

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

A23L 2/66 (2009.01) **A23L 2/54** (2009.01)
A23L 1/305 (2009.01) **A23L 1/54** (2009.01)
A23C 9/152 (2009.01) **A23C 9/154** (2009.01)
A23C 11/06 (2009.01) **A23G 1/44** (2009.01)
A23G 3/44 (2009.01) **A23G 9/38** (2009.01)
A23G 3/52 (2009.01) **A23G 3/42** (2009.01)
A23G 1/52 (2009.01) **A23G 1/42** (2009.01)
A23G 9/34 (2009.01)

(22) Data de pedido: **2006.09.13**

(30) Prioridade(s): **2005.09.23 EP 05255944**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.06.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.01.05**
032/2011

(73) Titular(es):

UNILEVER N V

WEENA 455 3013 AL ROTTERDAM

NL

(72) Inventor(es):

DEBORAH LYNNE ALDRED

GB

ANDREW RICHARD COX

GB

SIMEON DOBREV STOYANOV

NL

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA

RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PRODUTOS AERADOS COM TEOR REDUZIDO DE CREME**

(57) Resumo:

É PROPORCIONADA UMA COMPOSIÇÃO AERADA CAPAZ DE FLUIR QUE COMPREENDE HIDROFOBINA E UM AGENTE DE TENSÃO DE ESCOAMENTO, TENDO A COMPOSIÇÃO UMA VISCOSIDADE DA FASE CONTÍNUA, MEDIDA A UMA VELOCIDADE DE CORTE DE 10 S⁻¹, DE 0,01 A 2000 PA.S, E UM LIMITE DE ELASTICIDADE APARENTE DA FASE CONTÍNUA DE, PELO MENOS, 4 PA.

DESCRIÇÃO

"PRODUTOS AERADOS COM TEOR REDUZIDO DE CREME"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a composições, tal como produtos alimentares, que incluem hidrofobinas e que apresentam formação reduzida de creme.

Antecedentes da Invenção

Uma grande variedade de alimentos contém um gás introduzido, tais como ar, azoto, dióxido de carbono ou óxido nitroso. Tipicamente, as espumas alimentares são instáveis ao longo de períodos de tempo superiores a vários dias (*i. e.*, as bolhas vão crescer e a espuma vai colapsar) a não ser que o produto seja congelado (*e. g.* um gelado) ou a não ser que a fase contínua do produto seja gelificada (*e. g.* mousse).

Actualmente, é difícil preparar um produto aerado em que a espuma seja estável durante um prazo de validade de várias semanas e, com alguma agitação se necessário, vá depois fluir. Existem dois aspectos que é preciso considerar: (a) a estabilidade das bolhas ao longo de várias semanas; (b) a prevenção da ascensão de bolhas de ar para a superfície devido à diferença de fluabilidade entre as duas fases (denominada formação de creme). A formação de creme pode levar ao mau aspecto de um produto e à perda de desempenho. Por exemplo, se

uma espuma formar creme, então as bolhas podem tornar-se menos estáveis e pode perder-se ar. Além disso, um produto de "fases separadas" pode ter um aspecto muito menos desejável para o consumidor.

Idealmente, esses produtos aerados devem conter uma espuma em que as bolhas permanecem estáveis ao crescimento e à formação de creme, mas na aplicação de uma quantidade relativamente pequena de agitação (e. g. por sacudimento, agitação ou sucção), o produto vai fluir.

Há vários mecanismos que degradam a qualidade de um produto aerado. A desproporcionação e coalescência conduzem ao crescimento de bolhas, alterando as propriedades do produto, tais como a sua textura e aspecto físico. A formação de creme (devida à impulsão hidrostática das bolhas de ar) conduz à separação vertical de fases no recipiente, resultando numa grande proporção de bolhas próximo da superfície superior e na depleção de bolhas no fundo. Existem produtos alimentares aerados em que é desejável a formação de creme, e. g. a espuma na superfície da cerveja. No entanto, para produtos aerados que requerem um tempo de vida da espuma para lá de alguns minutos ou horas (e. g., os que requerem um prazo de armazenagem), a formação de creme leva a um aspecto indesejado. Também pode levar a uma subsequente perda de ar devida a um empacotamento mais próximo das bolhas na espuma e ao colapso da espuma que daí pode resultar.

Para a concepção de um produto em que é impedida a formação de creme e as bolhas no interior da espuma permanecem estáveis ao longo de um prazo de armazenagem prolongado (desde 1 semana até, pelo menos, 3 ou mais semanas, refrigerado), há dois

pré-requisitos: a fase contínua requer um limite de elasticidade aparente ou tem de ser viscoelástica para impedir as bolhas de ascender devido à impulsão hidrostática. As bolhas no interior da espuma têm de ser estáveis à desproporcionação e à coalescência ao longo de todo o tempo de vida do produto.

Sumário da Invenção

No pedido co-pendente WO 06/010425, verificou-se que uma proteína fúngica designada hidrofobina permite a produção de espuma com uma excelente estabilidade à desproporcionação e à coalescência. A hidrofobina é um agente de aeração que se verificou conferir à espuma uma excelente estabilidade devido à sua natureza tensoactiva. A hidrofobina também parece conferir uma natureza altamente viscoelástica à superfície das bolhas de ar. Isto leva a uma boa estabilidade à desproporcionação e à coalescência.

Verificou-se, agora, que a utilização de hidrofobina em associação com estabilizadores que conferem um limite de elasticidade aparente à fase contínua conduz a produtos aerados que também apresentam boa estabilidade à formação de creme, superior a 3 semanas, quando mantidos a temperaturas de refrigeração. Em contraste, uma associação de estabilizadores com outros agentes tensoactivos, tal como o caseinato de sódio em vez de hidrofobina, não resultou numa espuma estável.

Para abrandar a velocidade de formação de creme numa espuma produzida utilizando hidrofobina como o agente aerante tensoactivo, tem de ser concebida uma fase contínua com viscosidade ou limite de elasticidade aparente. A primeira só

vai abrandar a velocidade da formação de creme (através da lei de Stoke), mesmo se se tornar a viscosidade muito alta. A utilização de uma fase contínua com um limite de elasticidade aparente, contudo, pode levar a uma situação em que é impedida a formação de creme, mas ainda com uma quantidade relativamente pequena de agitação, o produto vai tornar-se menos espesso e fluir.

Em conformidade, a presente invenção proporciona uma composição aerada capaz de fluir compreendendo hidrofobina e um agente de tensão de escoamento, tendo a composição uma viscosidade da fase contínua, medida a uma velocidade de corte de 10 s^{-1} , de 0,01 a 2000 Pa.s e um limite de elasticidade aparente da fase contínua de, pelo menos, 4 Pa.

Numa forma de realização, a hidrofobina está em forma substancialmente isolada.

De um modo preferido, a hidrofobina está presente numa quantidade de, pelo menos, 0,001% em peso, de um modo mais preferido, pelo menos, 0,01% em peso e menos de 1% em peso.

De um modo preferido a hidrofobina é uma hidrofobina da classe II.

Numa forma de realização preferida, o agente de tensão de escoamento é um polissacárido, de um modo mais preferido, um polissacárido bacteriano, tais como xantana e/ou goma gelana.

Numa forma de realização, a composição aerada compreende um espessante.

Numa forma de realização preferida, a composição aerada pode ser vertida.

De um modo preferido, a composição aerada é um produto alimentar aerado, tal como um produto alimentar refrigerado.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de uma hidrofobina e um agente de tensão de escoamento para inibir a formação de creme numa composição aerada que pode escoar.

Num aspecto relacionado, a presente invenção proporciona um método de inibição da formação de creme numa composição aerada, cujo método compreende a adição de hidrofobina e de um agente de tensão de escoamento à composição antes e/ou durante a aeração da composição.

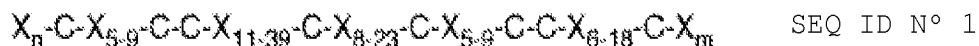
Descrição Pormenorizada da Invenção

Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o vulgarmente entendido por uma pessoa com conhecimentos correntes da matéria (e. g. no fabrico, química e biotecnologia de confeitaria refrigerada/confeitaria congelada). As definições e descrições de vários termos e técnicas utilizados no fabrico de confeitaria refrigerada/congelada são encontradas em *Ice Cream*, 4ª Edição, Arbuckle (1986), Van Nostrand Reinhold Company, Nova Iorque, NI. As técnicas correntes utilizadas para métodos moleculares e bioquímicos podem ser encontradas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Ed. (2001)

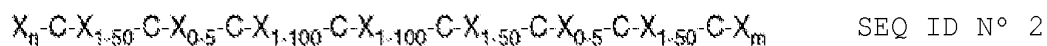
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I., e Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. - e na versão completa intitulada *Current Protocols in Molecular Biology*).

Hidrofobinas

As hidrofobinas são uma classe bem definida de proteínas (Wessels, 1997, *Adv. Microb. Physio.* 38: 1-45; Wosten, 2001, *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 625-646) capazes de auto-agregação numa interface hidrófoba/hidrófila e que têm uma sequência conservada:



em que X representa qualquer aminoácido e n e m representam, independentemente, um número inteiro. Tipicamente, uma hidrofobina tem um comprimento até 125 aminoácidos. Os resíduos de cisteína (C) na sequência conservada são parte de pontes dissulfureto. No contexto da presente invenção, o termo hidrofobina tem um significado mais amplo para incluir proteínas funcionalmente equivalentes que apresentam ainda a característica de auto-agregação numa interface hidrófoba-hidrófila resultando numa película de proteína, tais como as proteínas compreendendo a sequência:



ou suas partes que apresentam, ainda, a característica de auto-

agregação numa interface hidrófoba-hidrófila resultando numa película de proteína. De acordo com a definição da presente invenção, a auto-agregação pode ser detectada por adsorção da proteína a Teflon e utilização de dicroísmo circular para estabelecer a presença de uma estrutura secundária (em geral, hélice α) (De Vocht et al., 1998, *Biophys. J.* 74: 2059-68).

