas (glutelina-1) e básicas (glutelina-2);
- **Prolaminas:** são solúveis em álcoois (70 – 90%);

De acordo com a solubilidade, cerca de 80% das proteínas do endosperma sólido do coco são classificadas como albuminas e globulinas. Estas são também as proteínas que estão presentes em maior quantidade no leite e, em quantidades relativamente menores encontram-se as glutelinas e prolaminas (Patil e Benjakul, 2018).

2.3.2. Estrutura das proteínas

Segundo Damodaran (2008), Solomons e Fryhle (2011), existem quatro níveis estruturais das proteínas, apresentados na tabela abaixo.

Tabela 3: Descrição das estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas.

Estrutura	Descrição	Representação
Primária	Refere-se a sequência linear na qual as moléculas de aminoácidos constituintes estão ligadas através de ligações peptídicas.	Veja a Figura 3
Secundária	Arranjo espacial e periódico dos monómeros de aminoácidos num determinado segmento da cadeia polipeptídica. Podemos encontrar as estruturas secundárias em α -hélice (a) e configuração- β (b).	
Terciária	Arranjo espacial observado quando uma cadeia linear proteica, com os segmentos da estrutura secundária dobra-se, originando uma estrutura compacta tridimensional. As proteínas dobram-se de modo a expor o maior número possível de grupos hidrófilos num ambiente aquoso e encobrir o maior número possível de grupos hidrófobos no seu interior. Podemos encontrar as proteínas fibrosas insolúveis em água e globulares que são solúveis em soluções aquosas.	
Quaternária	Arranjo espacial da proteína quando esta contém mais de uma cadeia polipeptídica.	Veja a Figura 3

- Fonte: Damodaran (2008); Solomons e Fryhle (2011);
- As imagens a), b), c) foram obtidas de Solomons e Fryhle (2011).

2.4. Desnaturação das proteínas

É a mudança nas estruturas, secundárias, terciárias ou quaternárias das proteínas, sem quebrar as ligações peptídicas, Figura 3. Neste processo não são envolvidas reacções químicas (Damodaran, 2008).

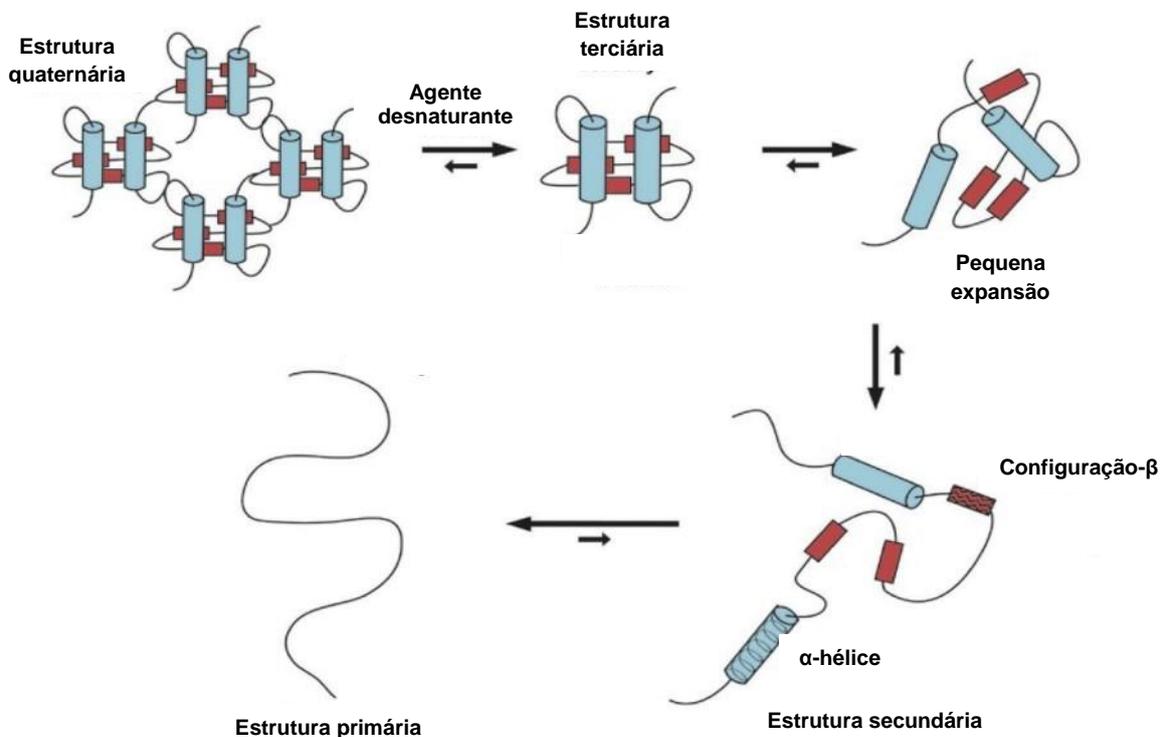


Figura 3: Processo da desnaturação proteica.
Fonte: Chu e Robledo (2022).

Devido a estabilidade relativamente menor apresentada pelas proteínas globulares, estas podem ser induzidas ao desdobramento da sua estrutura pela variação da temperatura, pH, qualidade do solvente e pressão (Walstra, 2003).

2.4.1. Desnaturação térmica

Segundo Mulvihill e Donovan (1987), à semelhança das outras formas de desnaturação, a desnaturação térmica ocorre quando as ligações por ponte de hidrogénio, hidrofóbicas e outras não covalentes são quebradas pelo aquecimento, isto é:

- o primeiro estágio envolve a alteração não covalente das proteínas, estágio da desnaturação;
- o segundo envolve a agregação não reversível, que pode ser seguida da precipitação.

2.4.1.1. Modelo de Transição de Dois Estados

A estrutura de uma proteína não é um parâmetro fácil de quantificar, medições directas das fracções de proteínas nos estados nativos e desnaturado em uma solução é praticamente impossível. Porém, mudanças na conformação das proteínas afectam várias propriedades químicas e físicas como a absorvância, fluorescência, coeficiente de sedimentação, rotação óptica, reactividade de grupos sulfídricos e a actividade enzimática. Portanto, a desnaturação pode ser estudada monitorando-se a mudança dessas propriedades (Damodaran, 2008).

A Figura 4 mostra que a transição do estado nativo (y_N) para o desnaturado (y_D) ocorre num intervalo muito pequeno da variável aplicada (desnaturante). Esta é uma característica de processos cooperativos, onde várias ligações são quebradas ou formadas simultaneamente, isto é, a molécula pode apenas existir no estado nativo ou desnaturado, dois estados (Walstra, 2003).

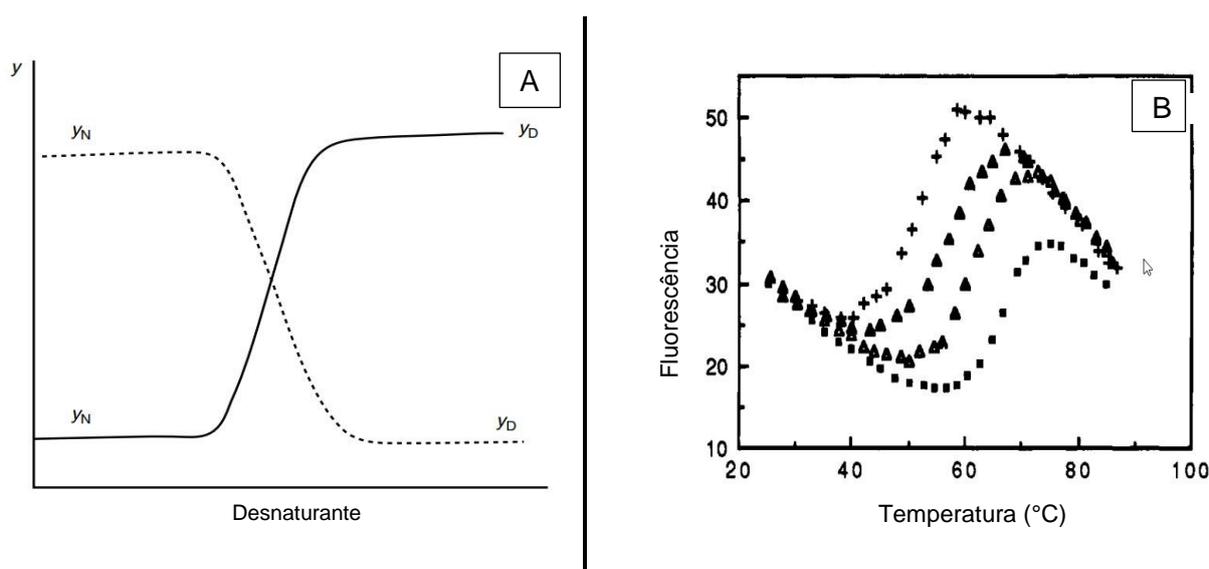
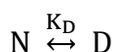


Figura 4: Transição do estado nativo para o desnaturado em função do *stress* aplicado. Fontes: A (Demodaran, 2008) e B (Jackson e Fersht, 1991).

Para este modelo de dois estados, o equilíbrio entre o estado nativo e desnaturado, na região de transição cooperativa pode ser expressa como apresentado na equação (1):



$$K_D = \frac{a_D}{a_N} \quad (1)$$

onde K_D é a constante de equilíbrio; a_N e a_D são as actividades das proteínas nos estados nativos e desnaturados, respectivamente (Poklar e Vesnaver, 2000).

Segundo Privalov (1979), o processo de desnaturação das proteínas globulares envolve três estágios (Figura 4B):

- No primeiro estágio do processo de desnaturação as proteínas sofrem mudanças pré-desnaturacionais entre dois estados nativos, evidenciado pelo decréscimo linear inicial na curva sigmoidal;
- Seguida da desnaturação propriamente dita (elevação); e
- Por fim, temos novamente um decréscimo causado pela agregação de proteínas desnaturadas.

2.5. Emulsão

Emulsão é uma mistura de dois líquidos imiscíveis, com um deles, a fase dispersa, presente em forma de gotículas esféricas no outro líquido, fase contínua (Dickinson, 2009).

Para de Lima (2014) os dois principais tipos de emulsões são: óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O). As emulsões alimentares do tipo O/A incluem leite, cremes, molhos de saladas; exemplos do tipo de A/O são manteiga e margarina.

2.5.1. Estabilidade de emulsões

Estabilidade de uma emulsão é a sua capacidade de resistir a mudanças de suas propriedades ao longo do tempo: quanto mais estável é a emulsão, mais lentas são as mudanças das suas propriedades (McClements, 2016).

Quando tomamos em conta a estabilidade de uma emulsão, é importante estabelecer a diferença entre as estabilidades termodinâmica e cinética, como ilustra Figura 5. A estabilidade termodinâmica indica-nos quando um dado processo vai ou não ocorrer, enquanto a estabilidade cinética dá-nos a velocidade do processo, se este ocorrer (Atkins e de Paula, 2006).

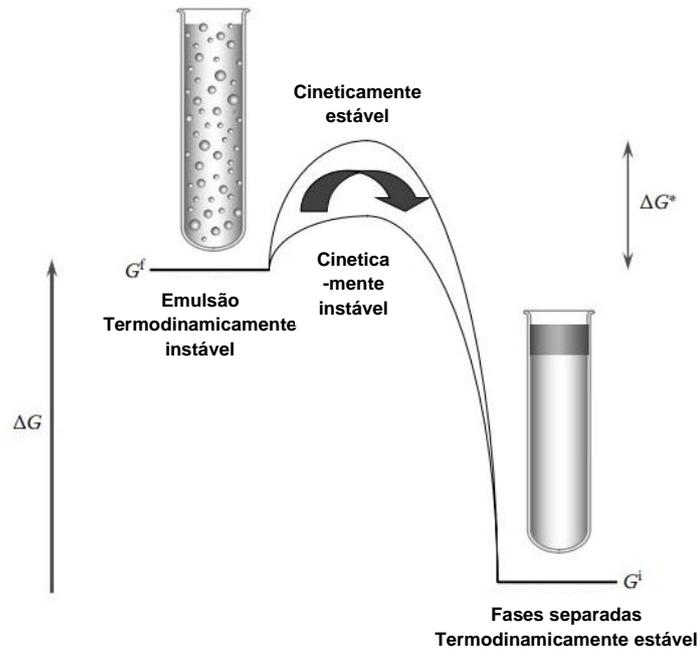


Figura 5: Diagrama de estabilidade termodinâmica e cinética de uma emulsão genérica. Onde, G^i é a energia livre no estado estável, G^f é a energia livre no estado instável, ΔG representa a diferença da energia livre entre os dois estados, e ΔG^* dá-nos a barreira da energia livre.

Fonte: McClements, 2016.

Quando a barreira da energia livre é suficientemente elevada, o sistema permanece no seu estado termodinâmico instável, por um longo intervalo de tempo, o qual é designado de estado cineticamente estável ou meta-estável (McClements, 2016).

2.5.1.1. Emulsificantes

É toda substancia superficialmente activa que pode ser adsorvida na interface óleo-água e proteger as gotículas da emulsão da floculação e/ou coalescência, como ilustra a Figura 6 (Hamad, 2011).

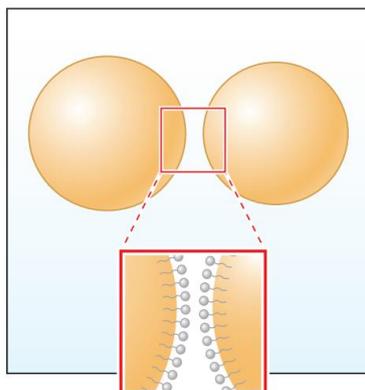


Figura 6: Estabilização de uma emulsão pela acção de um emulsificante.

Fonte: McClements et al., 2017.

Para McClements (2007), um bom emulsificante deve ter as seguintes características gerais:

- deve ser capaz de rapidamente adsorver-se na superfície das gotículas recentemente formadas pela homogeneização;
- deve ser capaz de reduzir significativamente a tensão superficial;
- ser capaz de formar uma camada interfacial resistente a ruptura e/ou providenciar suficientes interações electrostáticas repulsivas entre as gotículas.

Podemos encontrar alguns exemplos de emulsificantes, nomeadamente: fosfolípidos e biopolímeros anfifílicos (McClements, 2016).

2.5.1.2. Biopolímeros anfifílicos

As proteínas e polissacarídeos são polímeros que ocorrem naturalmente e, que possuem a capacidade de estabilizar as emulsões alimentares. Para Damodaran (2008) as proteínas superficialmente activas devem ter as seguintes propriedades:

- Habilidade de rapidamente adsorver-se na interface;
- Habilidade de rapidamente desdobrar-se e reorientar-se na interface;
- Uma vez na interface, a habilidade de interagir com as moléculas vizinhas e formar um filme resistente e viscoelástico, que possa resistir ao *stress* térmico e mecânico.

2.5.2. Distribuição do tamanho das gotículas de óleo de emulsões

Grande parte das propriedades de emulsões alimentares é determinada pelo tamanho de suas gotículas, como por exemplo, a textura, aparência e sabor (Friberg et al., 2004).

Informações a respeito do tamanho das partículas de uma emulsão podem ser obtidas por meio de vários métodos analíticos incluindo a microscopia, dispersão de luz, sedimentação, etc. Diferentes métodos fornecem diferentes tipos de médias (Tabela 4), isto é, medições microscópicas dão o diâmetro numérico ($d_{1,0}$) e a dispersão de luz dá-nos o diâmetro ponderado pelo volume ($d_{4,3}$) (McClements, 2016).

Tabela 4: Diferentes formas de expressar a média do diâmetro das gotículas de emulsões.

Nome da média	Símbolo	Fórmula	Proporcionalidade
Média numérica	$d_{1,0}$	$d_{1,0} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i}$	$d_{1,0} \propto L$
Média ponderada pela área	$d_{3,2}$	$d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$	$d_{3,2} \propto A$
Média ponderada pelo volume	$d_{4,3}$	$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$	$d_{4,3} \propto V$

Fonte: McClements (2016).

Onde:

- L, A e V representam o comprimento, área e volume das gotículas, respectivamente;
- d_i : diâmetro individual de cada gotícula da classe i; e
- n_i : número de gotículas na classe i.

2.5.3. Mecanismos de instabilidade

A emulsão do leite de coco é termodinamicamente instável e, por isso, após 5 a 10 horas da extração separa-se em duas fases distintas (Figura 7), uma camada cremosa e outra aquosa relativamente densa (Tangsuphoom e Coupland, 2005).



Figura 7: Separação da emulsão do leite de coco em creme e soro.

Fonte: <https://tocomendo.com.br/creme-de-coco/>

Emulsões, como é o caso do leite de coco, são termodinamicamente instáveis devido à fobia que as moléculas de óleo e água têm, uma para com a outra, e como consequência as suas estruturas tendem a alterar-se com o tempo por via de vários mecanismos – floculação, coalescência e sedimentação, veja a figura 8 – podendo levar a separação completa de fases (Hamad, 2011).

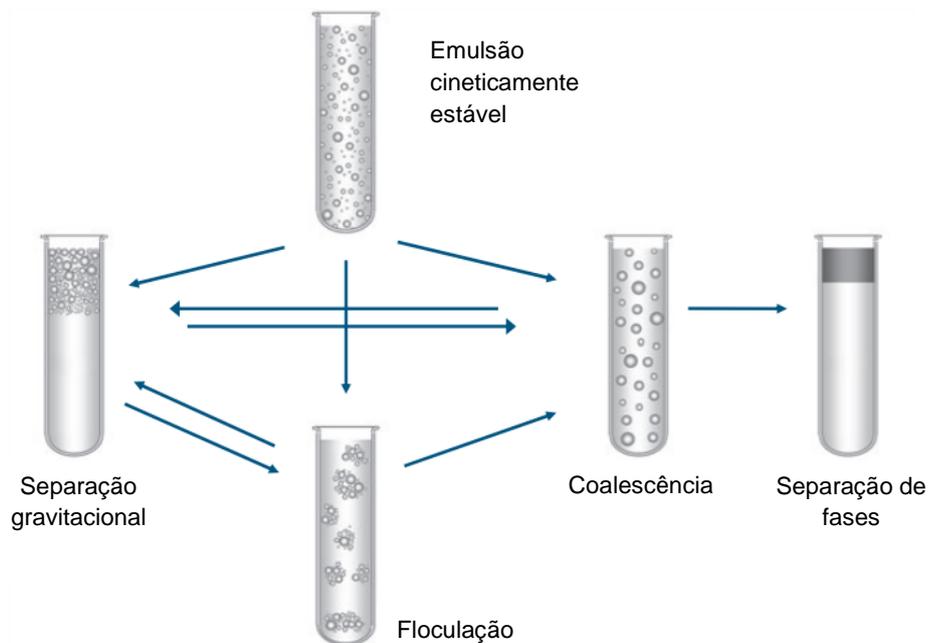


Figura 8: Mecanismos de instabilidade de emulsões do tipo O/A.
 Fonte: McClements et al. (2004)

2.5.3.1. Floculação

A floculação é o processo no qual as gotículas formam um agregado (Figura 8), sendo que cada uma das gotículas iniciais mantém a sua integridade individual formando flóculos (de Lima, 2014).