A formação de uma película pode ser estabelecida por incubação de uma folha de Teflon na solução de proteína, seguida por, pelo menos, três lavagens com água ou tampão (Wosten et al., 1994, *EMBO. J.* 13: 5848-54). A película de proteína pode ser visualizada por qualquer método adequado, tal como a marcação com um marcador fluorescente ou pela utilização de anticorpos fluorescentes, como está bem estabelecido na técnica. Tipicamente, m e n têm valores que variam de 0 a 2000, mas, mais usualmente, m e n, no total, são inferiores a 100 ou 200. A definição de hidrofobina no contexto da presente invenção inclui proteínas de fusão de uma hidrofobina e de outro polipéptido bem como conjugados de hidrofobina e outras moléculas, tal como polissacáridos.

As hidrofobinas identificadas até à data são, geralmente, classificadas como da classe I ou da classe II. Ambos os tipos foram identificados em fungos como proteínas segregadas que se auto-agregam em interfaces hidrófilas em películas anfipáticas. Os agregados de hidrofobinas da classe I são relativamente insolúveis, enquanto os de hidrofobinas da classe II dissolvem-se facilmente numa variedade de solventes.

As proteínas semelhantes a hidrofobinas também foram identificadas em bactérias filamentosas, tais como *Actinomycete* e *Streptomyces* sp. (documento WO01/74864). Estas proteínas

bacterianas, em contraste com hidrofobinas fúngicas, formam só até uma ponte dissulfureto, uma vez que só têm dois resíduos de cisteína. Essas proteínas são um exemplo de equivalentes funcionais de hidrofobinas tendo as sequências de consenso ilustradas nas SEQ ID N° 1 e 2 e estão dentro do âmbito da presente invenção.

As hidrofobinas podem ser obtidas por extração a partir de fontes nativas, tal como fungos filamentosos, por qualquer processo adequado. Por exemplo, as hidrofobinas podem ser obtidas por cultura de fungos filamentosos que segregam a hidrofobina para o meio de crescimento ou por extração de micélio fúngico com etanol a 60%. É particularmente preferido isolar as hidrofobinas de organismos hospedeiros que segregam naturalmente as hidrofobinas. Os hospedeiros preferidos são hifomicetos (e. g. *Trichoderma*), basidiomicetos e ascomicetos. Hospedeiros particularmente preferidos são organismos de qualidade alimentar, tal como *Cryphonectria parasitica* que segrega uma hidrofobina denominada criparina (MacCabe e Van Alfen, 1999, *App. Environ. Microbiol.* 65: 5431-5435).

Alternativamente, as hidrofobinas podem ser obtidas por utilização de tecnologia recombinante. Por exemplo, células hospedeiras, tipicamente, microrganismos, podem ser modificadas para exprimir hidrofobinas e as hidrofobinas podem, então, ser isoladas e utilizadas de acordo com a presente invenção. As técnicas para introdução de construções de ácidos nucleicos que codificam hidrofobinas nas células hospedeiras são bem conhecidas na técnica. Mais de 34 genes que codificam hidrofobinas foram clonados, a partir de mais de 16 espécies de fungos (ver, por exemplo, documento WO96/41882 que dá a sequência de hidrofobinas identificadas em *Agaricus bisporus*; e

Wosten, 2001, *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 625-646). A tecnologia recombinante também pode ser utilizada para modificar sequências de hidrofobinas ou sintetizar novas hidrofobinas tendo propriedades desejadas/melhoradas.

Tipicamente, uma célula ou organismo hospedeiro apropriado é transformado por uma construção de ácidos nucleicos que codifica a hidrofobina desejada. A sequência de nucleótidos que codifica o polipéptido pode ser inserida num vector de expressão adequado que codifica os elementos necessários para a transcrição e tradução e, de tal forma, que vão ser expressas em condições apropriadas (e. g. com a orientação apropriada e grelha de leitura correcta e com sequências alvo e de expressão apropriadas). Os métodos necessários para construir estes vectores de expressão são bem conhecidos pelos especialistas na matéria.

Podem ser utilizados vários sistemas de expressão para exprimir a sequência de codificação dos polipéptidos. Estes incluem, mas não estão limitados a, bactérias, fungos (incluindo leveduras), sistemas de células de insectos, sistemas de cultura de células de plantas e plantas, todos transformados com os vectores de expressão apropriados. Os hospedeiros preferidos são aqueles que são considerados de qualidade alimentar, "genericamente considerados como seguros" (GRAS).

As espécies fúngicas adequadas incluem leveduras, tais como (mas não limitadas) às dos géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* e semelhantes, e espécies filamentosas, tais como (mas não limitadas) às dos géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Neurospora*, *Fusarium* e semelhantes.

As sequências que codificam as hidrofobinas são, de um modo preferido, pelo menos, 80% idênticas ao nível dos aminoácidos a uma hidrofobina identificada na natureza, de um modo mais preferido, pelo menos, 95% ou 100% idênticas. No entanto, os especialistas na matéria podem fazer substituições conservadoras ou outras alterações de aminoácidos que não reduzem a actividade biológica da hidrofobina. Para o propósito da invenção, estas hidrofobinas que possuem este elevado nível de identidade com uma hidrofobina de ocorrência natural também estão englobadas no termo "hidrofobinas".

As hidrofobinas pode ser purificadas a partir de meios de cultura ou extractos celulares, por exemplo, pelo processo descrito no documento W001/57076 que envolve a adsorção à superfície da hidrofobina presente numa solução contendo hidrofobina e depois fazer contactar a superfície com um tensoactivo, tal como Tween 20, para eluir a hidrofobina da superfície. Ver, também, Collen et al., 2002, *Biochim. Biophys. Acta.* 1569: 139-50; Calonje et al., 2002, *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-4; Askolin et al., 2001, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 124-30; e De Vries et al., 1999, *Eur. J. Biochem.* 262: 377-85.

Composições e produtos aerados escoáveis

Pelos termos "composição capaz de fluir" ou "produto capaz de fluir", que aqui são utilizados indistintamente, pretende-se significar uma composição em que a composição vai fluir após uma quantidade relativamente pequena de agitação (e. g. por sacudimento, agitação ou sucção), em oposição a uma composição sólida ou solidificada. As composições capazes de fluir incluem

composições que podem ser vertidas e composições semi-solidificadas. A temperatura a que a fluidez da composição ou produto é considerada é a temperatura à qual o produto é normalmente servido. Por exemplo, a fluidez de um produto refrigerado é, tipicamente, determinada a 5 °C, enquanto a fluidez de um produto servido à temperatura ambiente é, tipicamente, determinada à temperatura ambiente (20 °C). A fluidez de produtos contendo gelo é, tipicamente, determinada a -10 °C. As medições são, geralmente, realizadas à pressão de 1 atm.

O termo "aerado" significa que o gás foi intencionalmente incorporado no produto, tal como por meios mecânicos. O gás pode ser qualquer gás, mas, de um modo preferido, particularmente no contexto de produtos alimentares, é um gás de qualidade alimentar, tais como ar, azoto ou dióxido de carbono. O grau de aeração é, tipicamente, definido em termos de "aumento de volume". No contexto da presente invenção, a % de aumento de volume é definida em termos de volume como:

$$\frac{((\text{volume do produto aerado final} - \text{volume da mistura}) / \text{volume da mistura}) \times 100}{}$$

A quantidade de aumento de volume presente no produto vai variar dependendo das características desejadas do produto. Por exemplo, o nível do aumento de volume em artigos de confeitaria, tal como mousses, pode ser tão elevado como 200 a 250%. O nível do aumento de volume em alguns produtos refrigerados, produtos à temperatura ambiente e produtos quentes pode ser inferior, mas geralmente é superior a 10%, e. g. o nível do aumento de volume em batidos de leite é, tipicamente, de 10 a 40%.

De um modo preferido, o nível do aumento de volume é pelo menos, de 10%, de um modo mais preferido, pelo menos, de 25 ou 50%. De um modo preferido, o nível do aumento de volume é inferior a 400%, de um modo mais preferido, inferior a 300 ou 200%.

De um modo preferido, a espuma é substancialmente homogénea.

De um modo preferido, uma composição aerada da invenção vai reter, pelo menos, 50% do seu volume da fase de ar inicial, de um modo mais preferido, 75%, durante um período de, pelo menos, 3 semanas, de um modo mais preferido, pelo menos, um mês (tipicamente medido após armazenagem a temperaturas de refrigeração (ca. 5 °C)).

De um modo preferido, o diâmetro médio das bolhas na composição não se vai alterar apreciavelmente ao longo de um período de 3 semanas (tipicamente medido após armazenagem a temperaturas de refrigeração (ca. 5 °C)) em relação ao tamanho médio de quando foi inicialmente preparado no tempo $t=0$. De um modo preferido, o diâmetro médio relativo das bolhas (d_r) vai variar menos do que um factor de 2,5 durante um período de 3 semanas e, de modo mais preferido, menos do que um factor de 2. O diâmetro relativo das bolhas (d_r) no tempo = t é como determinado nos exemplos através da equação:

$$d_r = \frac{d_t}{d_0}$$

em que d_0 é o diâmetro médio imediatamente após a preparação,

i. e. t = 0 e d_t é o diâmetro médio das bolhas no momento = t.

Um método adequado para medir alterações do tamanho de bolhas e volume de espuma é por utilização de uma técnica de dispersão de luz. Pode ser convenientemente utilizado o sistema de medição Turbiscan TLab (Formulaction, França), que analisa a luz tanto retrodispersada como transmitida a partir da amostra aerada de interesse.

A espuma a ser analisada está contida dentro de uma célula de amostra cilíndrica (e. g. que tem um diâmetro de 25 mm cheia com 20 mL de espuma). É utilizada uma fonte de luz de comprimento de onda $\lambda = 880$ nm para fornecer a luz incidente e dois sensores ópticos recebem a luz transmitida através da amostra (180° em relação à luz incidente) e luz retrodispersada (45° em relação à luz incidente) a partir da amostra. Em modo de varrimento, os sensores ópticos varrem a altura do tubo adquirindo dados tanto de transmissão como de retrodispersão em função da altura do tubo e do tempo. Assim, fenómenos de migração (como a formação de creme) e alterações do tamanho das partículas (tais como o tamanho das bolhas) podem ser monitorizados ao longo do tempo. A teoria relevante e exemplos da utilização do sistema de medição Turbiscan podem ser encontrados em: Mengual *et al.*, *Colloids and Surfaces A*, 1999, 152, 112-123; Rouimi *et al.*, *Food Hydrocolloids*, 2005, 19, 467-478; além disso, notas de aplicação e informação útil podem ser obtidas do sítio do fabricante na Internet: www.turbiscan.com

Experimentalmente, as alterações do tamanho médio das bolhas são melhor observadas por variações na luz

retrodispersada através de uma área da amostra em que não estão a ocorrer outras alterações (tais como colapso da espuma ou formação de creme de bolhas). Aqui, utilizou-se áreas centrais da espuma. O nível de retrodispersão (BS) está ligado ao percurso médio livre de transporte de fotões, λ^* , através da espuma pela relação:

$$BS = \frac{1}{(\lambda^*)^2}$$

λ^* está dependente da fracção de volume de gás, ϕ , e o diâmetro médio da bolha d através de:

$$\lambda^* = \frac{2d}{3\phi(1-g)Q}$$

Q e g são, ambos, parâmetros ópticos de teoria de Mie, em que Q é o factor de eficiência da dispersão e g é um factor de assimetria. Para uma espuma de fracção de ar de volume conhecido, a alteração do diâmetro médio das bolhas pode ser monitorizada ao longo do tempo. Esta é calculada automaticamente através do software Turbiscan.

Os parâmetros de medição exactos que podem ser utilizados estão indicados nos Exemplos.

A estabilidade da espuma (volume de espuma em função do tempo) e a extensão da formação de creme também podem ser determinadas por um método visual observando estes fenómenos,

nas espumas amostradas para provetas graduadas.

De um modo preferido, a extensão da formação de creme é tal que, após armazenagem durante três semanas, a 5 °C, a camada de soro visível por baixo do líquido aerado, formada no fundo do recipiente contendo o produto devido a depleção de bolhas de ar na região através da formação de creme, não ultrapassa mais do que 25% da altura total do produto dentro do recipiente. De um modo mais preferido, não constitui mais do que 15 ou 20% da altura total do produto dentro do recipiente. Esta é, de um modo preferido, medida utilizando um método visual por observação deste fenómeno em espumas amostradas para provetas graduadas.

Os produtos alimentares - à temperatura ambiente (*i. e.* produtos armazenados e/ou servidos à temperatura ambiente sem o requisito de refrigeração/congelação), refrigerado ou parcialmente congelado (*i. e.* tipicamente, contendo gelo). O termo "alimento" inclui bebidas. Os produtos alimentares aerados refrigerados incluem "smoothies" e chá. Os produtos alimentares aerados parcialmente congelados incluem bebidas com gelo e outros produtos contendo gelo que são fluidos à temperatura de -10 °C (ver, por exemplo, o pedido de patente co-pendente WO 06/010426 das mesmas requerentes).

Numa forma de realização, o produto alimentar é um produto de confeitaria.

Agentes de Tensão de Escoamento

Os necessários, limite aparente de viscosidade, viscosidade e natureza viscoelástica vão não só depender da

necessidade de evitar a formação de creme, mas também vão ser dependentes do tipo de produto aerado de interesse. Numa forma de realização, este é uma espuma que pode ser vertida que vai ter um limite de elasticidade aparente e uma viscosidade relativamente baixa no cisalhamento (*i. e.*, aumento da fluidez por cisalhamento). Por exemplo, uma viscosidade de menos de 1 Pa.s dentro de um regime de corte de 10 a 100 s⁻¹.

A formulação requer um agente ou agente de tensão de escoamento, que se define aqui como um ingrediente ou ingredientes (molecular ou em partículas) que confere um limite de elasticidade aparente à fase contínua, retardando ou evitando, assim, a formação de creme pelas bolhas de ar. Os agentes de tensão de escoamento também podem aumentar a viscosidade a cisalhamento zero ou durante o fluxo. Por agitação suave (*e. g.* sacudimento ou mistura curta), no entanto, o produto vai fluir ou ser vertido porque a fase contínua apresenta comportamento de pseudoplasticidade.

As composições da invenção vão ter um limite de elasticidade aparente da fase contínua de, pelo menos, 4 Pa, de um modo preferido, pelo menos, 4,2, 4,5 ou 5 Pa. Numa forma de realização, o limite de elasticidade aparente da fase contínua é inferior a 1 MPa, de um modo preferido, inferior a 100000 Pa. O limite de elasticidade aparente da fase contínua de uma composição da invenção pode ser determinado como descrito nos Exemplos.

As composições da invenção também vão ter uma viscosidade da fase contínua, medida a uma velocidade de cisalhamento de 10 s⁻¹, de desde 0,01 a 2000 Pa.s, de um modo preferido, inferior a

1000 Pa.s, de um modo mais preferido, inferior a 500, 200 ou 100 Pa.s. A viscosidade da fase contínua para uma composição da invenção pode ser determinada tal como descrito nos Exemplos.

A temperatura à qual a fluidez, o limite de elasticidade aparente e a viscosidade da composição ou produto é considerada é a temperatura à qual o produto é normalmente servido. Por exemplo, para um produto refrigerado estes parâmetros são, tipicamente, determinados a 5 °C, enquanto que para um produto à temperatura ambiente estes parâmetros são, tipicamente, determinados à temperatura ambiente (20 °C) e para um produto contendo gelo estes parâmetros são tipicamente determinados a -10 °C. As determinações são, geralmente, realizadas à pressão de 1 atm.

Os ingredientes adequados que podem ser utilizados como agentes de tensão de escoamento, particularmente em sistemas alimentares, incluem polissacáridos gelificantes, dos quais estão sumariados a seguir alguns exemplos não limitativos:

- Biopolímeros gelificantes termorreversíveis, tais como gelatina, jota- e kapa-carragenina e agar.
- Biopolímeros gelificantes que endurecem quimicamente, derivando a sua estrutura de gel de uma interação entre o polissacárido e um ião apropriado, tal como Ca^{2+} . Exemplos incluem alginato de sódio e pectina.
- Polissacáridos bacterianos, tais como xantana ou gelana que podem formar comportamento do tipo gel fraco, que é eliminado por tensão de corte. De um modo preferido esses

polissacáridos são adicionados para dar uma quantidade final de, pelo menos, 0,4% em peso na mistura pré-aerada.

- Polissacáridos de fungos, tal como esquizofilano.

- Geles sinérgicos que compreendem de dois ou mais biopolímeros que podem ser individualmente não gelificantes, mas que, por mistura, vão formar um gel ou um gel com um módulo mais elevado. Exemplos incluem: alginato de sódio com pectina, xantana com goma de alfarroba, agar com goma de alfarroba e kapa-carragenina com goma de alfarroba.

Vários agentes de tensão de escoamento descritos acima são utilizados convencionalmente para gelificar produtos de modo a que endureçam, e. g. gelatina. No contexto da presente invenção, para assegurar que o produto resultante é fluido, vão, tipicamente, ser incluídos em níveis mais baixos.

Fontes de referência úteis que descrevem polissacáridos e o seu comportamento em solução são: "Food Polysaccharides and their Applications", ed. A. M. Stephen, Marcel Dekker Inc., 2005. "Food Gels", ed. P. Harris, Elsevier, 1990.

Os polissacáridos gelificantes não são os únicos ingredientes que podem ser utilizados como agentes de tensão de escoamento no contexto desta invenção. Pode ser utilizado qualquer ingrediente (molecular ou em partículas) que resulte num limite de elasticidade aparente da fase contínua. Outros exemplos de agentes de tensão de escoamento incluem:

- Lipogeles. Estes incluem, mas não estão limitados a,

ésteres de poliglicerol de ácidos gordos saturados, e misturas de monoglicéridos de ácidos gordos com ésteres de ácido cítrico de ácidos gordos saturados ésteres de ácido láctico de ácidos gordos saturados, ou ésteres de ácido diacetil tartárico de ácidos gordos saturados. Tipicamente, a quantidade de ingrediente lipogel seria inferior a cerca de 2-5% em peso na mistura pré-aerada. Exemplos de como produzir lipogeles podem ser encontrados em Heertje *et al.*, *Food Science and Technology*, 1998, 31, 387-396.

- Proteínas gelificantes (termicamente ou quimicamente), e. g. proteína de soro do leite.
- Emulsões de óleo em água, em que as partículas de óleo dispersas interactuam umas com as outras para dar uma fase contínua com uma natureza gelificada.
- Fibras, e. g. de frutos ou de origem vegetal, celulose modificada, etc.

Ingredientes não gelificantes que aumentam a viscosidade da fase contínua (espessura)

Além dos agentes de tensão de escoamento acima referidos, também podem ser adicionados espessantes para aumentar a viscosidade da mistura pré-aerada, permitindo, assim, o controlo das propriedades de fluidez do produto aerado na utilização. Estes não dão origem a um limite de elasticidade aparente quando utilizados individualmente, mas vão contribuir para a espessura global e comportamento de fluidez do produto. Precisam, contudo, de ser utilizados em associação com um agente ou agentes de

tensão de escoamento. Esses espessantes podem ser utilizados para aumentar o "corpo" de um batido de leite aerado no momento do consumo, por exemplo.