A floculação tende a aumentar a velocidade de sedimentação porque os flóculos têm grandes diâmetros que as gotículas (o que compensa o facto do contraste de densidades entre os flóculos e o líquido circundante ser reduzido) (McClements, 2007).

A floculação pode ser vantajosa ou não, dependendo da natureza da emulsão (Hamad, 2011), pois em emulsões não diluídas e na presença de polímeros dispersos na fase contínua, a floculação ou agregação (controlada) pode levar ao melhoramento da estabilidade cinética da emulsão pela formação de uma rede de gotículas e flóculos interconectados, também chamada de emulsão-gel particulado (Farjami e Madadlou, 2019) que será abordado na secção 2.5.5.

2.5.3.2. Coalescência

A coalescência é um processo irreversível que envolve a ruptura do filme interfacial, ou seja, as gotículas tendem a se aproximar umas das outras para formarem uma única gotícula maior (Figura 8), podendo eventualmente levar formação de uma camada de óleo em cima da emulsão, *oiling off* (de Lima, 2014).

É o principal mecanismo pelo qual uma emulsão move-se em direcção ao seu estado termodinâmico mais estável, porque envolve a diminuição da área de contacto entre as fases de óleo e água (Walstra, 2003).

A coalescência causa a mudança dos diâmetros primários e efectivos² das gotículas enquanto a floculação provoca o aumento do diâmetro efectivo, mas o diâmetro primário permanece inalterado (Tangsuphoom e Coupland, 2008a).

2.5.3.3. Sedimentação (*creaming*)

É o processo no qual há um movimento ascendente das gotículas da fase dispersa, porque estas têm uma densidade menor que a do líquido circundante (de Lima, 2014).

Durante o processo forma-se uma camada de soro deficiente em gotas, no fundo do recipiente, e uma camada de creme com excesso de gotas, no topo do recipiente (Figura 8). A concentração das gotas na camada intermédia que separa o soro e a camada de natas é inicialmente similar à da emulsão original, sendo referida como a camada emulsão, que têm uma aparência similar à emulsão original (McClements, 2016).

Por vezes é difícil distinguir o limite entre a camada emulsão e a camada de natas porque são ambas opticamente opacas, e a opacidade de uma emulsão concentrada não se altera grandemente com o aumento da concentração de gotículas (Chantrapornchai et al., 2008).

A lei de Stokes diz-nos que a velocidade de sedimentação, V_{stokes} , de uma esfera rígida isolada de densidade ρ e raio a é dada pela equação (2):

$$V_{\text{stokes}} = \frac{2a^2(\rho_0 - \rho)g}{9\eta_0} \quad (2)$$

onde ρ_0 e η_0 são respectivamente a densidade e a viscosidade Newtoniana da fase contínua, g a aceleração de gravidade e ρ a densidade da fase dispersa. A equação (2) é estritamente aplicável a emulsões diluídas, monodispersas e não-floculadas (Dickinson, 2009).

² Na medição do diâmetro efectivo são consideradas as gotículas isoladas e os flóculos, enquanto no diâmetro primário toma-se em conta apenas as gotículas isoladas (Tangsuphoom & Coupland, 2005).

Portanto, para emulsões não-diluídas, polidispersas e/ou floculadas, a equação de Stokes serve apenas para avaliar qualitativamente os factores que controlam a formação de creme (Walstra e van Vliet, 2008), isto é:

- A sedimentação é mais rápida à medida que o tamanho das gotículas da emulsão aumenta ($v_{\text{stokes}} \propto a^2$);
- Não ocorre formação de creme se a densidade da fase dispersa e contínua da emulsão forem iguais, $v_{\text{stokes}} \propto (\rho_0 - \rho)$;
- Com o aumento da viscosidade da fase contínua, a velocidade de sedimentação reduz ($v_{\text{stokes}} \propto \frac{1}{\eta_0}$).

2.5.4. Transição de fases em sistemas coloidais: interacções atractivas

Dispersões coloidais exibem uma transição de um líquido ergódico para um semi-sólido não ergódico de carácter estérico puro (Figura 9), pelo aumento da fracção das partículas e/ou devido a uma origem entálpica, pelo aumento da força de atracção (Dawson, 2002), isto é, para suspensões concentradas (maior que 58% em volume):

- O aumento da força de atracção entre as partículas causa a mudança para um outro estado não ergodico – *attractive glass* – onde a mobilidade em larga escala é suprimida devido a interacção e agrupamento entre as partículas (Petekidis e Wagner, 2021);
- Com a diminuição da fracção do volume das gotículas, mantendo-se constante a força de interacção entre elas, ocorre a mudança do estado *attractive glass* para um gel particulado (Mewis e Wagner, 2012).

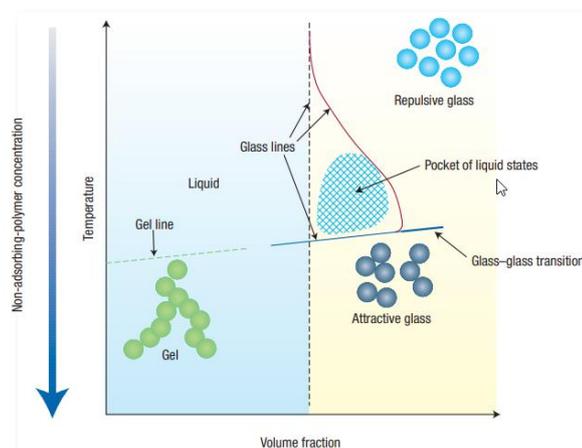


Figura 9: Diagrama de fases da temperatura em função da fracção volumétrica da fase dispersa.

Fonte: Sciortino, 2002.

Aumentar a concentração de polímeros equivale a diminuir a temperatura (Sciortino, 2002).

2.5.5. Géis

Gel é uma rede contínua e tridimensional de moléculas ou partículas interconectadas (como cristais, gotículas de emulsões e agregados moleculares) que prendem um grande volume da fase contínua líquida, a semelhança de uma esponja (Walstra e van Vliet, 2008), Figura 9. O gel formado pela rede de gotículas de óleo designado de emulsão-gel particulado.

Portanto, o gel é um semi-sólido viscoelástico, isto é, o comportamento do gel em resposta a um *stress* aplicado é parcialmente a de um sólido elástico e parcialmente a de um líquido viscoso (Dickinson, 2012). A floculação controlada (desnaturação) pode melhorar a estabilidade cinética da emulsão através da formação do gel-particulado que é mais estável à separação de fases que a emulsão normal (Farjami e Madadlou, 2019)

2.6. Tratamento térmico

O tratamento térmico é uma etapa essencial no processamento do leite de coco. Este tratamento tenciona prolongar o tempo de prateleira pela redução da carga microbiana e, por conseguinte, a minimização do risco de degradação e consequente intoxicação do consumidor (Raikos, 2009; Qian et al., 2017).

As condições do tratamento térmico variam com os diferentes tipos de leite vegetal. Deve-se ter em conta que as variações de temperaturas e tempo dos tratamentos térmicos podem ocorrer devido a diferença nas plantas de extracção e na sua composição (Romulo, 2022). A tabela 1 sumariza as condições de aplicação do tratamento térmico em diferentes tipos de leite.

Tabela 5: Condições operacionais do tratamento térmico de diferentes variedades de leite vegetal.

Tipo de leite	Temperatura (°C)	Duração (minutos)	Resultados
Leite de coco diluído (Tangsuphoom e Coupland, 2005)	40 – 90 °C	60 min.	O aumento da temperatura causa a floculação e coalescência.
Leite de soja (Kwok et al., 2002)	143 °C	1 min.	Aumento do tempo de prateleira; maior digestibilidade das proteínas; e ligeira alteração na cor e sabor.
Leite de almondega (Devnani et al., 2020)	45 – 95 °C	30 min.	A desnaturação inicia aos 55 °C, onde pode levar a formação de um gel.
Leite de amendoim (Zaaboul et al., 2019)	90 °C	10 min.	Desnaturação; agregação das gotículas e coalescência.
	121 °C	15 min.	

3. PARTE EXPERIMENTAL

Como referiu-se anteriormente, no presente trabalho pretende-se estudar o efeito da desnaturação térmica e parcial das proteínas na estabilidade física da emulsão do leite de coco deste modo, neste capítulo são apresentados os principais materiais e métodos usados para a obtenção dos resultados.

3.1. Matéria-prima

Os cocos maduros usados para a extracção de leite foram obtidos de coqueiros gigantes, oriundos da província de Inhambane, distrito de Zavala. Logo que recebidos, os cocos (sem o mesocarpo) foram:

- Conservados a temperatura ambiente (30 ± 4 °C) e distante da luz solar; e
- Usados, no máximo, duas semanas após a sua extracção.

3.2. Substâncias, equipamentos e instrumentos usados

Os equipamentos, instrumentos, materiais e substâncias usadas para a realização dos ensaios laboratoriais encontram-se na Tabela 6, apresentada abaixo.

Tabela 6: Substâncias, materiais, equipamentos, instrumentos usados durante a realização dos ensaios.

Substâncias	Equipamentos/Instrumentos	
CBB G-250	Balão volumétrico (100, 1000 mL)	
Ácido fosfórico (95%)	Tubos de ensaio de vidro	Provetas (100mL)
Água destilada	Papel Whatman (#1)	Dessecador
Catalisador de Selénio	Bloco de digestão (Selecta, Bloc Digest 6-Rat 2)	
Ácido sulfúrico (97%)	Destilador (Selecta, Pro-Nitro M)	
NaOH (40%)	Tubos de ensaios plásticos (14, 45 mL)	
H ₃ BO ₃	Centrifugadora (Thermo Scientific, Megafuge 8R)	
Vermelho de metil	Banho-maria (Boeco, PWB-8)	Sacos plásticos
HCl (0,1N)	Estufa (Labotec, EcoTherm)	Mufla (Carbolite)
Areia calcinada	Sistema Soxhlet	Viscosímetro (Visco 88)
Éter etílico	Prensa hidráulica	Raspadeira de vegetais
NaCl (0,15M)	Balança analítica (Denver instrument, M-310)	
	Espectrofotómetro (Agilent, 60 UV-vis)	
	Microscópio óptico (Olympus, SC20, U-CMAD3)	
	Agitador (Rotamixer)	Multímetro (Hach, HQ40d)

3.3. Métodos

Para a obtenção dos resultados experimentais, recorreu-se aos métodos e sequência apresentadas na Figura 10. Em primeiro lugar, o leite de coco foi extraído seguindo-se o método exposto na Figura 11, de imediato, realizaram-se a caracterização físico-química inicial, o tratamento térmico e subsequentes ensaios da análise da variação da estabilidade da emulsão com o aquecimento (desnaturação). As linhas a tracejado representam o percurso pelo qual estimou-se o intervalo de desnaturação com base nas proteínas do soro.

Todos os ensaios experimentais descritos abaixo foram realizados com amostras em triplicatas, de acordo com a sequência apresentada abaixo na Figura 10.

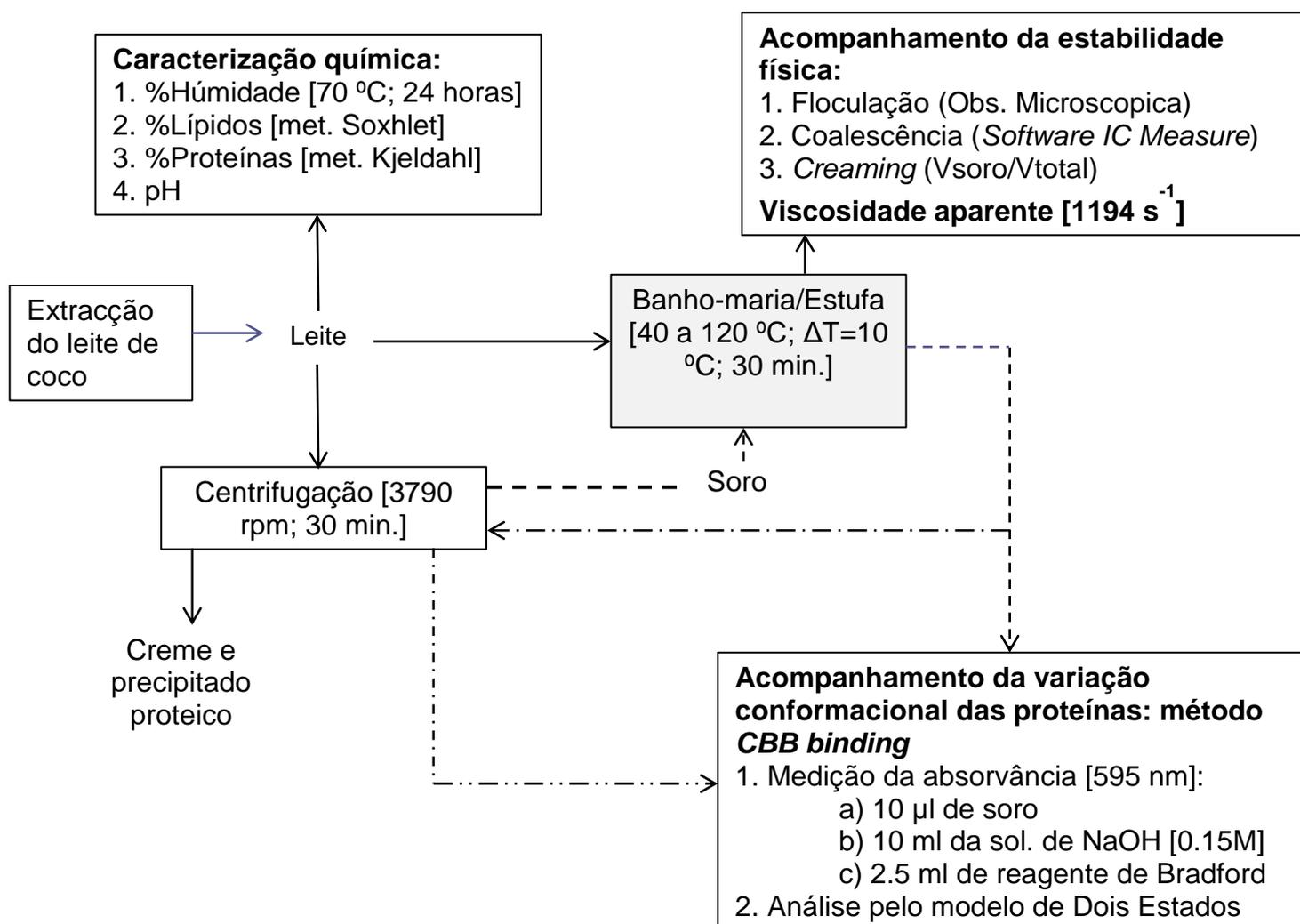


Figura 10: Fluxograma das actividades laboratoriais e análise dos dados.

3.3.1. Extração do leite

A extração do leite de coco foi realizada de acordo com o procedimento apresentado na Figura 11 adaptado do *Philippine Coconut Authority* (2014), primeiramente, retirou-se a água pela perfuração do olho frágil e de seguida realizaram-se a retirada manual do endocarpo, separação da polpa do tegumento com o auxílio de um descascador de vegetais, lavagem da polpa em água corrente, trituração usando-se uma raspadeira de vegetais, tendo como modificação o aquecimento da polpa, previamente colocada em sacos plásticos, na estufa a 50 °C por 10 minutos para maximizar o rendimento e, prensagem da polpa envolvida por um pano de modo a impossibilitar a passagem da fibra (filtração).

A prensagem foi feita com o auxílio de uma prensa hidráulica construída pelo autor com base em material totalmente reciclado (Figura A1 – 1).

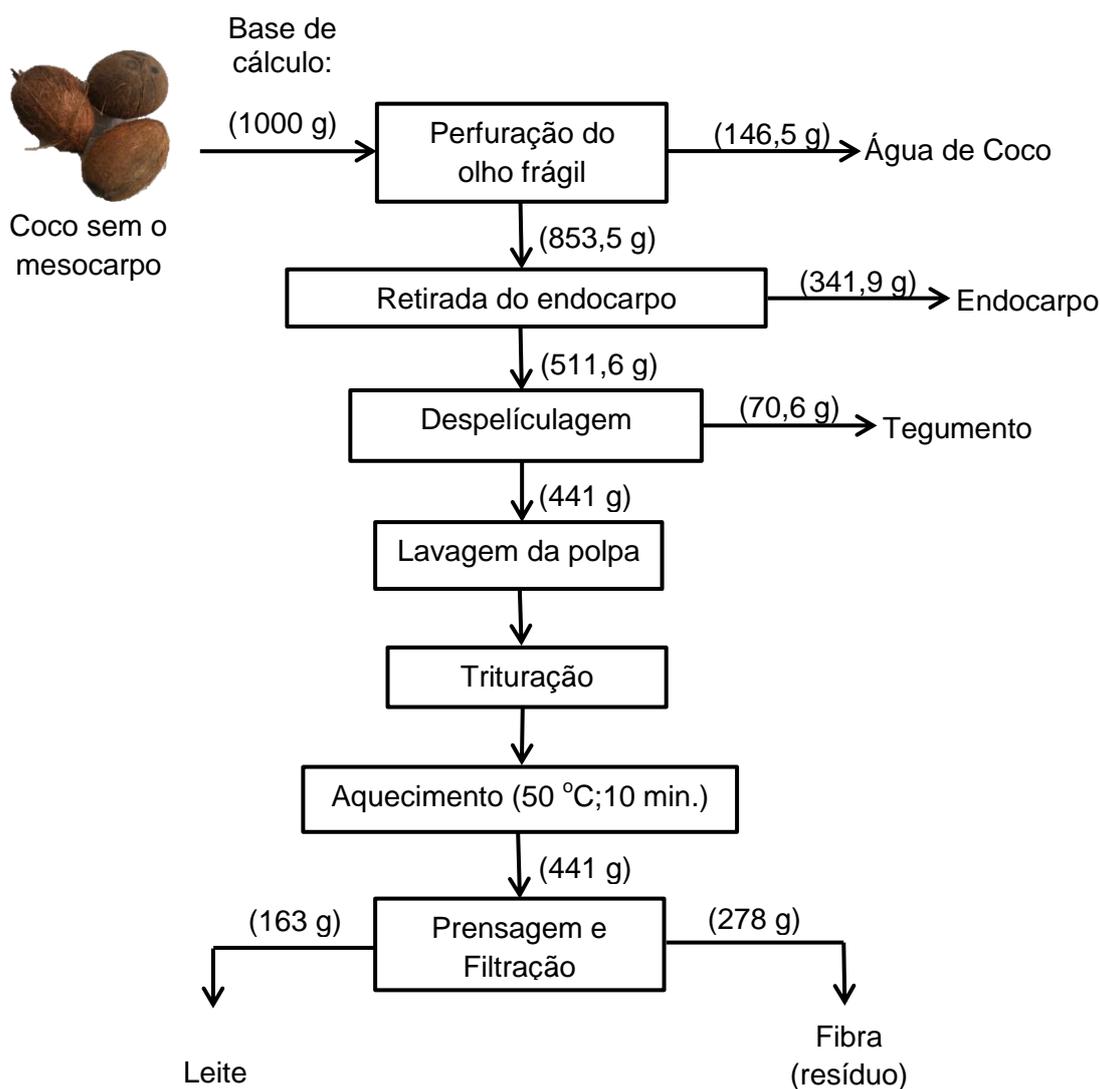


Figura 11: Fluxograma da operação de extração do leite de coco.
Fonte: adaptado de *Philippine Coconut Authority*, 2014.