Exemplos não limitativos de espessantes são: amido não gelificante, proteína do soro de leite, goma de alfarroba, goma de guar, goma-arábica ou carboximetilcelulose. O espessamento ou viscosificação da mistura pré-aerada também pode ser conseguido utilizando diversas outras vias de moléculas ou partículas. Por exemplo, a adição de polpa de frutos ou vegetais, açúcares de alto peso molecular tal como xarope de milho, ou a utilização de proteínas, e. g. proteína de soro do leite. Também podem ser preparados alguns sistemas à base de emulsões para espessar por exemplo: guarnições e natas batidas. Os lipogeles também podem ser utilizados abaixo da concentração necessária para formar um limite de elasticidade aparente.

O ou os agentes de tensão de escoamento e os espessantes quando presentes, são seleccionados e adicionados em quantidades adequadas para dar um produto, antes da aeração, que tenha o limite de elasticidade aparente e a viscosidade desejados, como discutido acima.

Os produtos alimentares aerados podem, opcionalmente, conter outros ingredientes, tais como um ou mais dos seguintes: outras proteínas, tal como proteínas lácteas, quer como ingredientes puros ou como ingredientes líquidos, e. g. leite ou nata; óleo ou gordura, nomeadamente na forma de uma fase emulsionada; açúcares; sais; corantes e aromas; emulsionantes químicos, tais como monoglicéridos, chá ou café; purés/extractos/sumos de frutas ou de vegetais; estabilizadores ou espessantes, tais como polissacáridos; conservantes;

inclusões, tais como nozes, frutos, caramelos de leite.

Para produtos não alimentares aerados, além de hidrofobina e um agente espessante apropriado, podem ser incluídos outros ingredientes para criar o tipo específico de produto. Estes incluem, mas não estão limitados a:

- Tensoactivos aniónicos, catiónicos e não iónicos.
- Ácidos gordos, tais como ácido esteárico e ácido palmítico e ácidos gordos de mono/di- ou tri-glicéridos.
- Ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico e hidróxido de sódio
- Conservantes, e. g. ácido benzóico
- Álcoois de açúcares, e. g. glicerol e sorbitol
- Polímeros, tais como PEG e carbómero

A quantidade de hidrofobina presente no produto vai geralmente variar dependendo da formulação do produto e do volume da fase de ar. Tipicamente, o produto vai conter, pelo menos, 0,001% em peso de hidrofobina, de um modo mais preferido, pelo menos, 0,005 ou 0,01% em peso. Tipicamente, o produto vai conter menos do que 1% em peso de hidrofobina. A hidrofobina pode ser de uma única fonte ou de uma pluralidade de fontes, e. g. a hidrofobina pode ser uma mistura de dois ou mais polipéptidos hidrofobinas diferentes.

De um modo preferido, a hidrofobina é uma hidrofobina da

classe II.

A presente invenção também engloba composições para a produção de um produto aerado, tipicamente um produto alimentar, de acordo com a presente invenção, cuja composição compreende uma hidrofobina e um agente de tensão de escoamento. Essas composições incluem pré-misturas líquidas, por exemplo, pré-misturas utilizadas na produção de produtos de confeitaria refrigerados ou parcialmente congelados, e misturas secas, por exemplo pós, ao quais é adicionado um líquido aquoso, tal como leite ou água, antes ou durante a aeração.

As composições para a produção de um produto refrigerado ou parcialmente congelado da invenção, irão compreender outros ingredientes, além da hidrofobina e do agente de tensão de escoamento, que são, normalmente, incluídos no produto, e. g. no caso de produtos alimentares, açúcar, gordura, agentes emulsionantes, aromatizantes, etc. As composições podem incluir todos os restantes ingredientes necessários para fazer o produto de tal modo que a composição esteja pronta para ser processada, *i. e.* aerada, para formar um produto aerado da invenção.

As composições secas para a produção de um produto aerado da invenção vão também compreender outros ingredientes, além da hidrofobina e do agente de tensão de escoamento, que são, normalmente, incluídos no produto, e. g. no caso de produtos alimentares, açúcar, gordura, agentes emulsionantes, aromatizantes, etc. As composições podem incluir todos os restantes ingredientes não líquidos necessários para fazer o produto de tal modo que tudo o que o utilizador precisa é de acrescentar um líquido aquoso, tal como água ou leite e a composição está pronta para ser processada para formar um

produto aerado da invenção. Estas composições secas, exemplos das quais incluem pós e granulados, podem ser concebidas tanto para utilização industrial como para venda a retalho e beneficiam de volume reduzido e maior prazo de validade.

A hidrofobina é adicionada numa forma e numa quantidade tal que esteja disponível para estabilizar a fase de ar. Pelo termo "adicionada" significa-se que a hidrofobina é deliberadamente introduzida no produto com o objectivo de tirar partido das suas propriedades de estabilização de espuma. Consequentemente, quando estão presentes ou são adicionados ingredientes que contêm contaminantes fúngicos, que podem conter polipéptidos de hidrofobina, isto não constitui adição de hidrofobina dentro do contexto da presente invenção.

Tipicamente, a hidrofobina é adicionada ao produto numa forma tal que seja capaz de auto-agregação numa superfície ar-líquido.

Tipicamente, a hidrofobina é adicionada ao produto ou composições da invenção numa forma isolada, tipicamente, pelo menos, parcialmente purificada, tal como, pelo menos, 10% de pureza, com base no peso de sólidos. Por "adicionada na forma isolada", significa-se que a hidrofobina não é adicionada como parte de um organismo de ocorrência natural, tal como um fungo, que exprime naturalmente hidrofobinas. Em vez disso, a hidrofobina, tipicamente, foi extraída de uma fonte de ocorrência natural ou obtida por expressão recombinante num organismo hospedeiro.

Numa forma de realização, a hidrofobina é adicionada ao produto em forma monomérica, dimérica e/ou oligomérica (*i. e.*

que consiste em 10 unidades monoméricas ou menos). De um modo preferido, pelo menos, 50% em peso da hidrofobina adicionada está em, pelo menos, uma destas formas, de um modo mais preferido, pelo menos, 75, 80, 85 ou 90% em peso. Uma vez adicionada, a hidrofobina vai tipicamente sofrer agregação na interface ar/líquido e portanto seria de esperar que diminuísse a quantidade de monómero, dímero e oligómero.

Numa forma de realização, a hidrofobina é adicionada às composições aeradas da invenção numa forma isolada, tipicamente, pelo menos, parcialmente purificada.

Pode utiliza-se a associação de hidrofobina e um ou mais agentes de tensão de escoamento tanto para estabilizar a fase de ar numa composição fluida aerada (geralmente por inibição de engrossamento das bolhas, *i. e.* verificou-se que as hidrofobinas não só estabilizam o volume da espuma mas também o tamanho das bolhas no seio da espuma) e para inibir a formação de creme na composição conferindo as características reológicas apropriados à fase contínua.

Noutro aspecto, a presente invenção pode ser aplicada a composições aeradas solidificadas ou congeladas, em que a formação de creme é um problema no período de tempo necessário para que o produto solidifique ou congele. Em conformidade, a presente invenção também proporciona um método para inibir a formação de creme numa composição aerada solidificada ou congelada antes da solidificação ou congelamento da composição, cujo método compreende a adição de hidrofobina e um agente de tensão de escoamento à composição antes ou durante a solidificação ou congelação do produto. De um modo preferido o tempo que o produto leva a congelar ou solidificar é superior a

1 hora. Numa forma de realização preferida, o produto, imediatamente depois da aeração, tem uma viscosidade da fase contínua inferior a 100 Pa.

A presente invenção vai agora ser adicionalmente descrita com referência aos seguintes exemplos que são apenas ilustrativos e não limitativos.

Descrição das Figuras

Figura 1: Viscosidade em função da tensão de cisalhamento para soluções contendo 0,1% de hidrofobina da classe II (HFBII) e 0,3, 0,4 e 0,5% de xantana.

Figura 2: Viscosidade em uma função da velocidade de cisalhamento para soluções contendo 0,1% de HFBII e 0,3, 0,4, e 0,5% de xantana.

Figura 3. Diâmetro médio das bolhas em relação ao no tempo $t=0$ em função do tempo para espumas estabilizadas com caseinato de sódio (Na Cas), leite em pó desnatado (SMP), éster de poliglicerol (PGE) e HFBII.

Figura 4. Estabilidade da espuma para formação de creme para espumas estabilizadas por um agente de tensoactivo com 0,5% de xantana na fase aquosa.

Figura 5: Diâmetro médio das bolhas em relação ao no tempo $t=0$ em função do tempo para as espumas feitas utilizando HFBII com diferentes concentrações de goma xantana.

Figura 6. Estabilidade à formação de creme para espumas de HFBII com xantana na fase contínua.

Figura 7: Imagens de espumas contendo 0,1% de HFBII com (esquerda), 0,3% de xantana após 5 meses de armazenagem (centro), 0,4% de xantana após 6 semanas de armazenagem (direita), 0,5% de xantana após 5 meses de armazenagem a 5 °C.

Figura 8: Imagens de espuma contendo 0,1% de HFBII e 0,5% de xantana após 5 meses de armazenagem a 5 °C. Espuma colocada em proveta graduada de 100 mL (esquerda) e grande plano (direita), mostrando um grau muito pequeno (<5% em volume) de separação de fases (formação de creme).

Figura 9: Imagens de um produto de batido de leite aerado contendo 0,1% de HFBII e 0,41% de xantana feito de fresco (esquerda) e após 3 semanas de armazenagem a 5 °C (direita), mostrando pouca formação de creme ou crescimento de bolhas.

Figura 10: Imagens de um produto batido de fruta aerado contendo 0,1% de HFBII e 0,41% de xantana feito de fresco (esquerda) e após 3 semanas de armazenagem a 5 °C (direita), mostrando pouca formação de creme ou crescimento de bolhas.

EXEMPLOS

Metodologias Experimentais

Descreve-se, aqui, a base dos métodos experimentais utilizados para medir as propriedades das espumas e a reologia das soluções de produtos que estão compreendidas nesta invenção. Os parâmetros experimentais exactos escolhidos para as determinações estão descritos no Exemplo.