O leite foi colectado em um frasco de vidro (Figura 13) e, de imediato, submetido aos ensaios experimentais apresentados na secção seguinte. Importa referir que todo o leite extraído foi descartado após 24 horas da sua extracção.

3.3.2. Determinação das propriedades físico-químicas iniciais do leite de coco

3.3.2.1. Teor de humidade

O teor de humidade representa a quantidade de água contida no alimento (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Foi determinado de acordo com o método nº 934.01 da AOAC (1990), onde as amostras de leite foram mantidas a 70°C, durante 24 horas na estufa (Labotec, EcoTherm) com a modificação de a secagem não ter sido realizada no vácuo. A massa perdida foi reportada como humidade, isto é:

$$\% \text{humidade} \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{\text{massa perdida}}{\text{massa da amostra húmida}} \times 100\% \quad (3)$$

3.3.2.2. Determinação do pH

Define-se pH como a medida da acidez ou alcalinidade (AOAC, 1990). Foi determinado com o auxílio de um multímetro (Hach, HQ40d), seguindo-se o método nº 973.41 da AOAC (1990).

3.3.2.3. Determinação do teor de proteína

O teor de proteína do leite foi determinado seguindo-se o método de Kjeldhal.

Os conteúdos de nitrogénio e proteína foram determinados de acordo com as seguintes equações:

$$\%N = \frac{(V-B) \times 0,14}{W} \quad (4)$$

$$\%P = \%N \times 6,25 \quad (5)$$

Onde:

- %N: teor percentual de nitrogénio;
- V: volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (ml);
- B: volume de ácido clorídrico gasto na titulação em branco (ml);
- W: massa da amostra (g);

- %P: teor percentual de proteínas.

3.3.2.4. Determinação do teor de lípidos

Lípidos são compostos de origem biológica, que só são solúveis em solventes apolares como clorofórmio, éter etílico, hexano, etc. (Morrison e Boyd, 2008). Para a determinação do teor de lípidos recorreu-se ao método de extracção directa no sistema *Soxhlet*, Figura 12. Com a modificação de que antes da extracção de lípidos, realizou-se a secagem do leite, previamente doseado nos cartuchos e misturado com areia calcinada, na estufa a 70°C durante 6 horas.



Figura 12: Sistema *Soxhlet* usado para a extracção de lípidos.

Para a determinação do teor de lípidos, recorreu-se a seguinte equação:

$$\% \text{lípidos} = \frac{\text{massa}_{\text{lípidos extraído}}}{\text{massa}_{\text{amostra}}} \times 100\% \quad (6)$$

3.3.3. Determinação da variação absorvância da proteína do soro com a temperatura de aquecimento: adaptação do método CBB-G250 *binding*

O método de CBB G-250 *binding* foi desenvolvido por Cao et al. (2015) com o intuito de analisar o processo de desnaturação proteica explorando a capacidade que o CBB-250 possui de adsorver-se em pontos hidrofóbicos e iónicos expostos durante o processo de desdobramento ou desnaturação da proteína.

Em primeiro lugar, foram centrifugados 30 ml de leite fresco por cada tubo de ensaio (Thermo Scientific, Megafuge 8R) a 3790 rpm durante 30 minutos. O soro foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Para o tratamento térmico do soro usou-se o banho-maria (Boeco, PWB-8) no qual a água em quantidade suficiente estava ajustada a temperatura de 40 a 90 °C, com incrementos de 10 °C por cada ensaio, e as amostras foram mantidas no banho por 30 minutos. Para as temperaturas mais altas de 100 °C, 110 ou 120 °C, o tratamento térmico foi feito na estufa (Labotec, EcoTherm).

O aquecimento foi interrompido pelo arrefecimento súbito da amostra em outro banho-maria a temperatura ambiente (~30 °C), por 30 minutos.

Antes mesmo da medição da absorvância, uma parte do soro foi centrifugada.



Figura 13: Tratamento térmico do leite de coco em banho-maria.

Para a medição da absorvância, um espectrofotômetro (Agilent, 60 UV-vis) foi usado. 10 µl de soro do leite de coco foram diluídos em 10 ml de uma solução de NaCl (0.15 M) e 2,5 ml do reagente de Bradford (preparado seguindo-se o procedimento apresentado no anexo 6). Depois, a mistura resultante foi agitada no Rotamixer e incubada por 5 minutos. Terminados os 5 minutos, depositou-se gentilmente a solução na cuveta e de seguida mediu-se a absorvância.

3.3.4. Observação da microestrutura das emulsões

A observação da microestrutura das emulsões do leite de coco sujeito a diferentes temperaturas (mesmo método seguido para o aquecimento do soro) foi feita num microscópio óptico (Olympus SC20), equipado com uma câmara de vídeo (U-CMAD3) para a captação de imagens. As amostras de leite foram diluídas com água destilada, numa razão de 1:9 de modo a possibilitar a visualização de gotículas e flóculos (Tangsuphoom e Coupland, 2005) e depositou-se 25 µl da amostra diluída na lâmina, seguida de cobertura por uma lamela. As observações foram feitas com as ampliações

totais de 100x, 400x e 1000x, e as imagens foram captadas em três pontos distintos da lâmina.

3.3.5. Determinação da distribuição do tamanho das gotículas de óleo

Para a realização da presente actividade, recorreu-se ao método desenvolvido pelo autor, pela análise das imagens obtidas do ensaio da observação microscópica.

De entre os vários *softwares* disponíveis para a análise de imagens como o *ImageJ* o autor optou pelo *IC Measure*, pois este apresenta uma interface simples (Figura 14) e resultados compatíveis aos dos outros *softwares*.

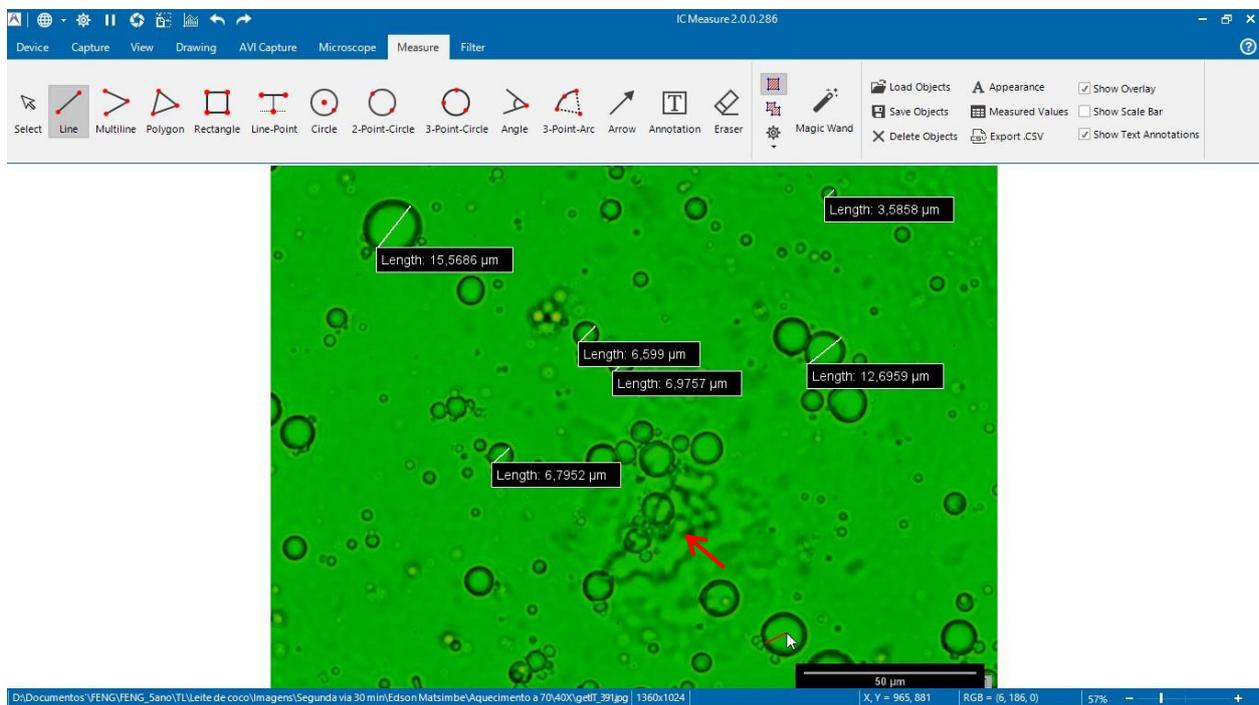


Figura 14: Interface do *software* IC Measure. A mancha indicada pela seta é um defeito do microscópio usado, presente em todas as imagens obtidas pela objectiva 400x.

Para a determinação do tamanho representativo das gotículas de óleo, com base nos dados obtidos do *IC Measure*, recorreu-se a moda numérica, no lugar dos diâmetros médios numéricos (equação 7) e ponderados pelo volume (equação 8).

$$d_{1,0} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \quad (7)$$

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (8)$$

Onde:

- $d_{1,0}$: média numérica do diâmetro das gotículas (μm)

- $d_{4,3}$: diâmetro médio das gotículas ponderado pelo volume (μm)
- d_i : diâmetro individual da classe i (μm)
- n_i : número de gotículas na classe i .

3.3.6. Determinação do índice de sedimentação

O Índice de sedimentação é um indicador da extensão de separação de fases, obtido pela razão entre o volume da camada de soro e o da emulsão (Chambal, 2015).

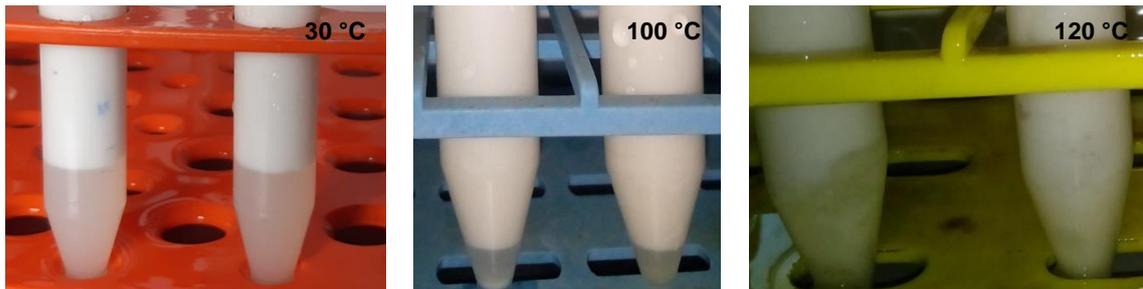


Figura 15: Tubos de ensaio contendo amostras de leite submetidas a diferentes níveis de aquecimento, 24 horas depois do aquecimento.

10 ml das emulsões foram colocados em tubos de ensaio graduados (15 mm de diâmetro interno e capacidade de 14 ml) sujeitas a diversos tratamentos térmicos anteriormente descritos. Uma agitação suave foi seguida de repouso num banho-maria, ajustado a temperatura de 30 °C (Tangsuphoom e Coupland, 2005). Começou-se o registo dos volumes do soro separado da emulsão do leite em instantes pré-determinados (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 20 e 24 horas), contados a partir do momento da agitação e repouso. O índice de sedimentação foi obtido recorrendo-se a seguinte expressão:

$$\%CI = \frac{V_S}{V_E} \times 100\% \quad (9)$$

Onde:

- %CI: índice de sedimentação percentual;
- V_S : Volume da camada de soro (ml);
- V_E : Volume total da emulsão (ml).

3.3.7. Determinação da viscosidade aparente

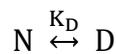
Para a determinação da viscosidade aparente recorreu-se ao viscosímetro Visco 88, no qual usou-se o sistema 3 (C30 DIN53019: 30 mm de diâmetro interno e 33 mm do externo), de cilindros coaxiais. Para cada medição, inseriu-se no sistema 17 ml de leite

previamente aquecido e fez-se a leitura da viscosidade a uma taxa de cisalhamento de aproximadamente 1194 s^{-1} .

3.3.8. Análise de dados

3.3.8.1. Modelação do processo de desnaturação

Para a modelação da desnaturação das proteínas do coco teve-se como base o Modelo de Transição de Dois Estados, no qual considera-se que durante o processo de desnaturação estão envolvidos apenas dois estados conformacionais, nativo (N) e desnaturado (D). Isto é:



Em primeiro lugar, traçou-se a curva da absorvância em função da temperatura de aquecimento, através da regressão não-linear dos dados experimentais no *software GraphPad Prism*.

Para a obtenção dos valores dos parâmetros envolvidos, recorreu-se ao seguinte procedimento (Figura 16):

- Cálculo das fracções das proteínas no estado nativo e desnaturado, pela regra da alavanca:

$$\begin{cases} f_N(T) = \frac{A_D(T) - A(T)}{A_D(T) - A_N(T)} \\ f_D(T) = \frac{A(T) - A_N(T)}{A_D(T) - A_N(T)} \end{cases} \quad (10)$$

onde:

- f_N e f_D : fracções das proteínas nos estados, nativo e desnaturado, respectivamente;
- $A(T)$, $A_N(T)$, $A_D(T)$: absorvância dos raios UV, absorvância no estado nativo e desnaturados obtidos a uma determinada temperatura, respectivamente. Para a obtenção das linhas de absorvância nos estados nativos e desnaturados, recorreu-se a extrapolação linear.

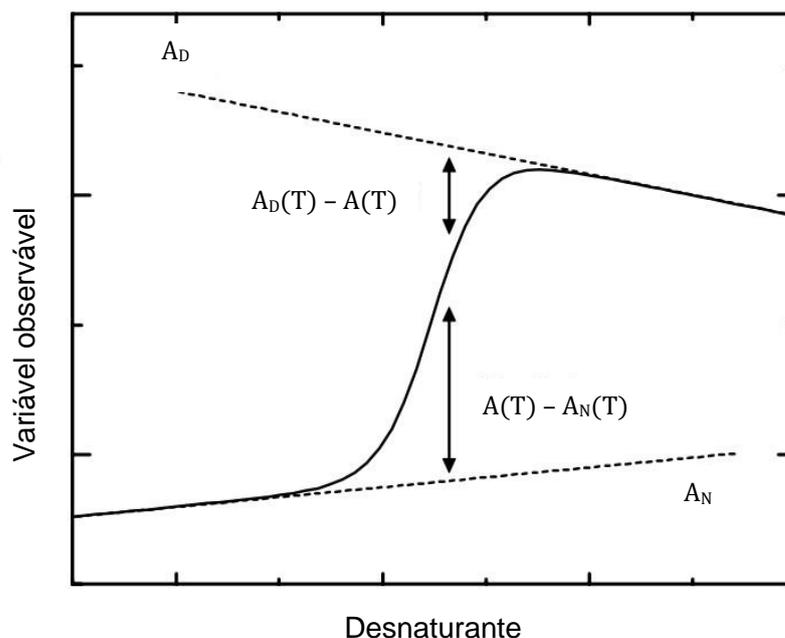


Figura 16: Processo cooperativo da desnaturação proteica.
Fonte: adaptado de Cooper, 1999.

- determinação da constante cinética da desnaturação:

$$K_{D,ap}(T) = \frac{f_D(T)}{f_N(T)} \quad (11)$$

esta é a constante de equilíbrio aparente, pois, para a sua obtenção recorreu-se às concentrações das proteínas e não às suas actividades (Poklar e Vesnaver, 2000).

- determinação da energia livre de Gibbs:

$$\Delta G^\circ_{ap}(T) = -RT \ln[K_{D,ap}(T)] \quad (12)$$

Onde: ΔG°_{ap} é a energia livre padrão aparente (kJ/mol); R é a constante dos gases ideais (8,3145 j/mol.K) e T a temperatura de medição (K).

3.3.8.2. Análise estatística

Os ensaios foram conduzidos em triplicatas com leite de coco fresco, isto é, analisado imediatamente após a sua extracção.

Os dados experimentais obtidos foram analisados com o auxílio dos seguintes programas: *XLSTAT* e *GrandPad Prism 9* para *Windows*. E apresentados na forma de média e desvio-padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extracção do leite de coco

Na operação de extracção do leite de coco obteve-se um rendimento de 37 g de leite para cada 100 gramas de polpa prensada.

Chambal (2015) extraiu o leite de coco e obteve como rendimento 40 g de leite para cada 100 g de polpa prensada. Depois da extracção, Cancel et al. (1971) obtiveram um rendimento de 55 g de leite para cada 100 g de polpa prensada.

Observa-se que o rendimento obtido no presente trabalho é próximo ao obtido por Chambal (2015) e menor ao rendimento reportado Cancel et al. (1971). Dentre os possíveis factores operacionais por de trás das diferenças no rendimento, estão: a eficiência da prensa, pressão aplicada durante a prensagem, redução do tamanho da polpa e temperatura da extracção.