Determinações de Estabilidade da Espuma, Tamanho das Bolhas e Formação de Creme

O principal método para medir alterações do tamanho de bolhas e a extensão da formação de creme em amostras de espuma foi a utilização de uma técnica de dispersão de luz. Utilizou-se o sistema de medição Turbiscan TLab (Formulaction, França), que analisa tanto a luz retrodispersada como a transmitida pela amostra aerada de interesse. Isto está descrito acima em mais pormenor.

Também se observou a estabilidade da espuma (volume de espuma em função do tempo) e a extensão da formação de creme por um método de visual, por observação destes fenómenos em espumas amostradas para provetas graduadas.

Medição da viscosidade da fase contínua e limite de elasticidade aparente

Uma medida da viscosidade da fase contínua e do limite de

elasticidade aparente das misturas não aeradas foi feita por utilização de reologia. Os pormenores experimentais exactos estão sumariados nos Exemplos. Para determinar uma medida do limite de elasticidade aparente e a viscosidade a cisalhamento zero das misturas a partir do log da tensão de cisalhamento em função de log de dados de viscosidade, o regime de redução da viscosidade com o aumento da taxa de deformação das curvas foi ajustado a um modelo de Hershel-Bulkley. Considera-se que a viscosidade aparente é a tensão de corte mínima que provoca o aparecimento do aumento da fluidez por corte. Este é um método corrente utilizado pelos especialistas na matéria. Referências úteis que descrevem este comportamento podem ser encontradas em Stokes e Telford (*Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2004, 124, 137-146) e Barnes, Hutton e Walters (*An Introduction to Rheology*, Rheology Series 3, Elsevier Science, 1989).

Exemplo 1: Espumas estáveis fluidas com formação de creme reduzida

Materiais e Formulações

Exemplos de produtos refrigerados aerados foram preparados utilizando 3 tipos de proteína tensoactiva (A a C) e um emulsionante formador de lipogel (D):

- A: Caseinato de Sódio (Na Cas)
- B: Leite em Pó Desnatado (SMP)
- C: Hidrofobina (HFBII) de *Trichoderma reesei*
- D: Éster de poliglicerol de ácidos gordos saturados (PGE)

Os pormenores dos materiais utilizados estão sumariados na Tabela 1 e as formulações a partir das quais foram preparadas amostras de espumas refrigeradas estão apresentadas na Tabela 2.

As espumas foram preparadas e armazenadas a temperaturas de refrigeração (5 °C). A sua estabilidade da espuma, em relação ao tamanho das bolhas e à formação de creme foram monitorizadas ao longo do tempo utilizando o instrumento Turbiscan.

Tabela 1. Ingredientes utilizados com informação do fornecedor

Ingrediente	Composição	Fornecedor
Caseinato de sódio	88-90% de proteína, 1,5% de gordura, 6% de humidade	DMV International, Holanda
Leite em pó desnatado	33-36% de proteína, 0,8% de gordura, 3,7% de humidade	United Milk, UK
Éster de poliglicerol (PGE 55)	100% de gordura	Danisco
HFB II	Purificada a partir de <i>T. reesei</i> *	VTT Biotechnology, Finlândia
Goma xantana (Keltrol RD)	polissacárido	CP Kelco

* Hidrofobina da classe II purificada a partir de *Trichoderma reesei*, essencialmente como descrito no documento W000/58342 e Sob et al., 2001, *Biomacromolecules* 2: 511-517).

Tabela 2. Formulações

	Mistura A	Mistura B	Mistura C	Mistura D	Mistura E	Mistura F	Mistura G
Ingrediente	Concentração % em peso						
Caseinato de sódio	3,4	0,5	--	--	--	--	--
Leite em pó desnatado	--	--	10,4	--	--	--	--
PGE 55	--	--	--	--	--	--	0,5
HFB II	--	--	--	0,1	0,1	0,1	--
Goma xantana	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,5
Água	96,9	99,0	89,1	99,4	99,5	99,6	99,0

Preparação e Análise dos Produtos Aerados

Preparação das misturas

Todas as misturas foram feitas em lotes de 100 g. Para as Misturas A, B e C (contendo caseinato de sódio e leite em pó desnatado, respectivamente), a proteína e a goma xantana foram misturadas e adicionadas lentamente a água com agitação à temperatura ambiente. As soluções foram subsequentemente aquecidas (a 55 °C, para Na Cas e a 40 °C para o SMP) para assegurar que as proteínas foram devidamente hidratadas. As misturas foram arrefecidas e armazenadas a 5 °C até utilização posterior.

A mistura G foi preparada misturando a goma xantana em pó e o PGE em pó, conjuntamente, dispersando em água desionizada fria e, depois, aquecendo a 60 °C com agitação durante

30 minutos. Esta solução foi, então, arrefecida e armazenada a 5 °C até utilização posterior.

Para as Misturas D, E e F (contendo HFB II), a xantana foi primeiramente dispersa em água fria, com agitação, durante, pelo menos, 30 minutos. Em seguida, adicionou-se a esta a concentração necessária de HFB II como uma alíquota. A solução foi, então, suavemente sonicada num banho de ultrassons durante 30 segundos para dissolver completamente a HFB II. A mistura foi arrefecida, e armazenada a 5 °C até utilização posterior.

Os níveis elevados de caseinato de Na e SMP foram escolhidos uma vez que as concentrações de proteína são proporcionais aos níveis encontrados em bebidas de batidos de leite vendidas comercialmente.

Processo de Aeração

80 mL de mistura foram submetidos a corte num aparelho com um recipiente com agitação (arrefecido a 5 °C) a uma velocidade de 1200 rpm durante um período de tempo que correspondia à obtenção de 100% de aumento de volume. Os tempos de aeração para atingir 100% de aumento de volume estão sumariados na Tabela 3. O equipamento com recipiente com agitação consiste num recipiente de aço inoxidável com camisa, cilíndrico, montado verticalmente, com proporções internas de 105 mm de altura e 72 mm de diâmetro.

O rotor utilizado para cortar a amostra é constituído por um impulsor rectangular de proporções correctas para raspar a superfície interior do recipiente à medida que roda (dimensões

72 mm x 41,5 mm). Também ligadas ao rotor estão duas lâminas semicirculares (60 mm de diâmetro) de alto poder de corte, posicionadas num ângulo de 45° em relação ao dispositivo de montagem rectangular. Após a aeração, as amostras foram armazenadas a 5 °C em provetas graduadas de 100 mL ou frascos Turbiscan correntes antes de análise posterior.

Amostra	Tempo de aeração/min	Aumento de volume/%
Mistura A	1	100
Mistura B	1,16	100
Mistura C	1	100
Mistura D	2	100
Mistura E	2	100
Mistura F	2	100
Mistura G	10	100

Tabela 3. Tempo de arejamento e aumento de volume para as misturas A-G

Determinações da Viscosidade e do Limite de Elasticidade Aparente

As medições reológicas foram efectuadas utilizando um reómetro AR-G2 (TA Instruments Ltd., Crawley, UK). Foram realizadas experiências de fluxo interrompido em misturas não aeradas para determinar curvas de viscosidade em função da tensão de corte e de viscosidade em função da velocidade de corte. Todas as medições foram realizadas a 5 °C (utilizando arrefecimento controlado Peltier). Foi utilizada uma geometria

de cone e prato. O cone era feito de aço inoxidável e tinha 6 mm de diâmetro com um ângulo de 2°. A partir destes dados, foi possível fazer gráficos da viscosidade em função da tensão de corte e da viscosidade em função da velocidade de corte. Utilizando o modelo de Hershel Bulkley (que se ajusta aos dados no extremo dos dados da tensão de corte elevada), pode ser determinado um limite de elasticidade aparente.

Medição da Espuma E da Estabilidade das Bolhas e da Extensão da Formação de Creme Na Espuma

A estabilidade da espuma e das bolhas aí formadas foi medida utilizando o Turbiscan TLab, cujos pormenores de funcionamento foram discutidos anteriormente. Isto permite a determinação das seguintes em função do tempo: (1) O volume de espuma (*i. e.*, medição da perda de fase de ar global). (2) O tamanho médio das bolhas. (3) A extensão da formação de creme na espuma.

A espuma produzida foi colocada num tubo de amostra de vidro Turbiscan até uma altura de cerca de 42 mm, correspondendo a, aproximadamente, 20 mL de espuma. O equipamento varre e mede então tanto a luz retrodifundida como transmitida entre a altura de 2 e 55 mm. As medições foram feitas durante um período de várias semanas. Uma vez que os dados são recolhidos ao longo de toda a altura da amostra, a partir destes, os valores médios dos perfis de retrodispersão entre limites definidos (altura inferior e superior) dão informação específica em relação a alterações na amostra nessa área, *e. g.* dimensão das bolhas ou formação de creme.

Tamanho das bolhas: A partir dos dados de retrodispersão medidos entre 20 e 30 mm, o tamanho médio das bolhas foi calculado automaticamente a partir da luz retrodispersada. Os índices de refração foram tomados como os da água e do ar. A fracção de volume da fase de ar da espuma era 0,5. Embora a fracção de volume da fase de ar da espuma possa variar ao longo do tempo, particularmente se não é estável e ocorre formação de creme, verificou-se que fazer medições entre 20 e 30 mm de altura da amostra dava dados de tamanho que são fiáveis salvo se a espuma fosse muito instável. Se a espuma fosse altamente instável, então, os dados sobre o tamanho necessitam de ser tratada com cuidado num sentido quantitativo mas podem ser comparados com a de outras espumas.

Formação de creme na espuma: A extensão da formação de creme na espuma foi medida por dois métodos.

1. Dispersão da luz utilizando o Turbiscan: A quantidade de formação de creme na espuma ao longo do tempo foi determinada pela medição da alteração na luz retrodifundida ao longo do tempo entre a altura da amostra de 0 a 10 mm. À medida que a espuma forma creme, é de prever que a intensidade de retrodifusão entre estas alturas diminua, uma vez que mais luz vai ser retrodifundida na presença de bolhas de ar. Estes dados foram obtidos, principalmente, para as espumas com HFBII porque a estabilidade das bolhas significa que as alterações da retrodifusão podem ser atribuídas somente a alterações do volume das bolhas de ar no interior de uma região da célula da amostra. Para espumas menos estáveis que apresentam tanto um crescimento rápido das bolhas como a formação de creme, é mais difícil desconvolucionar quantitativamente os dois uma vez que ambos os processos ocorrem ao mesmo tempo.

2. Observações visuais numa proveta graduada. 100 mL da espuma produzida foram colocados numa proveta graduada de 100 mL e o topo coberto com película aderente para evitar a secagem da parte de cima da espuma. Foram registadas a altura da espuma e a altura do soro (fase contínua) à medida que a espuma forma creme ao longo do tempo. Mesmo quando o crescimento das bolhas e separação do soro (formação de creme) ocorrem ao mesmo tempo, a extensão da formação de creme pode ser expressa quantitativamente.

Resultados e Discussão

Viscosidade e Limite de Elasticidade Aparente das Misturas

A viscosidade e o limite de elasticidade aparente da mistura é importante na prevenção ou controlo da velocidade com que as bolhas formam creme. Portanto, na formulação de produtos aerados em que é parada a formação de creme, é apropriado fazer alguma análise da reologia para ajudar na capacidade de previsão. Descreve-se aqui algumas das principais características reológicas das Misturas D, E e F, contendo 0,1% em peso de HFBI e 0,5, 0,4 e 0,3% em peso de xantana em solução, respectivamente.

As Figuras 1 e 2 mostram, ambas, condições reológicas importantes para possibilitar espumas que se pode vazar. Os dados da Figura 1 mostram o efeito da concentração de xantana no limite de elasticidade aparente e na viscosidade da solução. Utilizando o modelo de Hershel Bulkley (que se ajusta aos dados no extremo dos dados de tensão de corte elevada), pode ser

determinado um limite de elasticidade aparente. A partir dos dados, calcula-se para:

0,3% em peso de solução de xantana com 0,1% de hidrofobina -
limite de elasticidade aparente = 2,8 Pa

0,4% em peso de solução de xantana com 0,1% de hidrofobina -
limite de elasticidade aparente = 4,5 Pa

0,5% em peso de solução de xantana com 0,1% de hidrofobina -
limite de elasticidade aparente = 5,5 Pa

O limite de elasticidade aparente é o principal parâmetro, que vai governar a velocidade e a extensão da formação de creme. Os dados da Figura 2 mostram o efeito da concentração de xantana na viscosidade das misturas com cisalhamento elevado. Sugere-se que a viscosidade da mistura a taxas de cisalhamento entre 10 e 100 s^{-1} é comparável à viscosidade que seria experimentada no fluxo ou consumo. Para cada uma das concentrações de xantana, a viscosidade da mistura no regime de velocidade de cisalhamento de 10 a 100 s^{-1} é inferior a 1 Pa.s.

Estabilidade das Bolhas

A alteração do tamanho médio relativo das bolhas relativa (d_r) nas espumas em função do tempo está ilustrada na Figura 3. No caso da HFBII, as bolhas são muito estáveis e não se observou alteração do tamanho médio após várias semanas de armazenagem na refrigeração. 0,5% de PGE também apresenta uma boa estabilidade, embora o tamanho de médio das bolhas aumente gradualmente. Além

disso, o nível de PGE utilizado (0,5% em peso) é mais elevado do que o normalmente permitido em produtos alimentares. Cada das proteínas não-HFB apresenta fraca estabilidade. Ocorre crescimento rápido das bolhas em apenas algumas horas para cada uma das misturas aeradas. O engrossamento destas espumas acelera no curto tempo de vida, em última análise conduzindo à desagregação completa da espuma.

Formação de Creme da Espuma

A Figura 4 mostra as alterações da retrodispersão em função do tempo na gama de alturas de 0 a 10 mm no frasco da amostra. No caso de PGE e HFBII, em que se demonstrou que os tamanhos das bolhas se mantinham praticamente constantes durante períodos de tempo longos (particularmente com HFBII), é evidente que a retrodispersão também não altera significativamente. Só se observou uma pequena quantidade de formação de creme ao longo de escalas de tempo longas (durante 1000 horas, o que equivale a mais de um mês).

No caso das espumas estabilizadas pelas proteínas lácteas (SMP e Na Cas), a interpretação dos dados de dispersão da luz é um tanto mais complexa, uma vez que tanto a formação de creme como o crescimento das bolhas vão ocorrer concorrentemente. No entanto, podem ser feitos alguns comentários gerais. Utilizando uma concentração de 0,5% de xantana, no tempo = 0 as bolhas são de tamanho inicial comparável ao das feitas com HFBII. Por isso, esperamos que a formação de creme seja inibida neste ponto. No entanto, ocorre o crescimento de bolhas (devido a desproporcionação e coalescência) conduzindo a uma diminuição da retrodifusão medida. Finalmente, as bolhas vão exceder um

diâmetro médio crítico e depois vão começar a formar creme à medida que a impulsão hidrostática excede o limite de elasticidade aparente mantendo as bolhas no seu lugar. Embora a presença de goma xantana confira ao sistema um limite de elasticidade aparente que se espera vá evitar a formação de creme das bolhas pequenas (ca. <200 µm de diâmetro), eventualmente, as bolhas crescem para além deste e o limite de elasticidade aparente não é suficiente para impedir a ascensão das bolhas. Este processo e o crescimento de bolhas adicional, conduz a uma velocidade acelerada de decréscimo da retrodifusão ao longo do tempo.

A espuma estabilizada por HFBII mostra, claramente, uma estabilidade superior à de qualquer dos outros tensoactivos aqui investigados.

Efeito da concentração de xantana (i. e., efeito do limite de elasticidade aparente)

Os dados apresentados nas Figuras 5 e 6 demonstram o efeito da concentração de xantana, e por isso do limite de elasticidade aparente, na extensão da formação de creme numa espuma que consiste em bolhas estáveis produzidas utilizando 0,1% de HFBII.

Na Figura 5, é claro que para uma concentração de 0,5% de xantana, ao longo de um período de 1000+ horas, o tamanho das bolhas na área da amostra medida se altera muito pouco. Diminuindo a concentração de xantana para 0,4% conduz a uma pequena diminuição do tamanho medido das bolhas ao longo de períodos de tempo longos. Isto não é provavelmente devido a

encolhimento das bolhas, mas sim devido à formação de creme pelas bolhas. As bolhas maiores ascendem para fora da zona de medição, deixando uma maior proporção de bolhas na zona de medição. Isto conduz a uma diminuição aparente do tamanho médio das bolhas. O mesmo efeito é observado para 0,3% de xantana ao longo de um período de tempo mais curto. O efeito é mais rapidamente devido ao menor limite de elasticidade aparente. Deve ser salientado, contudo, que as alterações observadas a concentrações de 0,4 e 0,5% de xantana são relativamente pequenas.

As conclusões retiradas da Figura 5 estão, ainda, demonstradas na Figura 6. Esta mostra a extensão da formação de creme através da retrodispersão medida no fundo do frasco de amostra (0 a 10 mm). Claramente, para 0,5% de xantana a formação de creme é inibida com apenas uma pequena quantidade de camada de soro visível aparente após mais de um mês de armazenagem. A formação de creme ocorre mais rapidamente e numa maior extensão à medida que é reduzida a quantidade de xantana e o limite de elasticidade aparente é reduzido. Estas alterações ocorrem ao mesmo tempo que as alterações do tamanho das bolhas observadas na Figura 5.

O aspecto visual das espumas aeradas contendo HFBII e xantana após armazenagem a 5 °C está apresentado nas Figuras 7 e 8. É claro que, depois de um tempo de armazenagem prolongado, utilizando 0,5% de xantana como o agente espessante, a formação de creme a partir das bolhas é quase completamente inibida e apenas se pode observar uma ligeira separação de fases. Utilizando 0,4% de xantana, há uma maior quantidade (embora ainda só pequena) de formação de creme. Utilizando 0,3% de xantana, o limite de elasticidade aparente não é suficientemente

grande para evitar a formação de creme durante o tempo de armazenagem. Este produto específico não seria aceitável (o nível de separação de soro observado no fundo do frasco excede 10% após 3 semanas), ao passo que, utilizando 0,4 e 0,5% de xantana, seria aceitável (o nível de soro era inferior a 10% após 3 semanas).

Em conformidade, uma vez que o limite de elasticidade aparente da fase contínua calculado acima para 0,3, 0,4 e 0,5% de xantana é 2,8, 4,5 e 5,5 Pa, respectivamente, as requerentes determinaram que o limite de elasticidade aparente deve ser pelo menos cerca de 4 Pa.

Exemplo 2: Batido de leite com chocolate aerado

Um batido de leite com chocolate aerado foi preparado como se segue. Foi adquirido um batido de leite disponível comercialmente (Frijj™ Thick Fresh Milkshake, produzido por Dairy Crest Ltd, Shropshire, RU). Este é um produto não aerado e, de acordo com a lista de ingredientes, continha: leite desnatado, leite inteiro, açúcar, amido de milho modificado, pó de cacau com teor de gordura reduzido, leitelho em pó e estabilizadores (carragenina e goma de guar). Adicionou-se goma xantana lentamente ao batido de leite, com agitação, até uma concentração de 0,5% em peso. Esta foi, então, misturada durante 20 minutos para permitir que a goma xantana ficasse completamente hidratada. Um volume conhecido de solução de hidrofobina a 0,5% em peso de hidrofobina foi aerada até 400% de aumento de volume utilizando um dispositivo manual Aerolatte™. Este foi adicionado ao batido de leite batido para dar um produto de batido de leite aerado com 100% de aumento de volume,

uma concentração global de hidrofobina de 0,1% em peso e uma concentração global de xantana de cerca de 0,41% em peso. O produto batido de leite aerado foi então armazenado a 5 °C e a sua estabilidade monitorizada ao longo de um período de três semanas. A Figura 9 mostra que após 3 semanas, o produto batido de leite aerado retinha uma fase de ar estável que não formou creme ou colapsou e não mostrou crescimento de bolhas significativo.