Portanto, a prensa construída durante a realização do presente estudo apresenta uma eficiência comparável a das prensas comerciais, podendo ser usada para fins domésticos e laboratoriais. Para uma melhor avaliação e comparação da sua eficiência, é necessário que se adicione um medidor de pressão.

4.2. Caracterização físico-química do leite de coco fresco

A Tabela 7 mostra os teores de humidade, pH, proteínas e lípidos do leite de coco, obtidos como resultado dos ensaios experimentais realizados durante a materialização do presente trabalho. Na mesma tabela constam os resultados obtidos por outros autores.

Os resultados obtidos no presente trabalho são próximos aos obtidos pelo USDA (2015) e Anon. (1984), embora com um valor ligeiramente superior em relação ao teor de proteína. Esta diferença está associada ao facto da composição do leite de coco variar com a variedade, idade, ambiente de cultivo do coqueiro, práticas culturais, método de preparo e com as condições do processo de extracção como, a temperatura da extracção.

Tabela 7: Características físico-químicas do leite de coco.

	Humidade (%m/m)	Lípidos (%m/m)	Proteínas (%m/m)	pH
Autor	53,36 (± 0,40)	34,73 (± 0,52)	4,62 (± 0,28)	6,22 (± 0,01)
Chambal (2015)	50,0	39,8	2,8	6 ^a
USDA (2014)	54	35	3,6	
Anon. (1984)	53,9	34,7	3,60	

^a Raghavendra e Raghavarao, (2010); *Philippine Coconut Authority* (2014); Tangsuphoom e Coupland, (2005).

O pH obtido, 6,22 compara-se com o reportado por Raghavendra e Raghavarao (2010), e pela *Philippine Coconut Authority* (2014) e pode afirmar-se que o leite de coco é levemente ácido.

4.2.1. Distribuição do tamanho de gotículas de óleo do leite de coco

A distribuição do tamanho de gotículas apresentado na Figura 17 possui um formato log-normal. E, pode-se constatar que o leite de coco é uma emulsão polidispersa, que possui maior representatividade de diâmetros numéricos no intervalo de 1,86 μm – 2,48 μm e diâmetro ponderado pelo volume ($d_{4,3}$) em torno de 15 - 20 μm .

Tangsuphoom e Coupland (2005) relataram diâmetros médios ponderados pelo volume de aproximadamente 18 μm .

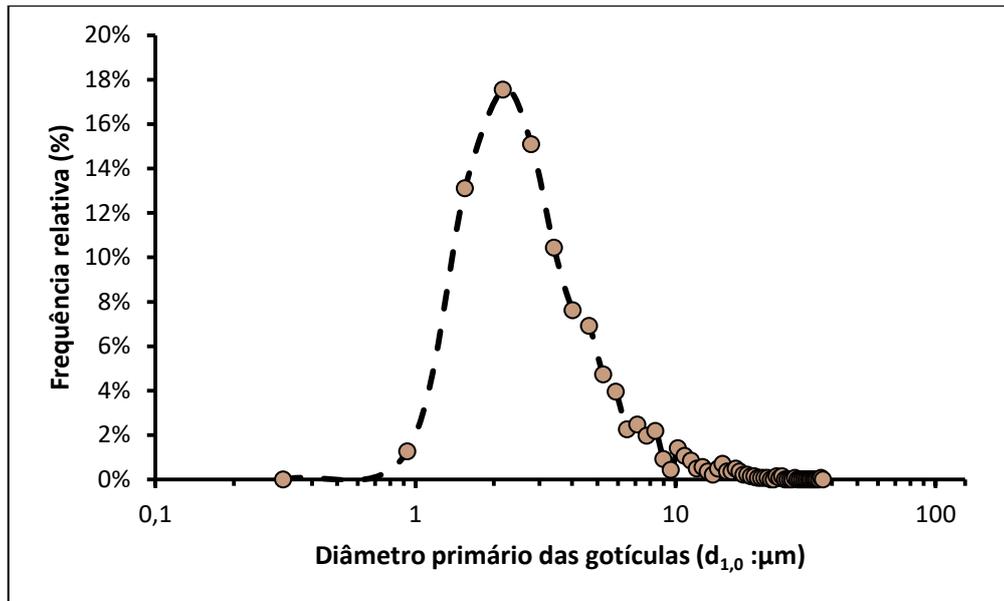


Figura 17: Distribuição do diâmetro primário das gotículas de óleo da emulsão do leite de coco fresco.

Os diâmetros apresentados pelas gotículas de óleo do leite de coco são consideravelmente maiores em relação aos diâmetros apresentados pelo leite de vaca homogeneizado (Figura 18) que se estimam em 0,1 – 0,5 μm quando tratado em homogeneizadores de alta pressão e, a volta de 5 μm quando fresco, saído da ordenha da vaca (Walstra et al., 2006). Estas diferenças explicam claramente porque o leite de vaca permanece estável por meses, enquanto o leite de coco só dura algumas horas antes de se separar espontaneamente em soro e creme. Chambal (2015) aponta a diferença entre as capacidades emulsificantes da α -caseína e das globulinas (fracção mais representativa) do leite de coco.

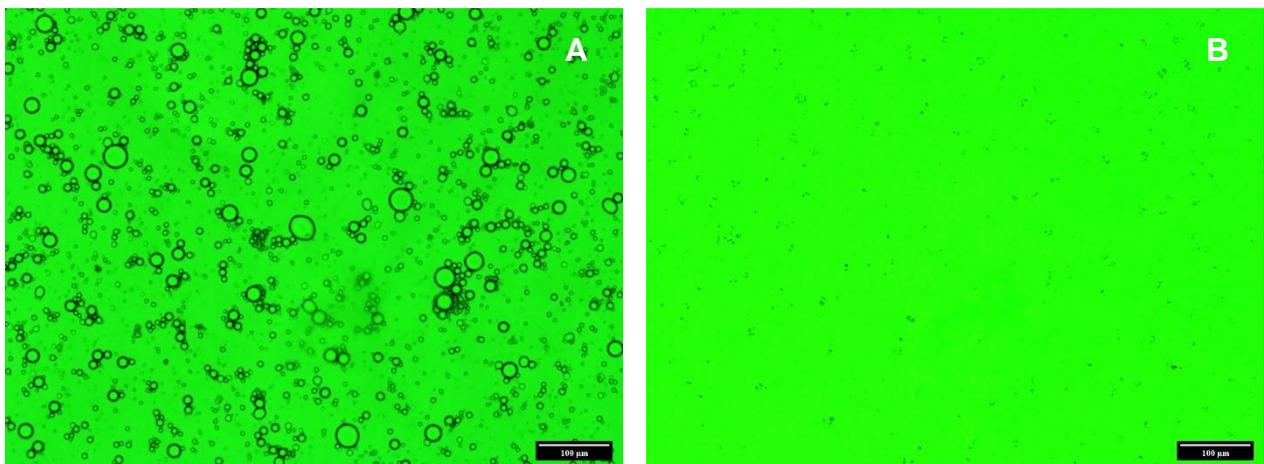


Figura 18: Imagens microscópicas das emulsões do leite de coco (A) e de vaca (B), obtidas pela objectiva 10x.

4.3. Determinação da variação da absorvância da proteína do soro com a temperatura de aquecimento: método de CBB-G250 *binding*

A instabilidade do leite de coco pode ser avaliada pela desintegração espontânea da emulsão, resultando na separação de fases do soro e creme, por sedimentação. A separação pode ocorrer também de forma forçada, pela centrifugação a altas velocidades de rotação. O soro é a fase que detém a maior fracção das proteínas do leite de coco. Entretanto, notou-se que a separação da emulsão do leite por centrifugação não só origina a separação do soro e creme, como também o surgimento de um precipitado proteico (Figura 19) que Chambal (2015) e outros autores já o reportaram em seus trabalhos.

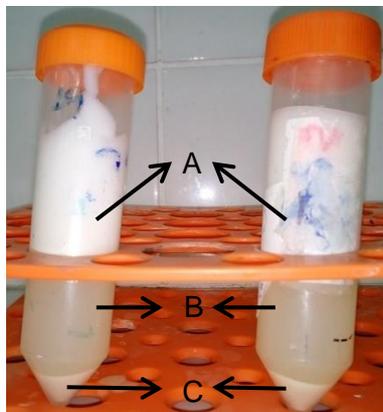


Figura 19: Leite de coco depois da centrifugação, separado nas camadas de creme (A), soro (B) e proteína precipitada (C).

Para a determinação da extensão de separação de fases resultante da centrifugação do leite de coco, recorreu-se ao índice de sedimentação e teve-se como resultado 30,78% da camada de soro.

Portanto, recorreu-se ao soro devido a sua baixa opacidade, baixa concentração de gotículas de óleo e baixa concentração de proteínas causada pela sua precipitação parcial, para a medição da variação da absorvância da radiação visível (595 nm) com a temperatura de aquecimento (Figura 20), das proteínas do coco na presença do reagente de Bradford.

Inicialmente, o aquecimento não causa uma variação considerável da absorvância das proteínas presentes no soro (40-60 °C e 40-70 °C, soro centrifugado e não centrifugado, respectivamente). Porém, quando caminhamos em direcção ao aumento da temperatura, observa-se que as curvas adoptam um perfil sigmoidal, que é

característico de processos cooperativos onde coexistem apenas dois estados conformacionais, nomeadamente: o estado nativo e desnaturado das proteínas.

A observação presente no parágrafo anterior, pode ser explicada pelo facto de a temperaturas baixas o aquecimento causar a pré-desnaturação reversível, porém, a altas temperaturas ocorrem mudanças irreversíveis na conformação molecular da proteína que dificultam o seu retorno ao estado nativo (Walstra, 2003) pelo arrefecimento súbito do soro contendo proteínas desnaturadas.

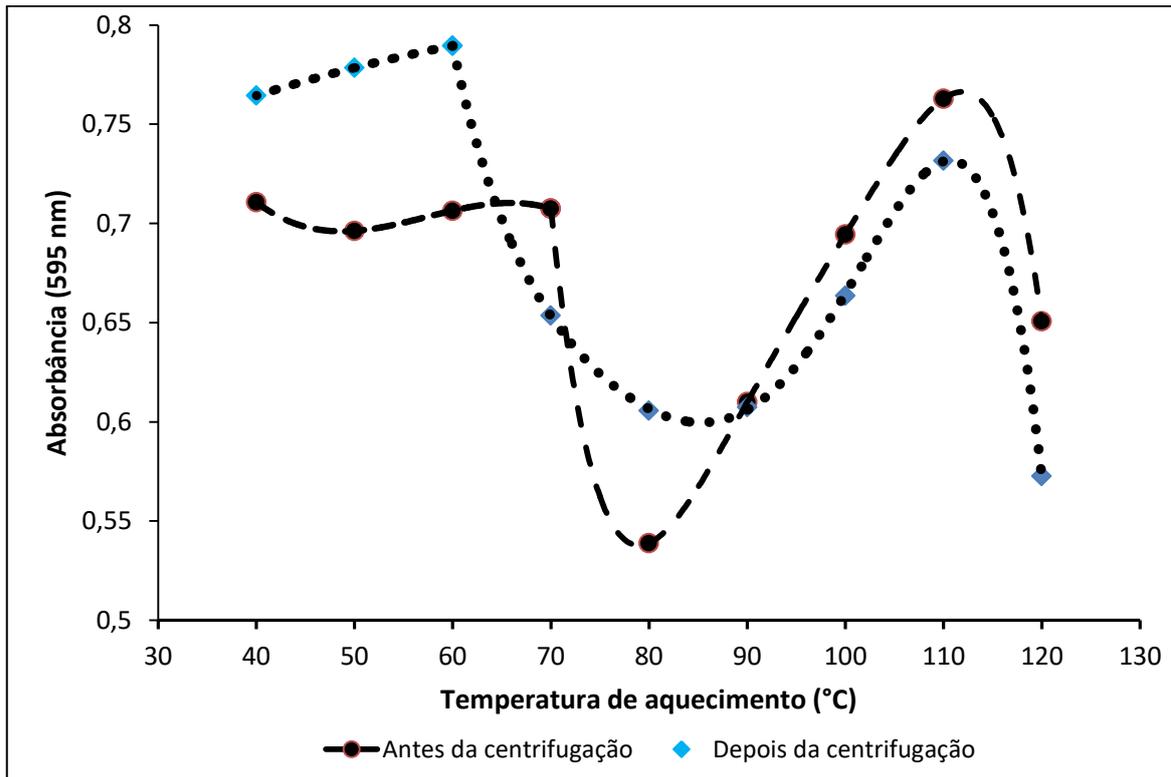


Figura 20: Variação da absorbância das proteínas do soro com o aumento da temperatura de aquecimento e pela centrifugação a 3790 rpm.

De acordo com o gráfico acima, a desnaturação das proteínas do soro não centrifugado tem início entre 70 e 80 °C e término entre 110 e 120 °C, enquanto as proteínas do soro centrifugado apresentam um início tardio da desnaturação, isto é, próximo a 85 °C.

Muito pouco foi relatado a respeito das transformações pré-desnaturacionais. Portanto, o decréscimo observado nessa região é causado pela mudança de conformação entre dois estados nativos.

O aumento da absorbância na região sigmoidal deve-se ao aumento de pontos de complexação com o reagente de Bradford, causado pelo desdobramento e destruição

das estruturas quaternárias e terciárias, como ilustrado na Figura 20, pois a estrutura secundária permanece, geralmente, inalterada (Chambal, 2015).

O decréscimo observado na região pós-desnaturacional deveu-se a agregação das proteínas.

4.3.1. Efeito da centrifugação na absorvância das amostras submetidas ao tratamento térmico

De acordo com a Figura 20, antes do processo de desnaturação, a centrifugação e agitação promovem o aumento dos valores da absorvância, devido a fibrilação das proteínas que aumenta o número de pontos de ligação com o complexante (Krzek et al., 2022; Arosio, et al., 2016; Png et al., 2016).

Ao longo e depois do processo de desnaturação (temperaturas superiores a 90 °C), a centrifugação causa a diminuição dos valores da absorvância, devido a sedimentação pela centrifugação de agregados suficiente e relativamente maiores de proteínas termicamente desnaturadas. Pois, todas as proteínas globulares passam pelo desdobramento, desnaturação e subsequente agregação quando aquecidas acima dos 70 °C (Liang, 2017).

4.3.2. Modelação da desnaturação das proteínas do leite pelo modelo de dois estados

Para a modelação da desnaturação das proteínas do soro, deu-se atenção ao soro não centrifugado, pois contém a maior fracção de proteínas do leite de coco, o que garante maior representatividade.

Este método é geralmente aplicado a proteínas específicas e o leite de coco possui mais de uma proteína: albumina, globulina e outras proteínas em menores quantidades (Kwon et al., 1996). Contudo, a fracção da globulina 11S compreende mais de 70% do total de proteínas presentes no soro (Patil e Bejankul, 2018).

Na Figura 21 encontra-se o gráfico da variação da energia livre de Gibbs com a temperatura de aquecimento.

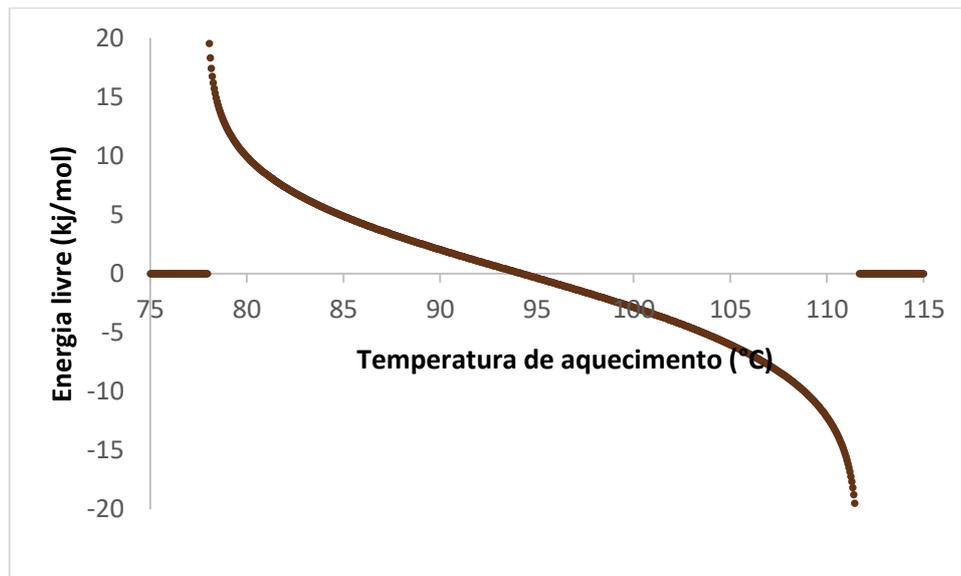


Figura 21: Variação da energia livre de Gibbs com a temperatura de aquecimento do soro.

Observa-se que a região de desnaturação térmica coincidiu com a região onde a curva da energia livre é linear, tal como foi sugerido por Hammarstrom e Jonsson (2013).

De acordo com o significado físico da energia livre de Gibbs³ e analisando o gráfico acima, para temperaturas inferiores a 94 °C, o processo de desnaturação global não é espontâneo e a temperaturas superiores, o processo é espontâneo.

Para uma análise quantitativa da desnaturação, como sugerido por Privalov (1979) fez-se a extrapolação das regiões de pré- e pós-desnaturação (Figura 22). O que implica alguns erros, no entanto, obteve-se um intervalo de desnaturação de 77 – 113 °C.

³ A variação da energia livre de Gibbs é uma medida da variação na entropia total do sistema e suas vizinhanças, à temperaturas e pressões constantes; os processos espontâneos são acompanhados por uma diminuição da energia livre (Atkins e de Paula, 2006).