Exemplo 3: Batido de fruta aerado

Um “smoothie” de fruta aerado foi preparado utilizando uma bebida Vie Shots™, produzida por Unilever UK como uma base de puré de fruta. A bebida Vie Shot™ continha: puré de banana (28%), concentrado de sumo de laranja (26%), concentrado de sumo de cenoura (23%), concentrado de sumo de abóbora (14%), polpa de laranja (4%), concentrado de sumo de limão, concentrado de cereja acerola (1,5%) e pectina de maçã. O pH foi medido (à temperatura ambiente) para ser 4,17. Adicionou-se goma xantana lentamente ao puré de fruta, com agitação, até uma concentração de 0,5% em peso. Este foi, então, misturado durante 20 minutos para permitir que a goma xantana ficasse completamente hidratada. Um volume conhecido de solução de 0,5% em peso de hidrofobina foi aerado até 400% de aumento de volume utilizando um dispositivo manual Aerolatte™. Este foi adicionado ao puré de fruta para dar um produto “smoothie” de fruta aerado com aproximadamente 100% de aumento de volume, uma concentração global de hidrofobina de 0,1% em peso e uma concentração global de xantana de cerca de 0,41% em peso. O produto “smoothie” de fruta aerado foi então armazenado a 5 °C e a sua estabilidade monitorizada ao longo de um período de três semanas. A Figura 10

mostra que após 3 semanas o produto “smoothie” de fruta aerado retinha uma fase de ar estável e não ocorreu crescimento de bolhas ou formação de creme significativa.

Lisboa, 8 de Fevereiro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Composição aerada capaz de fluir compreendendo hidrofobinae um agente de tensão de escoamento, tendo a composição uma viscosidade da fase contínua, medida a uma velocidade de cisalhamento de 10 s^{-1} , de desde 0,01 a 2000 Pa.s, e um limite de elasticidade aparente da fase contínua de, pelo menos, 4 Pa.
2. Composição aerada de acordo com a reivindicação 1, compreendendo, pelo menos, 0,001% em peso de hidrofobina.
3. Composição aerada de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a hidrofobina está em forma isolada.
4. Composição aerada de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que a hidrofobina é uma hidrofobina da classe II.
5. Composição aerada de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o agente de tensão de escoamento é um polissacárido.
6. Composição aerada de acordo com a reivindicação 5, em que o polissacárido é xantana e/ou goma gelana.
7. Composição aerada de acordo com qualquer das reivindicações anteriores que compreende um espessante.
8. Composição aerada de acordo com qualquer das

reivindicações anteriores que pode ser vertida.

9. Composição aerada de acordo com qualquer das reivindicações anteriores que é um produto alimentar aerado.
10. Produto alimentar aerado de acordo com a reivindicação 9 que é um produto alimentar refrigerado.
11. Utilização de uma hidrofobina e de um agente de tensão de escoamento para inibir a formação de creme numa composição aerada capaz de fluir.

Lisboa, 8 de Fevereiro de 2011

Fig.1.

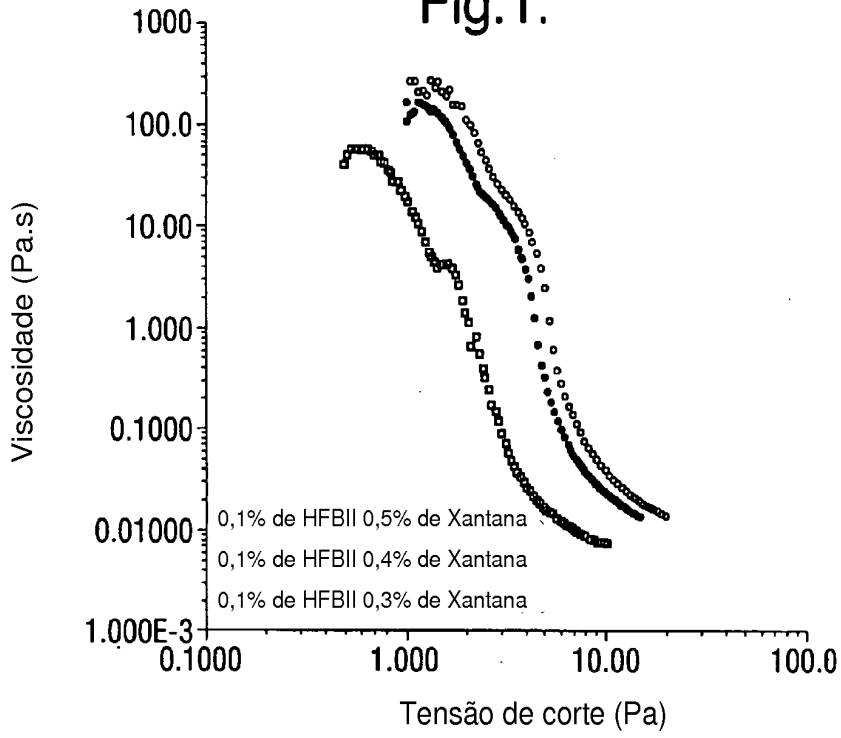
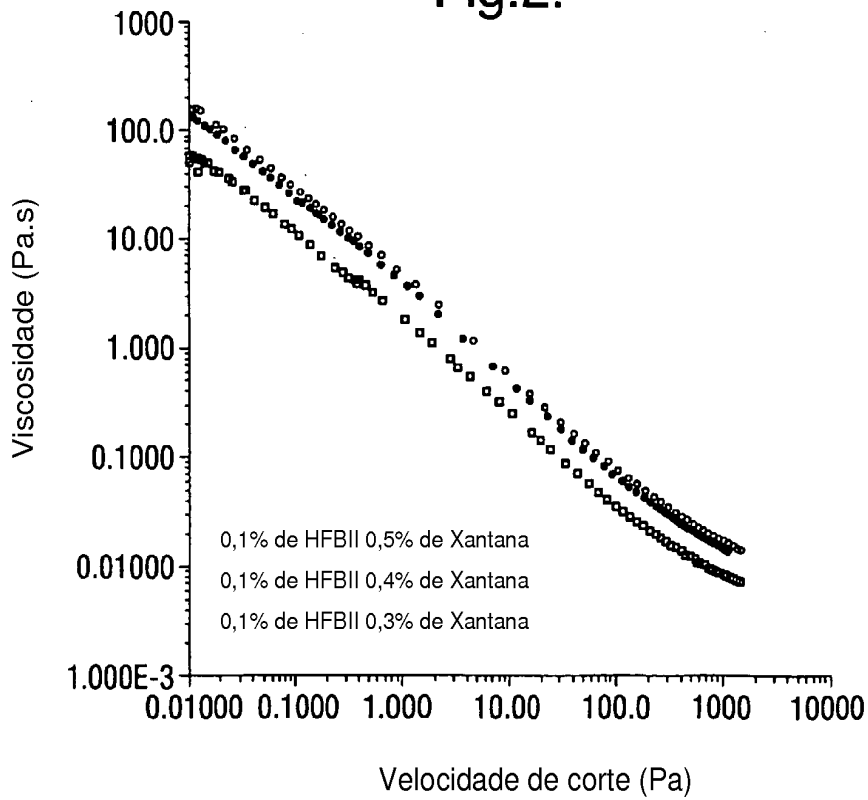
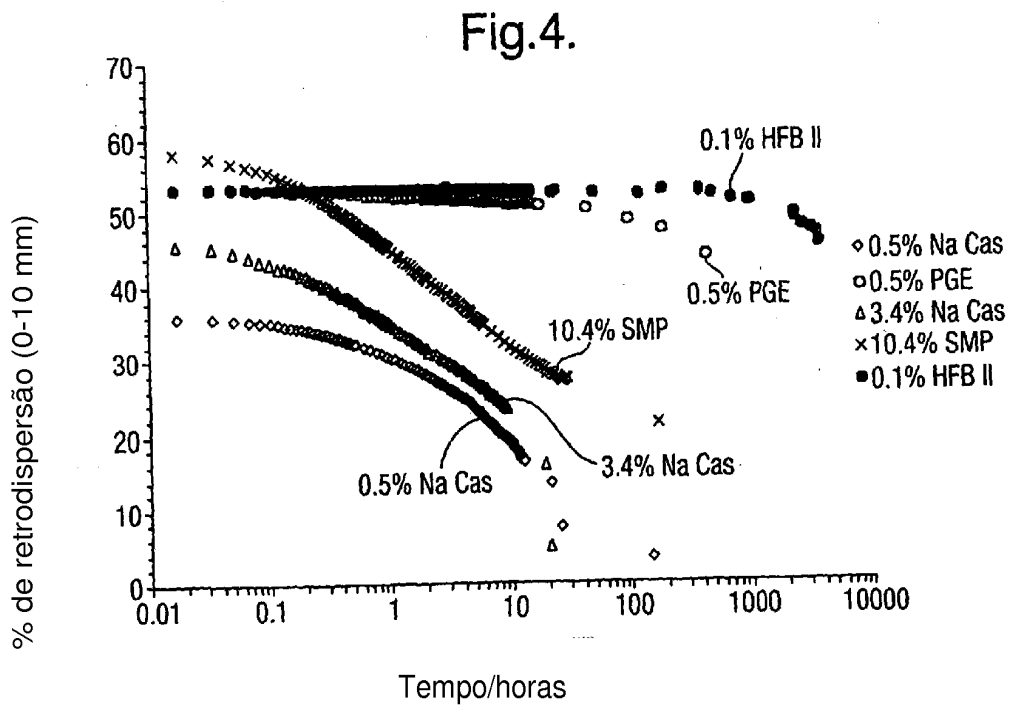
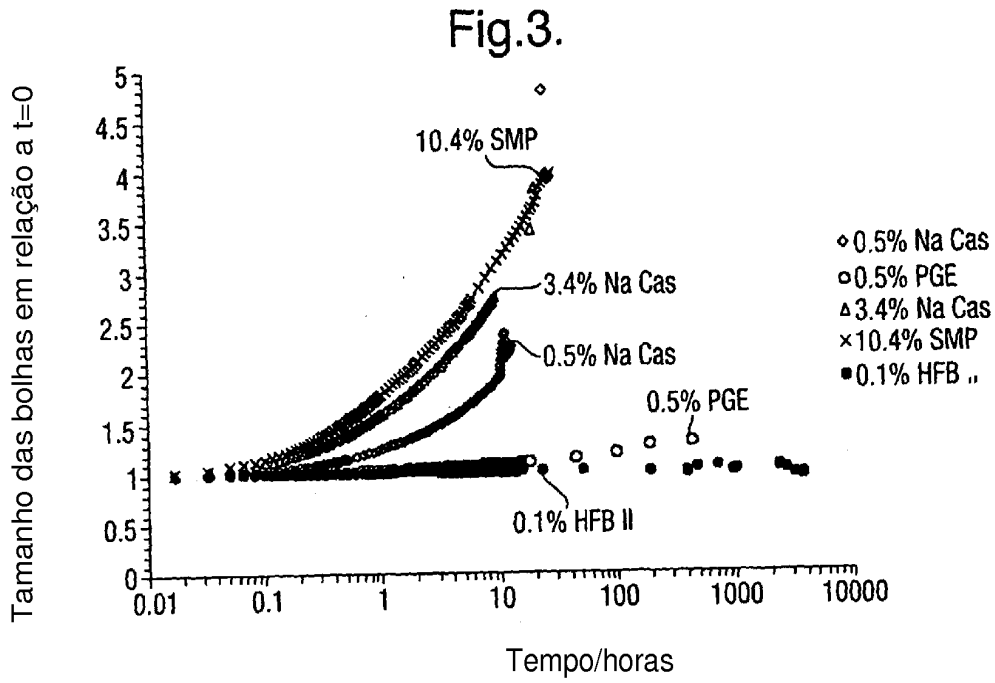