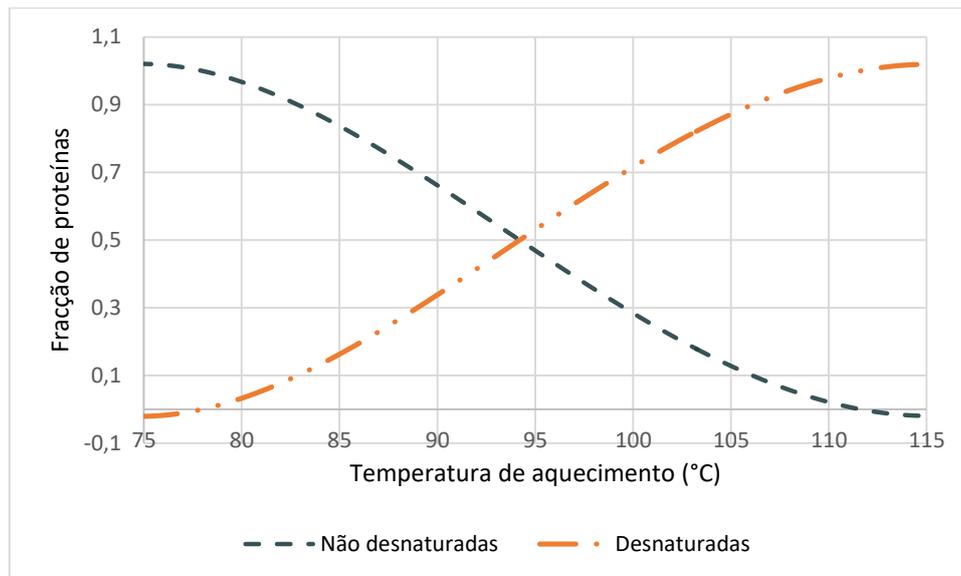


Figura 22: Variação das fracções de proteínas desnaturadas com a temperatura de aquecimento.

O gráfico acima apresenta a variação da concentração das proteínas nos estados, nativo e desnaturado. À temperaturas anteriores ao intervalo de desnaturação (77 – 113 °C), não observam-se variações das concentrações das proteínas com o aumento da temperatura, pois, não ocorrem mudanças conformacionais consideráveis.

No intervalo de desnaturação, observa-se o aumento da fracção de proteínas desnaturadas e conseqüentemente, a diminuição da fracção das proteínas não desnaturadas, pois a soma destas duas fracções é sempre igual à 1 (Poklar e Vesnaver, 2000).

À temperaturas posteriores ao intervalo de desnaturação, não observa-se a variação das fracções, pois toda proteína encontra-se desnaturada e, por isso, o aumento da temperatura apenas causa a formação de agregados das proteínas desnaturadas.

4.4. Mecanismos de instabilidade da emulsão

4.4.1. Floculação

Na Figura 23 encontram-se as imagens microscópicas das amostras de leite de coco submetidas a diferentes temperaturas de aquecimento.

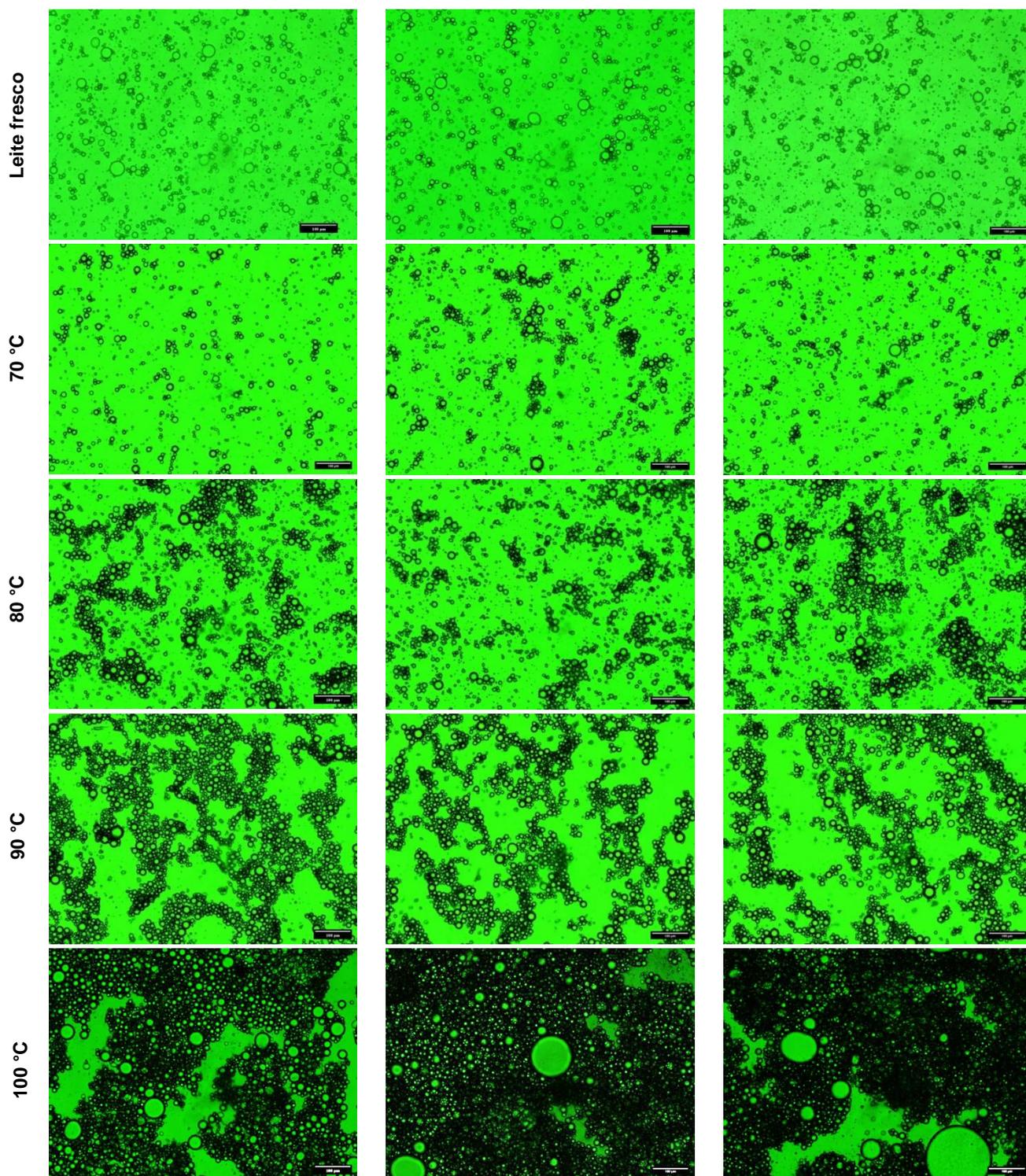


Figura 23: Imagens microscópicas do leite de coco fresco e aquecido a 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C.

Onde, não foi possível obter-se as imagens microscópicas do leite aquecido a 110 e 120 °C, devido a floculação.

Da figura anterior, pode-se observar que para temperaturas inferiores e iguais a 70 °C, o aumento da temperatura tem um efeito quase nulo na floculação da emulsão. Mas,

para temperaturas superiores, o aumento da temperatura causa o aumento da floculação.

As mesmas observações foram reportadas nas pesquisas realizadas por Tangsuphoom e Coupland (2005). Pois, as emulsões estabilizadas por proteínas, ao serem tratadas termicamente, floculam pela formação de pontes de floculação, de proteínas adsorvidas em mais de uma gotícula (Dickinson, 2009), como ilustrado na Figura 24.

Por outro lado, a desnaturação causa o aumento do número de pontos hidrofóbicos e sulfídricos expostos a fase aquosa. Esta exposição leva ao aumento da atracção entre os grupos hidrofóbicos e formação de ligações dissulfídicas entre proteínas adsorvidas em gotículas diferentes (McClements, 2004).

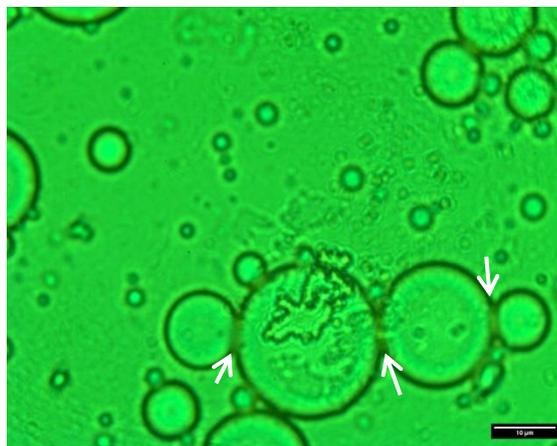


Figura 24: Pontes de floculação entre as gotículas de óleo. A imagem foi obtida pela objectiva de 100x.

Tendo em conta que o intervalo de desnaturação é também representado por temperaturas superiores a 70 °C, pode-se concluir que a floculação deve-se a agregação de gotículas cobertas por proteínas termicamente desnaturadas. E, quanto maior é o grau do desdobramento, maior é a extensão da floculação.

4.4.2. Coalescência

A Figura 25 mostra o efeito do aumento da temperatura de aquecimento na distribuição do diâmetro primário ($d_{1,0}$) das gotículas de óleo da emulsão do leite de coco. Onde, não foi possível determinar o tamanho das amostras aquecidas a temperaturas iguais e superiores a 100 °C, devido a floculação excessiva.

Observa-se que para temperaturas inferiores e iguais a 70 °C, à semelhança da floculação, o aumento da temperatura tem um efeito quase nulo na variação do

diâmetro das gotículas. Mas, para temperaturas superiores a 70 °C, o aumento da temperatura de aquecimento causa um ligeiro aumento no diâmetro primário das gotículas (coalescência), evidenciada pelo ligeiro deslocamento das modas para a direita. Isto é, registou-se um aumento de diâmetro de aproximadamente 2,17 µm (para o leite não aquecido) até 3,68 µm (leite aquecido a 90 °C).

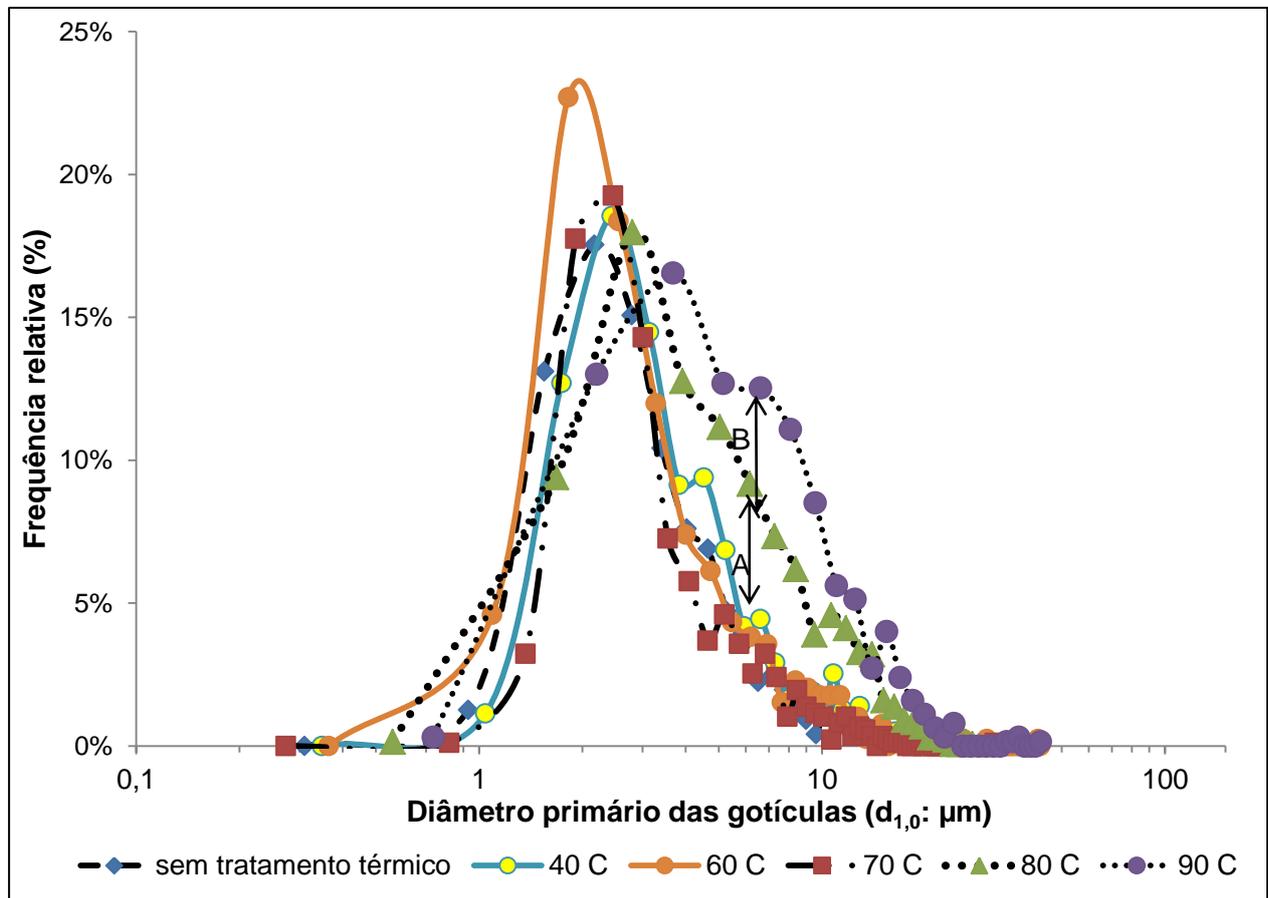


Figura 25: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo de amostras de leite de coco submetidas a diferentes temperaturas de aquecimento.

A coalescência está também evidenciada pelas elevações A e B (Figura 25) e pelo aumento dos diâmetros médios das gotículas observado na Tabela 8, que indicam que a fracção de gotículas maiores aumenta com a elevação da temperatura de aquecimento. As imagens microscópicas presentes na Figura 23, suportam a presente constatação. Embora este aumento não tenha sido suficiente para causar um deslocamento significativo da moda.

Tabela 8: Variação do tamanho médio das gotículas com o aumento da temperatura de aquecimento.

Temperatura (°C)	d _{1,0} (µm)
Leite fresco	4,59
40	4,92
60	4,76
70	4,35
80	6,76
90	7,97

Geralmente, a coalescência e a floculação ocorrem em simultâneo, podendo um ser mais expressivo que o outro (Tangsuphoom e Coupland, 2009). No presente estudo, constata-se que a floculação é mais expressiva que a coalescência.

Se as gotículas de óleo mantiverem contacto prolongado devido a floculação ou sedimentação, estas estarão mais susceptíveis a coalescência (McClements, 2004). Portanto, com o aumento do tamanho dos flóculos resultante do aumento da temperatura, na região de desnaturação, aumenta o número de pontos de contacto entre as gotículas, o que aumenta a probabilidade de ruptura do filme interfacial. Associa-se a esta observação, a redução da resistência do filme durante o aquecimento.

4.4.3. Índice de sedimentação

A variação do índice de sedimentação das amostras de leite de coco em função da temperatura e tempo de banho está ilustrada na Figura 26. Onde, para temperaturas inferiores ou iguais a 70 °C, o aumento da temperatura possui pouca influência na variação do índice de sedimentação. Mas, para temperaturas superiores à 70 °C, o aumento da temperatura causa o aumento da estabilidade cinética da emulsão.

A floculação, promovida pela desnaturação térmica, retarda a sedimentação pela formação de uma rede tridimensional de flóculos interconectados (Figura 23), o que impede a movimentação individual de flóculos e gotículas (McClements, 2016), e também pela redução da diferença de densidades entre as fases, pois os flóculos prendem uma quantidade de água no seu interior (Tangsuphoom e Coupland, 2005).

Para temperaturas inferiores ao intervalo de desnaturação, a emulsão separa-se rapidamente devido aos grandes diâmetros de suas gotículas (1,86 µm – 2,48 µm), isto

é, quanto maior for o tamanho das gotículas, maior é a influência da gravidade sobre a estabilidade da emulsão.

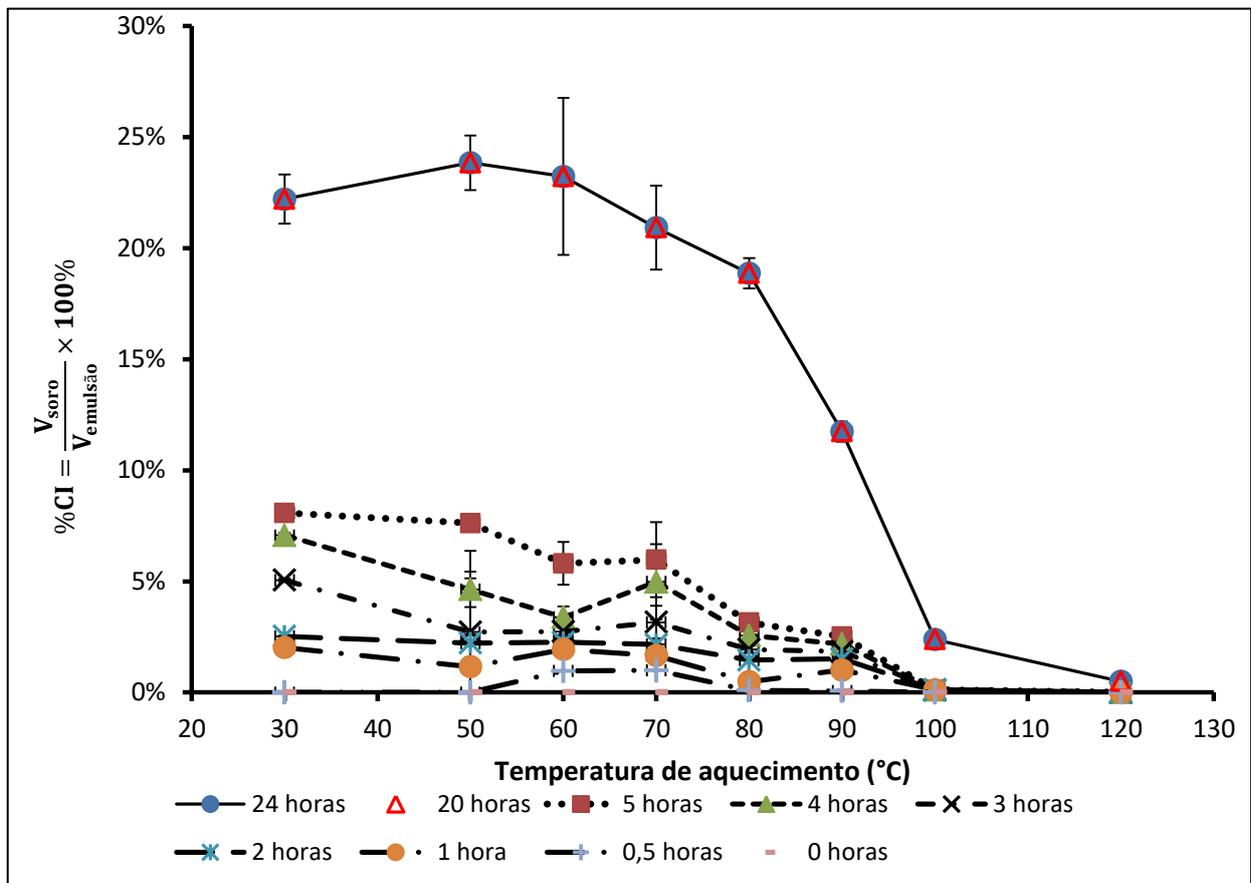


Figura 26: Variação do índice de sedimentação da emulsão do leite de coco com o aumento da temperatura aquecimento e tempo de incubação.

Embora uma emulsão que contenha pequenas gotículas de óleo possua elevada estabilidade a sedimentação em relação às emulsões constituídas por gotículas relativamente maiores (Hamad, 2011). Pode se observar que com o aumento da taxa coalescência (80 e 90 °C), observada na Figura 25, ocorre a diminuição do índice de sedimentação. Pois, a rede contínua de flóculos formada prende as gotículas de óleo, inibindo a sua sedimentação e, contrabalançando o efeito da coalescência (diferença de densidades).

O leite aquecido a 120 °C apresentou uma aparência diferente das outras amostras, isto é, formaram-se grandes coágulos brancos, provavelmente de gotículas de óleo e proteínas, dispersos na fase contínua, o que indica a completa desestabilização da emulsão e sustenta o comportamento da desnaturação observado no gráfico da Figura 20. Pois, o aquecimento de dispersões com alto teor de proteínas aumenta a taxa de

agregação das proteínas e, portanto, a formação de grandes agregados é favorecida (Raikos, 2009).

Pode se constatar que apesar da emulsão ter se separado em duas fases distintas, a fase aquosa obtida é levemente túrbida e sem qualquer indicio da precipitação proteica (Figura 15). Esta situação é comumente encontrada emulsões flocculadas onde a fracção das gotículas maiores formam flóculos e as menores formam uma camada de soro túrbida no fundo (McClements, 2007).

A observação anterior sugere que as proteínas permaneceram no creme, o que é uma indicação da alta afinidade existente entre as proteínas do leite e as gotículas de óleo (Birose et al., 1963). Isto é, as proteínas agem como agentes nucleantes na formação dos flóculos (Tangsuphoom e Coupland, 2008b).

4.5. Efeito do aquecimento na viscosidade da emulsão

A figura abaixo mostra a variação da viscosidade com o aumento da temperatura de aquecimento. Observa-se que para temperaturas inferiores e iguais a 70 °C (50 e 60 °C), o aumento da temperatura não leva a variação da viscosidade, porém, quando aquecido a 80, 90 e 100 °C, observa-se uma significativa elevação da viscosidade.

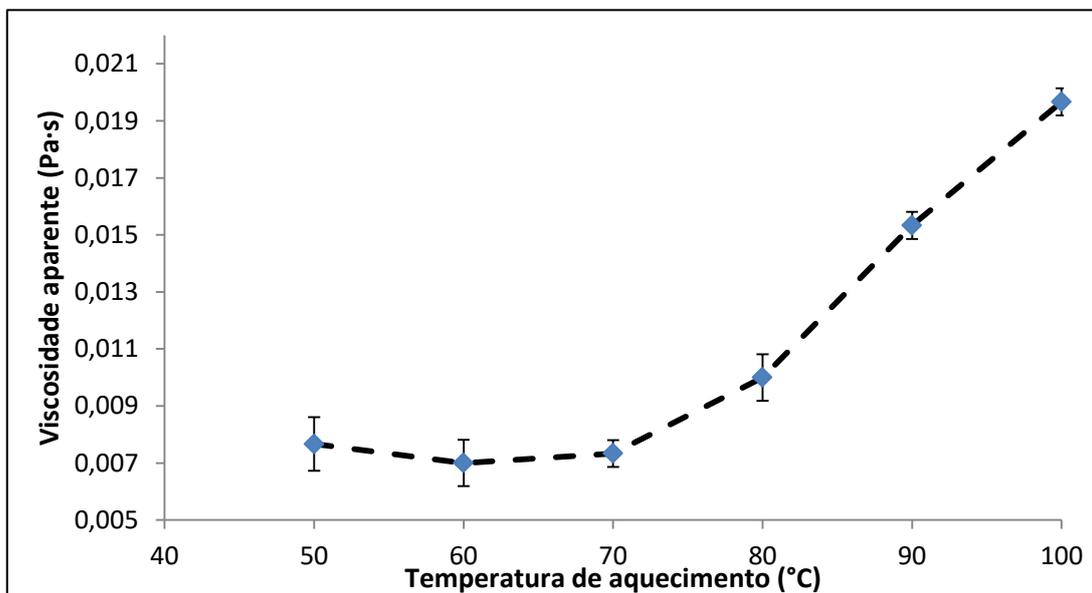


Figura 27: Efeito do aquecimento na viscosidade do leite de coco, à uma taxa de cisalhamento de 1194 s^{-1} .

Pela análise dos gráficos da Figura 26 e Figura 27, pode se constatar que com o aumento da viscosidade ocorre a diminuição da velocidade de sedimentação, ou seja, do índice de sedimentação. A observação anterior está relacionada ao facto de a

floculação (Figura 23) poder levar ao aumento da viscosidade da emulsão, pelo aumento número de gotículas unidas por interações hidrofóbicas, o que implica maior força ou energia necessária para quebrar as uniões.

4.6. Mudanças na microestrutura da emulsão do leite de coco

A mudança na microestrutura da emulsão pode ser explicada pela teoria de transição de fases de sistemas coloidais, apresentado na secção 2.5.4.

O leite de coco possui um teor de lípidos relativamente baixo em relação a concentração crítica (~60%) de transição para o estado vítreo (Chambal, 2015).

Portanto, para temperaturas inferiores ao intervalo de desnaturação, observou-se uma grande variação do índice de sedimentação com o tempo, que a nível microscópico pode ser explicado pela liberdade que as gotículas possuem de movimentar-se ao longo da fase aquosa (estado ergodico), porém, com a desnaturação ocorreu a diminuição da velocidade de movimentação das gotículas (passagem para o estado não-ergodico), evidenciada pela diminuição da variação do índice de sedimentação com o tempo (Figura 26) e pela formação da rede tridimensional de gotículas floculadas (Figura 23), embora a preparação das amostras para a observação microscópica possa ter comprometido a integridade da rede.

Convém também ressaltar que, com a desnaturação ocorre destruição da estrutura quaternária, isto é, a quebra das proteínas do coco em suas subunidades (evidenciado pelo aumento da absorvância) e, conseqüentemente, o aumento da concentração de biopolímeros existentes na emulsão. Do diagrama de fases apresentado por Sciortino (2002) na Figura 9, observa-se que quanto maior for a quantidade de polímeros ou proteínas não adsorvidas associado ao arrefecimento, maiores serão as interações atractivas, o que levou a formação de flóculos e conseqüentemente de uma emulsão-gel particulado, promovida pelas interações hidrofóbicas atractivas de proteínas adsorvidas nas gotículas de óleo.

5. CONCLUSÕES

Terminado o estudo do efeito da desnaturação térmica e parcial das proteínas na estabilidade física da emulsão do leite de coco (53,36% de humidade e 34,73% de lípidos), constatou-se que:

- A prensa construída para a extracção do leite de coco pode ser utilizada para fins domésticos e laboratoriais, pois obteve-se um rendimento satisfatório de 37 g/100 g de polpa prensada.
- A desnaturação térmica e parcial das proteínas promove o aumento da estabilidade cinética da emulsão do leite de coco em 19,83% para o leite aquecido a 100 °C. Evidenciando o potencial das proteínas parcialmente desnaturadas para a estabilização cinética da emulsão, em substituição dos aditivos actualmente usados;
- As proteínas do leite de coco apresentam um intervalo global de desnaturação térmica com início entre 70 e 80 °C, e termino entre 110 e 120 °C;
- A desnaturação parcial causa a flocculação das gotículas de óleo presentes na emulsão e, conseqüentemente, o aumento da viscosidade da emulsão;
- A desnaturação parcial causa um ligeiro aumento do tamanho das gotículas de óleo (coalescência de 1,5 µm para o leite aquecido a 90 °C);
- O aquecimento do leite de coco acima do intervalo de temperatura de desnaturação pode causar a desestabilização completa da emulsão pela formação de coágulos visíveis a olho nu.

6. RECOMENDAÇÕES

Com os resultados obtidos e limitações observadas durante a realização do trabalho, recomenda-se para os estudos futuros que se façam:

- Análises do efeito da desnaturação térmica seguida da homogeneização a altas pressões na estabilidade física da emulsão do leite de coco, de modo a minimizar-se os efeitos dos tamanhos das gotículas na estabilidade da emulsão;
- Ensaio calorimétrico da desnaturação das proteínas do leite de coco (pelo *Differential Scanning Calorimeter* - DSC), por forma a ter-se mais informações sobre como a desnaturação influencia a estabilidade da emulsão do leite de coco;
- Caracterização das proteínas do coco pelo método de SDS-PAGE, para que se possa fazer a associação da composição das proteínas do leite de coco com as suas propriedades emulsificantes.
- Estudos do efeito do aquecimento do leite na variação dos parâmetros reológicos (viscosidade, módulo de elasticidade, taxa e tensão de cisalhamento), pois está intimamente ligado as alterações na textura do leite da emulsão.

7. BIBLIOGRAFIA

7.1. Referência bibliográfica

1. Anon. (1984) - Coconut cream, raw NDB no. 12115, Nutrition Data Base, University of Minnesota, USA.
2. Association of Official Analytical Chemists: AOAC (1990) – Official Methods of Analysis, vol. 1, 15th ed., AOAC Inc., Arlington.
3. Arosio, P., Cerdervall, T., Knowles, T. and Linse, S. (2016) – Analysis of the Length Distribution of Amyloid Fibrils by Centrifugal Sedimentation, *Analytical Biochemistry*, vol. 504, p.7-13.
4. Atkins, P. and de Paula (2006) – Atkins Physical Chemistry, 8th ed., W. H. Freeman and Company, New York.
5. Birosel, D., Gonzales, A. and Santos, M. (1963) - The Nature and Properties of the Emulsifier System of Oil Globules in Coconut Milk and Cream, *The Philippine Journal of Science*, vol. 92, n^o 1, p.1-15.
6. Brainer, M. (2021) - Coco: Produção e Mercado, *Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE*, n^o 206, p. 1-13.
7. Cancel, L., Rivera-Ortiz, J. and Santos-Sanches, M. (1971) - Effect of the Amount of Water on the Extraction of Coconut Milk at Two Temperature Ranges. *J. Agr. Univ. Pro*, vol. 55, n^o 2, p.167-173.
8. Cao, Y., Zhao, J. and Xiong, Y. (2015) - Coomassie Brilliant Blue-binding: A Simple and Effective Method for the Determination of Water Insoluble Protein Surface Hydrophobicity, *The Royal Society of Chemistry*, vol. 8, n^o 4, p.790-795.
9. Chambal, B. (2015) - Exploring the Functionality of Coconut Proteins. [Doctoral Thesis (compilation)], Department of Food Technology, Engineering and Nutrition, Lund University.
10. Chan, E. and Elevitch, C. (2006) – *Cocos nucifera L. (Coconut): Arecaceae (palm family)*. In: “Species Profiles for Pacific Islands Agroforestry. Permanent Agriculture Resources”, C. Elevitch (ed.), Hawaii, p.1-27.
11. Chantrapornchai, W., Clydesdale, F. and McClements, D. (2008) - Understanding Colors in Emulsions – In “Color Quality of Fresh and Processed Foods”, Culver and Wrolstad (eds), American Chemical Society, Washington DC, p. 365-387.
12. Chu, M. and Robledo, D. (2022) – An Investigation on the Effects of Varying Temperatures on Gelatin Denaturation in Response to Enzymatic Reactions from Extracts, *Journal of Industrial Biotechnology*, vol. 3, n^o 1, p.10-18.

13. Cooper, A. (1999) – Thermodynamics of Proteins Folding and Stability, *JAI Press Inc.*, vol. 2, p.217-270.
14. da Silva, T., Mulder, A. e Santana, I. (2020) - Coqueiro (Cocos nucifera L.) e Produtos Alimentícios Derivados: Uma Revisão Sobre Aspectos de Produção, Tecnológicos e Nutricionais, *Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos*, vol. 2, p. 80-101.
15. Damodaran, S. (2008) – Amino acids, Peptides, and Proteins – In: “Fennema’s Food Chemistry”, S. Damodaran, K. Parkin, and O. Fennema (eds), 4 ed., CRC Press, New York, p.217-330.
16. Dawson, K. (2002). The Glass Paradigm for Colloidal Glasses, Gels, and Other Arrested States Driven by Attractive Interactions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 7, nº 3, p.218-227.
17. de Aragão, W., Reis, C., W., Siqueira, E., Cruz, E., Tupinambá, E., de Abreu, F., de Paula, F., Ribeiro, F., Resende, J., de Alencar, J., Filho, J., Cabral, L., Cuenca, M., Nunes, M., Rosa, M., Saggin Júnior, O. e Moreira, W. (2002) – Coco: Pós-colheita, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
18. de Lima, M. (2014) - Caracterização Reológica e Microestrutural de Emulsões Água em Óleo para Uso Alimentar.[Tese de Doutorado, Instituto de Investigação e Formação Avançada], Química, Universidade de Évora.
19. de Villiers, M. (2009) - Surfactants and Emulsifying Agents. In: “A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice”, *J. Thompson (ed.)*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.251-256.
20. Devnani B., Ong, L., Kentish, S. and Gras, S. (2020) – Heat Induced Denaturation, Agregation and Gelation of Almond Proteins in Skim and Full Fat Almond Milk. *Food Chemistry*, vol. 325, p.1-10.
21. Dickinson, E. (2009) – Hydrocolloids and Emulsions Stability. In “Handbook of Hydrocolloids”, G. Phillip and P. Williams (eds), Woodhead Publishing Limited, New Delhi, p.23-47.
22. Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The Structuring of Soft Solids with Protein-Stabilized Oil Droplets. *Food hydrocolloids*, vol. 28, nº 1, p.224-241.
23. Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W., Harley, M. and Lewis, P. (2008) - Genera Palmarum: The Evolution and Classification of Palms, Royal Botanic Gardens, Richmond-UK.

24. Eccleston, G. (2013) - Emulsions and creams. In "Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines", M. Aulton and K. Taylor (eds.), Elsevier, p.446-475.
25. FAOSTAT, 15 de Julho de 2023.
26. Farjami, T. and Madadlou, A. (2019) - An Overview on Preparation of Emulsion-filled Gels and Emulsion Particulate Gels, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 86, p. 85-94.
27. Foale, M. and Harries, H. (2009) – Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). In: "Special Crops for Pacific Island Agroforestry", C. Elevitch (ed.), Permanent Agriculture Resources, Hawaii, p.1-24.
28. Friberg, S., Larsson, K. and Sjöblom, J. (2004) – Food Emulsions, 4th ed., CRC Press, New York.
29. Hagenmaier, R., Mattil, K. and Cater, C. (1974). Dehydrated Coconut Skim Milk as a Food Product: Composition and Functionality. *Journal of Food Science*, vol. 39, p. 196–199.
30. Hamad, A (2011) - The Physical Stability of Coconut Milk Emulsion, *Techno*, vol. 12, n^o 1, p. 19-24.
31. Hammarstrom, P. and Jonsson, B. (2013) - Protein Denaturation and the Denatured State, In: "eLS", John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, p.1-7.
32. <https://tocomendo.com.br/creme-de-coco/>, 5 de Setembro de 2023.
33. Instituto Adolfo Lutz (2008) – Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4^a ed., Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.
34. Jackson, S. and Fersht, A. (1991) - Folding of Chymotrypsin Inhibitor 2. 1. Evidence for a Two-State Transition, *Biochemistry*, vol.30, n^o 43, p.10428-10435.
35. Krzek, M., Stroobants, S., Gelin, P., De Malsche, W., Maes, D. (2022) - Influence of Centrifugation and Shaking on the Self-Assembly of Lysozyme Fibrils, *Biomolecules* vol.12, n^o 1746, p.1-13.
36. Kwon, K., Park, K. and Rhee, K. (1996) - Fractionation and Characterization of Proteins from Coconut (*Cocos nucifera* L.), *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 44, n^o 7, p. 1741-1745.
37. Kwok, K., Liang, H. and Niranjana, K. (2002) – Optimizing Conditions for Thermal Processing of Soy Milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 50, n^o 17, p.4834-4838.

38. Lédo, A., Passos, E., Fontes, H., Ferreira, J., Talamini, V. e Vandrane, W. (2018) – Advances in Coconut Palm Propagation, *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 41, nº 2, p. 1-14.
39. Liang, Y., Matia-Merino, L., Gillies, G., Patel, H., Ye, A. and Goldin, M. (2017) - The Heat Stability of Milk Protein-Stabilized Oil-in-Water Emulsions: A Review, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 28, p.63-73.
40. Lima, E., Sousa, C., Meneses, L., Ximenes, N., Santos Júnior, M., Vasconcelos, G., Lima, N., Patrocínio, M., Macedo, D. and Vasconcelos, S. (2015) - Cocos nucifera (L.) (Arecaceae): A Phytochemical and Pharmacological Review, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 48, nº 11, p. 953–964;
41. Makhatadze, G. (2005) – Thermal Unfolding of Proteins Studied by Calorimetry. In: “Protein Folding Handbook”, J. Buchner and T. Kiefhaber (eds), Wiley-VCH, Weinheim, p.22-69.
42. Martins, R. e de Jesus Junior, A. (2014) – Produção e Comercialização do Leite de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.
43. McClements, D. (2004) - Protein-stabilized emulsions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 9, p.305-313.
44. McClements, D. (2007) - Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, p.611-649.
45. McClements, D. (2016) – Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 3rd ed., CRC Press, New York.
46. McClements, D., Bai, L. and Chung, C. (2017) - Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions, *The Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 8, p. 205-236.
47. McMurry, J. (2008) – Química Orgânica, 7^a ed., Cuage Learning Editores, México.
48. Mewis, J., and Wagner, N. (2012) - Colloidal suspension rheology, Cambridge University Press, New York.
49. Morrison, J. and Boyd, R. (2008) – Química Organica, 5^a ed., Addison Wesley, New York.
50. Mulvihill, D. and Donovan, M. (1987) – Whey Proteins and their Thermal Denaturation: A Review, *Irish Journal of Food Science and Technology*, vol. 11, nº 1, p. 43-75.

51. Onsaard, E., Vittayanont, M., Srigan, S. and McClements, D. J. (2005) - Properties and Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Coconut Skim Milk Proteins, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 53, n^o 14, p. 5747-5753.
52. Osborne, T. (1909) – The Vegetable Proteins, Longman-Green and Co., London.
53. Patil, U., and Benjakul, S. (2017) - Characteristics of Albumin and Globulin from Coconut Meat and their Role in Emulsion Stability without and with Proteolysis. *Food hydrocolloids*, vol. 69, 220-228.
54. Patil, U. and Benjakul, S. (2018) – Coconut Milk and Coconut Oil: Their Manufacture Associated with Protein Functionality, *Journal of Food Science*, vol. 83, n^o 8, p. 2019-2027.
55. Petekidis, G., Wagner, N. and Mewis, J. (2021) - Rheology of Colloidal Glasses and Gels. *Theory and Applications of Colloidal Suspension Rheology*, p.173-226.
56. Philippine Coconut Authority (2014) - Coconut Processing Technologies: Coconut Milk, FPDD Guide n^o 2.
57. Png, G., Falconer, R. and Abbott, D. (2016) - Tracking Aggregation and Fibrillation of Globular Proteins Using Terahertz and Far-Infrared Spectroscopies, *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, vol. 6, n^o 1, p.1-9.
58. Poklar, N. and Vesnaver, G. (2000) - Thermal Denaturation of Proteins Studied by UV Spectroscopy, *Journal of Chemical Education*, vol. 77, n^o 3, p. 380-382.
59. Privalov, P. (1979). Stability of Proteins: Small Globular Proteins, *Advances Protein Chemistry*, vol. 33, p.167-241.
60. Qian, F., Sun, J., Cao, D., Tuo, Y., Jiang, S. and Mu, G. (2017) – Experimental and Modeling Study of the Denaturation of Milk Protein by Heat Treatment, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, vol. 37, n^o 1, p. 44-51.
61. Raghavendra, S. and Raghavarao, K. (2010). Effect of Different Treatments for the Destabilization of Coconut Milk Emulsion, *Journal of Food Engineering*, n^o 97, p.341-347.
62. Raikos, V. (2009) – Effect of the Heat Treatment on the Milk Protein Functionality at Emulsion Interface: A Review, *Food Hydrocolloids*, vol. 24, p. 259-265.
63. Romulo, A. (2022) – Food Processing Technologies: Aspects on Plant-Based Milk Manufacturing. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 1, n^o 1059, p.1-8.
64. Sciortino, F. (2002). One Liquid, Two Glasses. *Nature materials*, vol. 37, n^o 1, 145-146.

65. Seow, C. and Gwee, C. (1997) - Coconut Milk: Chemistry and Technology, *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 32, p. 182-201.
66. Solomons, T. and Fryhle, C. (2011) – Organic Chemistry, Wiley & Sons, New Jersey.
67. Tangsuphoom, N. and Coupland, J. (2005) – Effect of Heating and Homogenization on the Stability of Coconut Milk Emulsions, *Journal of Food Science*, vol. 70, nº 8, p. 466-470.
68. Tangsuphoom, N. and Coupland, J. N. (2008a) – Effect of pH and Ionic Strength on the Physicochemical Properties of Coconut Milk Emulsions, *Journal of Food Science*, vol. 73, nº 6, p. 274-280.
69. Tangsuphoom, N. and Coupland, J. N. (2008b) – Effect of Surface-Active Stabilizers on the Microstructure and Stability of Coconut Milk Emulsions, *Food Hydrocolloids*, vol. 22, p. 1233-1242.
70. Tangsuphoom, N. and Coupland, J. (2009) – Effect of Thermal Treatments on the Properties of Coconut Milk Emulsions Prepared with Surface-Active Stabilizers, *Food Hydrocolloids*, vol. 23, p. 1792-1800.
71. [The Number of Countries in the World \(thoughtco.com\)](#), 5 de Agosto de 2023.
72. USDA. (2014). USDA National Nutrient Database for Standard Reference.
73. Walstra, P. (2003) – Physical Chemistry of Foods, Marcel Dekker, New York.
74. Walstra, P., Wouter, J. and Geurts, T. (2006) – Dairy Science and Technology, 2nd ed., Taylor & Francis Group, New York.
75. Walstra, P. and van Vliet, T. (2008) – Dispersed Systems: Basic Considerations – in “Fennema’s Food Chemistry”, S. Damodaran, K. Parkin and O. Fennema (eds), CRC Press, New York.
76. Warwick, D., Leal, E., Passos, E., Cintra, F., Amorim, J., Sobral, L., Siqueira, L., Cuenca, M., Resende, M. e de Aragão, W. (2006). A cultura do Coco, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
77. Zaaboul, F., Raza, H., Cao, C. and Yuanfa, L. (2019) – The Impact of Roasting, High Pressure Homogenization and Sterilization on Peanut Milk and its Oil Bodies. *Food Chemistry*, vol. 280, p.270-277.
78. [Zambézia terá fábrica de processamento de coco - Jornal Notícias \(jornalnoticias.co.mz\)](#), 3 de Julho de 2023

7.2. Outra bibliografia consultada

79. Bradford, M. (1976) - A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p.248-254.
80. Claesson, P., Blomberg, E. and Poptoshev, E. (2003) - Surface Forces and Emulsion Stability. In: "Food Emulsions", S. Friberg, K. Larsson and J. Sjoblom (eds), CRC Press, New York, p.257-299.
81. Marinho, S. (2010) – Laboratório de BQ II: 2010/2011, Universidade de Lisboa: Faculdade de Farmácia, Lisboa.
82. Nielsen, S. (2010) - Food Analysis Laboratory Manual, 2^a ed., Springer, USA.
83. Naik, A., Raghavendra, S. and Raghavarao, K. (2012) - Production of Coconut Protein Powder from Coconut Wet Processing Waste and its Characterization, *Appl Biochem Biotechnol*, nº 167, p. 1290-1302.
84. Onsaard, E., Vittayanont, M., Srigam, S. and McClements, D. J. (2006) - Comparison of Properties of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Coconut Cream Proteins with those Stabilized by Whey Protein Isolate, *Food Research International*, vol. 39, p. 78-86.
85. Privalov, P. (1982). Stability of Proteins: Proteins which do not Present a Single Cooperative System, *Adv. Protein Chem.*, vol. 35, p. 1-104.

Apêndice

Anexo 1: Prensa hidráulica



Figura A1-1: Prensa hidráulica usada para a extracção do leite de coco.

Anexo 2: Extracção do leite de coco

Tabela A2 - 1: Balanço mássico da operação de extracção do leite de coco.

Características do coco analisado	Réplicas						Média (%)	Desvio Padrão
	1		2		3			
Diâmetro maior (cm)	86,61	-	82,77	-	83,45	-	84,28	2,05
Diâmetro menor (cm)	82,33	-	79,96	-	79,08	-	80,46	1,68
Água (g)	33,59	10,51%	51,45	16,35%	56,98	17,10%	14,65	3,61
Endocarpo (g)	106,84	33,42%	90,39	28,73%	134,73	40,43%	34,19	5,89
Película (g)	22,14	6,92%	28,65	9,10%	17,15	5,15%	7,06	1,98
Endosperma (g)	157,16	49,15% (100,00%)	144,16	45,82% (100,00%)	124,39	37,33% (100,00%)	44,10 (100,00)	6,10 (0,00)
Leite extraído (g)	59,72	18,68% (38,00%)	50,46	16,04% (35,00%)	47,27	14,18% (38,00%)	16,30 (37,00)	2,26 (1,73)
Fibra (g)	97,44	30,48% (62,00%)	93,70	29,78% (65,00%)	77,12	23,14% (62,00%)	27,80 (63,00)	4,05 (1,73)
Coco sem mesocarpo (total) (g)	319,73	100,00%	314,65	100,00%	333,25	100,00%	100,00	0,00

- Valores entre parenteses referem-se às quantidades de fibra e leite em relação à massa do endosperma sólido.

Anexo 3: Caracterização físico-química do leite de coco fresco.

Tabela A3 - 1: Determinação do teor de humidade do leite de coco.

Réplicas	Massa do cadinho (g)	Massa (cadinho+amostra húmida) (g)	Massa (cadinho+Amostra seca) (g)	%Humidade (m/m)	Humidade média (%)	Desvio Padrão
1	38,373	44,337	41,128	53,81	53,36	0,40
2	38,638	43,791	41,051	53,17		
3	39,400	43,541	41,3428	53,08		

Tabela A3 - 2: Determinação do teor de cinzas do leite de coco.

Réplicas	Massa do cadinho (g)	Massa (cadinho+amostra húmida (g)	Massa (cadinho+cinzas) (g)	Teor de cinzas (%)	Teor médio de cinzas (%)	Desvio Padrão
1	39,419	44,342	39,455	0,007	0,74	0,09
2	38,641	44,377	38,679	0,007		
3	38,379	42,425	38,412	0,008		

Tabela A3 - 3: Determinação do pH do leite de coco.

Réplicas	pH	Média	Desvio Padrão
1	6,23	6,22	0,01
2	6,21		
3	6,22		

Tabela A3 - 4: Determinação do teor de proteínas do leite de coco.

Réplica	Peso da amostra (g)	Volume de HCl titulado (ml)	Volume de HCl titulado em branco (ml)	Teor de nitrogénio (%)	Teor de proteínas (%) base húmida
1	1,007	6,5	0,9	0,77	4,82
2	1,009	2	1,1	0,15*	0,91*
3	1,040	6,2	0,8	0,71	4,42
Média			0,95	0,74	4,62
Desvio padrão			0,15	0,05	0,28

* Outliar.

Tabela A3 - 5: Determinação do teor de lípidos do leite de coco.

Réplica	Massa (dedal) (g)	Massa (dedal+areia) (g)	Massa (dedal+areia+amostra húmida) (g)	Massa (dedal+areia+amostra húmida+lã) (g)	Massa (dedal+areia+amostra seca+lã) (g)	Massa (balão vazio) (g)	Massa (balão+lípido) (g)	Teor de lípidos (%) base húmida
1	4,253	33,785	41,149	41,543	37,934	115,752	118,273	34,24
2	4,393	24,273	28,985	29,371	26,996	162,411	164,045	34,68
3	4,336	32,156	39,287	39,818	36,491	162,442	164,957	35,27
Média								34,73
Desvio padrão								0,52

Anexo 4: Distribuição do tamanho das gotículas de óleo.

Tabela A4 - 1: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo do leite de coco fresco.

Lower bound (µm)	Upper bound (µm)	Mean (µm)	Frequency	Relative frequency
0,000	0,620	0,310	0	0,000
0,620	1,241	0,930	18	0,013
1,241	1,861	1,551	186	0,131
1,861	2,481	2,171	249	0,175
2,481	3,101	2,791	214	0,151
3,101	3,722	3,411	148	0,104
3,722	4,342	4,032	108	0,076
4,342	4,962	4,652	98	0,069
4,962	5,582	5,272	67	0,047
5,582	6,203	5,892	56	0,039
6,203	6,823	6,513	32	0,023
6,823	7,443	7,133	35	0,025
7,443	8,063	7,753	28	0,020
8,063	8,684	8,373	31	0,022
8,684	9,304	8,994	13	0,009
9,304	9,924	9,614	6	0,004
9,924	10,544	10,234	20	0,014
10,544	11,165	10,855	15	0,011
11,165	11,785	11,475	12	0,008
11,785	12,405	12,095	7	0,005
12,405	13,025	12,715	8	0,006
13,025	13,646	13,336	5	0,004
13,646	14,266	13,956	3	0,002
14,266	14,886	14,576	7	0,005
14,886	15,506	15,196	10	0,007
15,506	16,127	15,817	5	0,004
16,127	16,747	16,437	5	0,004
16,747	17,367	17,057	7	0,005
17,367	17,987	17,677	5	0,004
17,987	18,608	18,298	3	0,002
18,608	19,228	18,918	3	0,002
19,228	19,848	19,538	2	0,001
19,848	20,469	20,158	2	0,001
20,469	21,089	20,779	1	0,001
21,089	21,709	21,399	1	0,001
21,709	22,329	22,019	1	0,001
22,329	22,950	22,639	1	0,001
22,950	23,570	23,260	0	0,000
23,570	24,190	23,880	0	0,000
24,190	24,810	24,500	2	0,001

24,810	25,431	25,120	1	0,001
25,431	26,051	25,741	2	0,001
26,051	26,671	26,361	0	0,000
26,671	27,291	26,981	0	0,000
27,291	27,912	27,601	0	0,000
27,912	28,532	28,222	0	0,000
28,532	29,152	28,842	1	0,001
29,152	29,772	29,462	0	0,000
29,772	30,393	30,083	0	0,000
30,393	31,013	30,703	0	0,000
31,013	31,633	31,323	0	0,000
31,633	32,253	31,943	0	0,000
32,253	32,874	32,564	0	0,000
32,874	33,494	33,184	0	0,000
33,494	34,114	33,804	0	0,000
34,114	34,734	34,424	0	0,000
34,734	35,355	35,045	0	0,000
35,355	35,975	35,665	0	0,000
35,975	36,595	36,285	1	0,001
36,595	37,215	36,905	0	0,000

Tabela A4 - 2: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo do leite aquecido a 40 °C.

Lower bound (µm)	Upper bound (µm)	Mean (µm)	Frequency	Relative frequency
0,000	0,696	0,348	0	0,000
0,696	1,393	1,045	9	0,011
1,393	2,089	1,741	100	0,127
2,089	2,785	2,437	146	0,186
2,785	3,482	3,134	114	0,145
3,482	4,178	3,830	72	0,091
4,178	4,874	4,526	74	0,094
4,874	5,571	5,223	54	0,069
5,571	6,267	5,919	33	0,042
6,267	6,963	6,615	35	0,044
6,963	7,660	7,312	23	0,029
7,660	8,356	8,008	13	0,017
8,356	9,052	8,704	14	0,018
9,052	9,749	9,401	15	0,019
9,749	10,445	10,097	9	0,011
10,445	11,142	10,793	20	0,025
11,142	11,838	11,490	10	0,013
11,838	12,534	12,186	7	0,009
12,534	13,231	12,882	11	0,014

13,231	13,927	13,579	5	0,006
13,927	14,623	14,275	2	0,003
14,623	15,320	14,971	5	0,006
15,320	16,016	15,668	2	0,003
16,016	16,712	16,364	4	0,005
16,712	17,409	17,060	2	0,003
17,409	18,105	17,757	1	0,001
18,105	18,801	18,453	1	0,001
18,801	19,498	19,150	0	0,000
19,498	20,194	19,846	1	0,001
20,194	20,890	20,542	1	0,001
20,890	21,587	21,239	0	0,000
21,587	22,283	21,935	0	0,000
22,283	22,979	22,631	0	0,000
22,979	23,676	23,328	1	0,001
23,676	24,372	24,024	1	0,001
24,372	25,068	24,720	1	0,001
25,068	25,765	25,417	0	0,000
25,765	26,461	26,113	0	0,000
26,461	27,157	26,809	1	0,001
27,157	27,854	27,506	0	0,000

Tabela A4 - 3: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo do leite aquecido a 60 °C.

Lower bound (µm)	Upper bound (µm)	Mean (µm)	Frequency	Relative frequency
0,000	0,729	0,364	0	0,000
0,729	1,457	1,093	18	0,046
1,457	2,186	1,822	89	0,227
2,186	2,915	2,550	72	0,184
2,915	3,643	3,279	47	0,120
3,643	4,372	4,008	29	0,074
4,372	5,101	4,736	24	0,061
5,101	5,829	5,465	17	0,043
5,829	6,558	6,194	15	0,038
6,558	7,287	6,922	14	0,036
7,287	8,015	7,651	6	0,015
8,015	8,744	8,380	9	0,023
8,744	9,473	9,108	8	0,020
9,473	10,201	9,837	7	0,018
10,201	10,930	10,565	7	0,018
10,930	11,658	11,294	7	0,018
11,658	12,387	12,023	3	0,008
12,387	13,116	12,751	4	0,010
13,116	13,844	13,480	1	0,003

13,844	14,573	14,209	1	0,003
14,573	15,302	14,937	3	0,008
15,302	16,030	15,666	0	0,000
16,030	16,759	16,395	1	0,003
16,759	17,488	17,123	2	0,005
17,488	18,216	17,852	1	0,003
18,216	18,945	18,581	0	0,000
18,945	19,674	19,309	2	0,005
19,674	20,402	20,038	1	0,003
20,402	21,131	20,767	0	0,000
21,131	21,860	21,495	0	0,000
21,860	22,588	22,224	1	0,003
22,588	23,317	22,953	0	0,000
23,317	24,046	23,681	0	0,000
24,046	24,774	24,410	0	0,000
24,774	25,503	25,139	0	0,000
25,503	26,232	25,867	1	0,003
26,232	26,960	26,596	0	0,000
26,960	27,689	27,325	0	0,000
27,689	28,418	28,053	0	0,000
28,418	29,146	28,782	0	0,000
29,146	29,875	29,511	0	0,000
29,875	30,604	30,239	1	0,003
30,604	31,332	30,968	0	0,000
31,332	32,061	31,696	0	0,000
32,061	32,789	32,425	0	0,000
32,789	33,518	33,154	0	0,000
33,518	34,247	33,882	0	0,000
34,247	34,975	34,611	0	0,000
34,975	35,704	35,340	0	0,000
35,704	36,433	36,068	0	0,000
36,433	37,161	36,797	0	0,000
37,161	37,890	37,526	0	0,000
37,890	38,619	38,254	0	0,000
38,619	39,347	38,983	0	0,000
39,347	40,076	39,712	0	0,000
40,076	40,805	40,440	0	0,000
40,805	41,533	41,169	0	0,000
41,533	42,262	41,898	0	0,000
42,262	42,991	42,626	1	0,003
42,991	43,719	43,355	0	0,000

Tabela A4 - 4: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo do leite aquecido à 70 °C.

Lower bound (µm)	Upper bound (µm)	Mean (µm)	Frequency	Relative frequency
0,000	0,546	0,273	0	0,000
0,546	1,093	0,820	1	0,001
1,093	1,639	1,366	28	0,032
1,639	2,186	1,913	154	0,178
2,186	2,732	2,459	167	0,193
2,732	3,279	3,006	124	0,143
3,279	3,825	3,552	63	0,073
3,825	4,372	4,098	50	0,058
4,372	4,918	4,645	32	0,037
4,918	5,465	5,191	40	0,046
5,465	6,011	5,738	31	0,036
6,011	6,558	6,284	22	0,025
6,558	7,104	6,831	28	0,032
7,104	7,650	7,377	21	0,024
7,650	8,197	7,924	9	0,010
8,197	8,743	8,470	17	0,020
8,743	9,290	9,017	12	0,014
9,290	9,836	9,563	10	0,012
9,836	10,383	10,109	9	0,010
10,383	10,929	10,656	2	0,002
10,929	11,476	11,202	7	0,008
11,476	12,022	11,749	9	0,010
12,022	12,569	12,295	3	0,003
12,569	13,115	12,842	6	0,007
13,115	13,661	13,388	5	0,006
13,661	14,208	13,935	3	0,003
14,208	14,754	14,481	0	0,000
14,754	15,301	15,028	3	0,003
15,301	15,847	15,574	2	0,002
15,847	16,394	16,121	1	0,001
16,394	16,940	16,667	1	0,001
16,940	17,487	17,213	1	0,001
17,487	18,033	17,760	0	0,000
18,033	18,580	18,306	0	0,000
18,580	19,126	18,853	1	0,001
19,126	19,673	19,399	1	0,001
19,673	20,219	19,946	0	0,000
20,219	20,765	20,492	0	0,000
20,765	21,312	21,039	0	0,000
21,312	21,858	21,585	0	0,000
21,858	22,405	22,132	0	0,000
22,405	22,951	22,678	2	0,002

22,951	23,498	23,225	0	0,000
23,498	24,044	23,771	1	0,001
24,044	24,591	24,317	0	0,000
24,591	25,137	24,864	0	0,000
25,137	25,684	25,410	0	0,000
25,684	26,230	25,957	0	0,000
26,230	26,777	26,503	0	0,000
26,777	27,323	27,050	0	0,000
27,323	27,869	27,596	0	0,000
27,869	28,416	28,143	0	0,000
28,416	28,962	28,689	0	0,000
28,962	29,509	29,236	0	0,000
29,509	30,055	29,782	0	0,000
30,055	30,602	30,328	0	0,000
30,602	31,148	30,875	0	0,000
31,148	31,695	31,421	0	0,000
31,695	32,241	31,968	1	0,001
32,241	32,788	32,514	0	0,000

Tabela A4 - 5: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo do leite aquecido a 80 °C.

Lower bound (µm)	Upper bound (µm)	Mean (µm)	Frequency	Relative frequency
0,000	1,120	0,560	2	0,002
1,120	2,239	1,679	123	0,094
2,239	3,359	2,799	235	0,180
3,359	4,479	3,919	167	0,128
4,479	5,598	5,038	146	0,112
5,598	6,718	6,158	120	0,092
6,718	7,838	7,278	96	0,073
7,838	8,957	8,397	81	0,062
8,957	10,077	9,517	51	0,039
10,077	11,197	10,637	60	0,046
11,197	12,316	11,756	54	0,041
12,316	13,436	12,876	43	0,033
13,436	14,556	13,996	42	0,032
14,556	15,675	15,115	21	0,016
15,675	16,795	16,235	18	0,014
16,795	17,915	17,355	12	0,009
17,915	19,034	18,474	11	0,008
19,034	20,154	19,594	9	0,007
20,154	21,274	20,714	4	0,003
21,274	22,393	21,833	4	0,003
22,393	23,513	22,953	3	0,002
23,513	24,633	24,073	1	0,001

24,633	25,752	25,192	1	0,001
25,752	26,872	26,312	2	0,002
26,872	27,992	27,432	1	0,001

Tabela A4 - 6: Distribuição do diâmetro das gotículas de óleo do leite aquecido a 90 °C.

Lower bound (µm)	Upper bound (µm)	Mean (µm)	Frequency	Relative frequency
0,000	1,470	0,735	2	0,003
1,470	2,939	2,204	81	0,130
2,939	4,409	3,674	103	0,166
4,409	5,878	5,144	79	0,127
5,878	7,348	6,613	78	0,125
7,348	8,818	8,083	69	0,111
8,818	10,287	9,552	53	0,085
10,287	11,757	11,022	35	0,056
11,757	13,227	12,492	32	0,051
13,227	14,696	13,961	17	0,027
14,696	16,166	15,431	25	0,040
16,166	17,635	16,901	15	0,024
17,635	19,105	18,370	10	0,016
19,105	20,575	19,840	7	0,011
20,575	22,044	21,309	4	0,006
22,044	23,514	22,779	2	0,003
23,514	24,983	24,249	5	0,008
24,983	26,453	25,718	0	0,000
26,453	27,923	27,188	0	0,000
27,923	29,392	28,657	0	0,000
29,392	30,862	30,127	0	0,000
30,862	32,332	31,597	0	0,000
32,332	33,801	33,066	0	0,000
33,801	35,271	34,536	1	0,002
35,271	36,740	36,006	1	0,002
36,740	38,210	37,475	2	0,003
38,210	39,680	38,945	0	0,000
39,680	41,149	40,414	0	0,000
41,149	42,619	41,884	0	0,000
42,619	44,088	43,354	1	0,002

Anexo 5: Determinação do índice de sedimentação do leite de coco.

Tabela A5 - 1: Determinação do índice de sedimentação do leite centrifugado.

Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	Índice de sedimentação (%)	Índice de sedimentação médio (%)	Desvio padrão
1	30	9,2	30,67	30,78	0,19
2	30	9,2	30,67		
3	30	9,3	31,00		

Tabela A5 - 2: Determinação do índice de sedimentação do leite fresco.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	10,00	0,00	0,00*	0,00	0,00
	2	10,00	0,00	0,00		
	3	9,80	0,00	0,00		
0,5	1	10,00	0,00	0,00*	0,00	0,00
	2	10,00	0,00	0,00		
	3	9,80	0,00	0,00		
1	1	10,00	0,50	5,00*	2,02	0,03
	2	10,00	0,20	2,00		
	3	9,80	0,20	2,04		
2	1	10,00	0,50	5,00*	2,53	0,04
	2	10,00	0,25	2,50		
	3	9,80	0,25	2,55		
3	1	10,00	0,70	7,00*	5,05	0,07
	2	10,00	0,50	5,00		
	3	9,80	0,50	5,10		
4	1	10,00	0,80	8,00*	7,07	0,10
	2	10,00	0,70	7,00		
	3	9,80	0,70	7,14		
5	1	10,00	1,00	10,00*	8,08	0,12
	2	10,00	0,80	8,00		
	3	9,80	0,80	8,16		
20 e 24	1	10,00	2,80	28,00*	22,21	1,11
	2	10,00	2,30	23,00		
	3	9,80	2,10	21,43		

* Outliar.

Tabela A5 - 3: Determinação do índice de sedimentação do leite de coco aquecido a 50 °C.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	10,20	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
0,5	1	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	10,20	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
1	1	10,00	0,10	1,00	1,16	1,47
	2	10,20	0,10	0,98		
	3	10,00	0,15	1,50		
2	1	10,00	0,20	2,00	2,22	2,92
	2	10,20	0,20	1,96		
	3	10,00	0,27	2,70		
3	1	10,00	0,25	2,50	2,72	3,65
	2	10,20	0,25	2,45		
	3	10,00	0,32	3,20		
4	1	10,00	0,45	4,50	4,64	0,80
	2	10,20	0,40	3,92		
	3	10,00	0,55	5,50		
5	1	10,00	0,75	7,50	7,62	0,34
	2	10,20	0,75	7,35		
	3	10,00	0,80	8,00		
20 e 24	1	10,00	2,50	25,00	23,85	1,23
	2	10,20	2,30	22,55		
	3	10,00	2,40	24,00		

Tabela A5 - 4: Determinação do índice de sedimentação do leite aquecido a 60 °C.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	10,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	10,40	0,00	0,00		
	3	10,40	0,00	0,00		
0,5	1	10,20	0,10	0,98	0,97	0,01
	2	10,40	0,10	0,96		
	3	10,40	0,10	0,96		
1	1	10,20	0,20	1,96	1,94	0,02
	2	10,40	0,20	1,92		
	3	10,40	0,20	1,92		
2	1	10,20	0,25	2,45	2,26	0,29
	2	10,40	0,25	2,40		
	3	10,40	0,20	1,92		
3	1	10,20	0,30	2,94	2,74	0,30
	2	10,40	0,30	2,88		
	3	10,40	0,25	2,40		
4	1	10,20	0,35	3,43	3,39	0,48
	2	10,40	0,40	3,85		
	3	10,40	0,30	2,88		
5	1	10,20	0,60	5,88	5,81	0,96
	2	10,40	0,70	6,73		
	3	10,40	0,50	4,81		
20 e 24	1	10,20	2,50	24,51	23,23	3,54
	2	10,40	2,70	25,96		
	3	10,40	2,00	19,23		

Tabela A5 - 5: Determinação do índice de sedimentação do leite de coco aquecido a 70 °C.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	10,10	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	10,00	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
0,5	1	10,10	0,10	0,99	1,00	0,01
	2	10,00	0,10	1,00		
	3	10,00	0,10	1,00		
1	1	10,10	0,20	1,98	1,66	0,28
	2	10,00	0,15	1,50		
	3	10,00	0,15	1,50		
2	1	10,10	0,25	2,48	2,16	0,27
	2	10,00	0,20	2,00		
	3	10,00	0,20	2,00		
3	1	10,10	0,40	3,96	3,15	0,74
	2	10,00	0,25	2,50		
	3	10,00	0,30	3,00		
4	1	10,10	0,70	6,93	4,98	1,69
	2	10,00	0,40	4,00		
	3	10,00	0,40	4,00		
5	1	10,10	0,80	7,92	5,97	1,69
	2	10,00	0,50	5,00		
	3	10,00	0,50	5,00		
20 e 24	1	10,10	2,30	22,77	20,92	1,89
	2	10,00	2,10	21,00		
	3	10,00	1,90	19,00		

Tabela A5 - 6: Determinação do índice de sedimentação do leite de coco aquecido a 80 °C.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	10,40	0,00	0,00*	0,00	0,00
	2	10,20	0,00	0,00		
	3	10,40	0,00	0,00		
0,5	1	10,33	0,25	2,42*	0,10	0,00
	2	10,33	0,01	0,10		
	3	10,33	0,01	0,10		
1	1	10,33	0,28	2,71*	0,48	0,00
	2	10,33	0,05	0,48		
	3	10,33	0,05	0,48		
2	1	10,33	0,40	3,87*	1,45	0,00
	2	10,33	0,15	1,45		
	3	10,33	0,15	1,45		
3	1	10,33	0,50	4,84*	1,94	0,00
	2	10,33	0,20	1,94		
	3	10,33	0,20	1,94		
4	1	10,33	0,50	4,84*	2,56	0,21
	2	10,33	0,28	2,71		
	3	10,33	0,25	2,42		
5	1	10,33	0,60	5,81*	3,15	0,34
	2	10,33	0,35	3,39		
	3	10,33	0,30	2,90		
20 e 24	1	10,33	2,00	19,35*	18,87	0,68
	2	10,33	2,00	19,35		
	3	10,33	1,90	18,39		

* *Outlier*.

Tabela A5 - 7: Determinação do índice de sedimentação do leite de coco aquecido a 90 °C.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	10,00	0,00	0,00		
	3	9,80	0,00	0,00		
0,5	1	10,00	0,01	0,10	0,07	0,06
	2	10,00	0,01	0,10		
	3	9,80	0,00	0,00		
1	1	10,00	0,10	1,00	1,01	0,01
	2	10,00	0,10	1,00		
	3	9,80	0,10	1,02		
2	1	10,00	0,15	1,50	1,51	0,02
	2	10,00	0,15	1,50		
	3	9,80	0,15	1,53		
3	1	10,00	0,20	2,00	1,84	0,27
	2	10,00	0,20	2,00		
	3	9,80	0,15	1,53		
4	1	10,00	0,25	2,50	2,18	0,56
	2	10,00	0,25	2,50		
	3	9,80	0,15	1,53		
5	1	10,00	0,25	2,50	2,52	0,03
	2	10,00	0,25	2,50		
	3	9,80	0,25	2,55		
20 e 24	1	10,00	1,20	12,00	11,74	0,45
	2	10,00	1,20	12,00		
	3	9,80	1,10	11,22		

Tabela A5 - 8: Determinação do índice de sedimentação do leite de coco aquecido a 100 °C.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	8,80	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	8,00	0,00	0,00		
	3	8,40	0,00	0,00		
0,5	1	8,80	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	8,00	0,00	0,00		
	3	8,40	0,00	0,00		
1	1	8,80	0,01	0,11	0,12	0,01
	2	8,00	0,01	0,13		
	3	8,40	0,01	0,12		
2	1	8,80	0,01	0,11	0,12	0,01
	2	8,00	0,01	0,13		
	3	8,40	0,01	0,12		
3	1	8,80	0,01	0,11	0,12	0,01
	2	8,00	0,01	0,13		
	3	8,40	0,01	0,12		
4	1	8,80	0,01	0,11	0,12	0,01
	2	8,00	0,01	0,13		
	3	8,40	0,01	0,12		
5	1	8,80	0,01	0,11	0,12	0,01
	2	8,00	0,01	0,13		
	3	8,40	0,01	0,12		
20 e 24	1	8,80	0,20	2,27	2,38	0,11
	2	8,00	0,20	2,50		
	3	8,40	0,20	2,38		

Tabela A5 - 9: Determinação do índice de sedimentação do leite de coco aquecido a 120 °C.

Tempo de incubação (h)	Réplica	Volume total da emulsão (ml)	Volume do soro (ml)	CI (%)	CI médio (%)	Desvio Padrão
0	1	9,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	9,90	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
0,5	1	9,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	9,90	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
1	1	9,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	9,90	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
2	1	9,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	9,90	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
3	1	9,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	9,90	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
4	1	9,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	9,90	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
5	1	9,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	9,90	0,00	0,00		
	3	10,00	0,00	0,00		
20 e 24	1	9,90	0,05	0,51	0,50	0,00
	2	9,90	0,05	0,51		
	3	10,00	0,05	0,50		

Anexo 6: Absorbância de raios UV pelas proteínas do soro.

Tabela A6 - 1: Determinação da absorbância das proteínas do soro em função a temperatura de aquecimento.

Réplica	Temperatura (°C)	Absor. (a) (595nm)	Média	Desv. Pad.	Absor. (d) (595nm)	Média	Desv. Pad.
1	40	0,7137	0,711	0,003	0,7643	0,764	0,007
2		0,7089			0,7719		
3		0,7096			0,7570		
1	50	0,6993	0,696	0,003	0,7765	0,778	0,004
2		0,6926			0,7743		
3		0,6969			0,7826		
1	60	0,6921	0,706	0,013	0,7824	0,790	0,005
2		0,7178			0,7926		
3		0,7095			0,7865		
1	70	0,6761	0,708	0,027	0,6462	0,654	0,010
2		0,7227			0,6652		
3		0,7237			0,6496		
1	80	0,5042	0,539	0,031	0,6111	0,606	0,013
2		0,5507			0,5910		
3		0,5618			0,6148		
1	90	0,6053	0,610	0,039	0,6055	0,607	0,003
2		0,574			0,6112		
3		0,6506			0,6054		
1	100	0,7154	0,695	0,037	0,6637	0,664	0,001
2		0,6521			0,6629		
3		0,716			0,6644		
1	110	0,7794	0,763	0,042	0,7345	0,732	0,002
2		0,7154			0,7299		
3		0,794			0,7308		
1	120	0,6473	0,651	0,007	0,5764	0,573	0,004
2		0,6455			0,5682		
3		0,6592			0,5734		

Absor.(a): absorbância antes da centrifugação do soro;

Absor.(d): absorbância depois da centrifugação do soro;

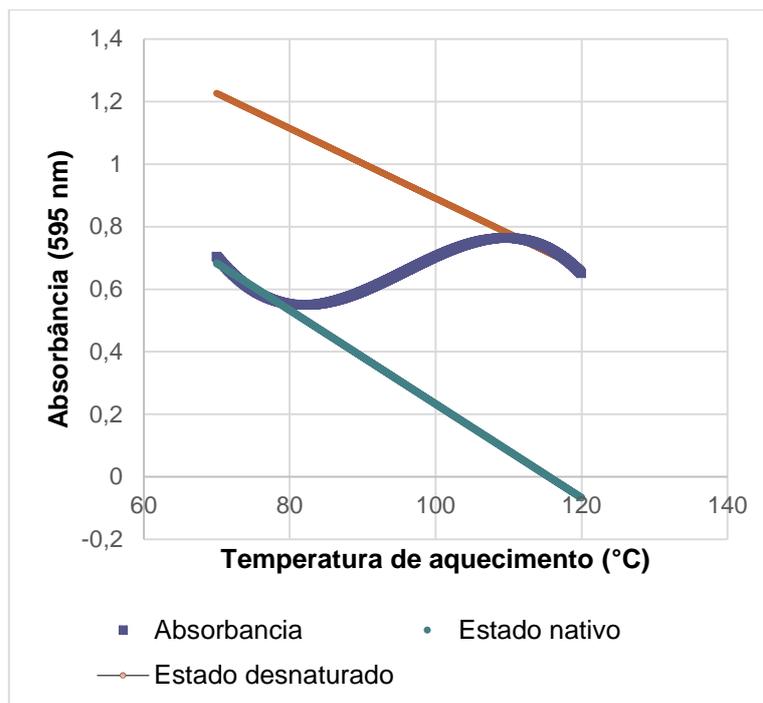


Figura A6 - 1: Modelação da desnaturação pelo mecanismo de dois estados.

Figura A6 - 2: Análise estatística da regressão do dados da absorbância em função a temperatura de aquecimento.

Third order polynomial (cubic)	
Best-fit values	
B0	17,39
B1	-0,5474
B2	0,005836
B3	-2,03E-05
95% CI (profile likelihood)	
B0	13.35 to 21.44
B1	-0.6795 to -0.4154
B2	0.004424 to 0.007247
B3	-2.525e-005 to -1.536e-005
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	14
R squared	0,8644
Sum of Squares	0,01448
Sy.x	0,03216
Number of points	
# of X values	18
# Y values analyzed	18

Procedimento experimental da preparação do reagente de Bradford:

1. Dissolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol (95%);
2. Adicionar 100 mL de ácido fosfórico (85%);
3. Diluir até perfazer 1 L de solução até o CBB G-250 ficar completamente dissolvido;
4. Filtrar no papel Whatman antes de usar a solução. O reagente de Bradford deve ser castanho, por isso a filtração deve ser repetida para livrá-lo dos cristais azuis.