Fig.2.





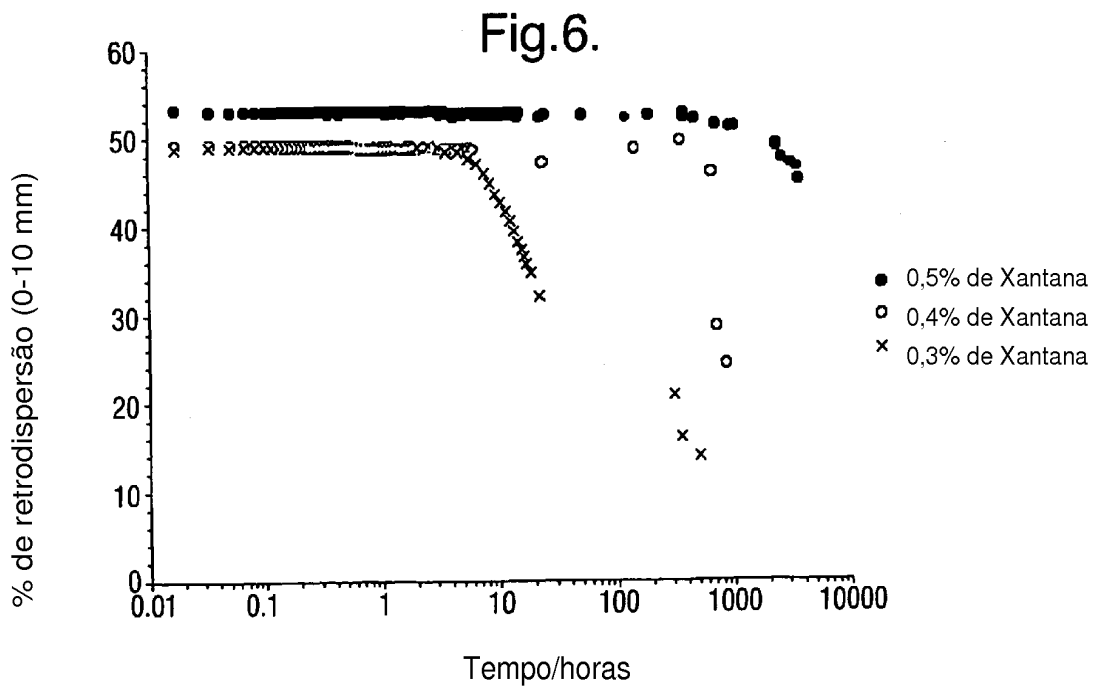
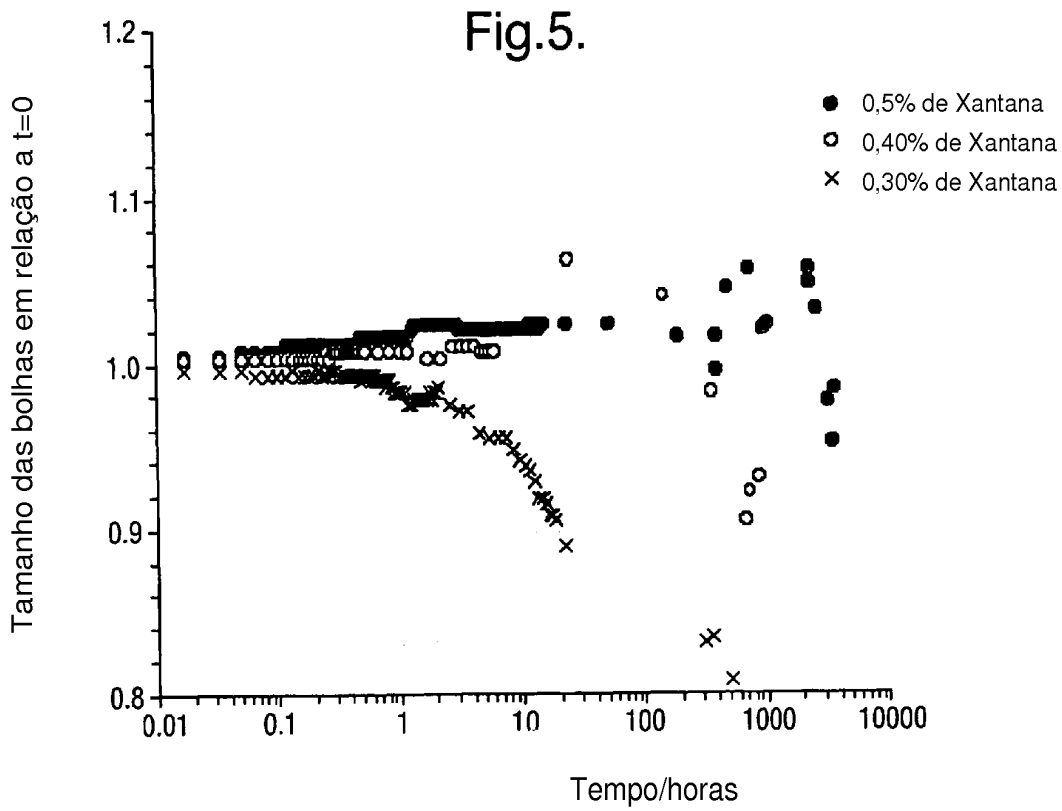
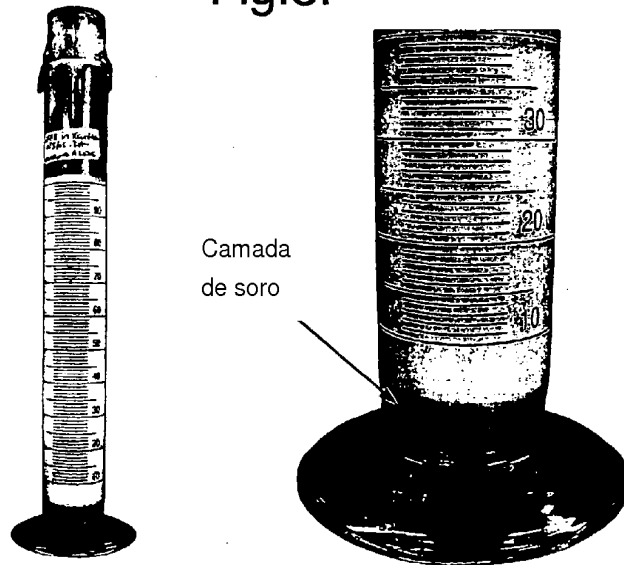
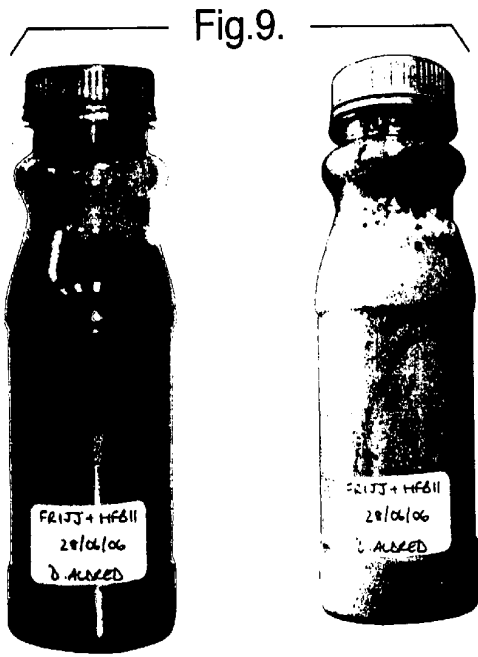


Fig.7.



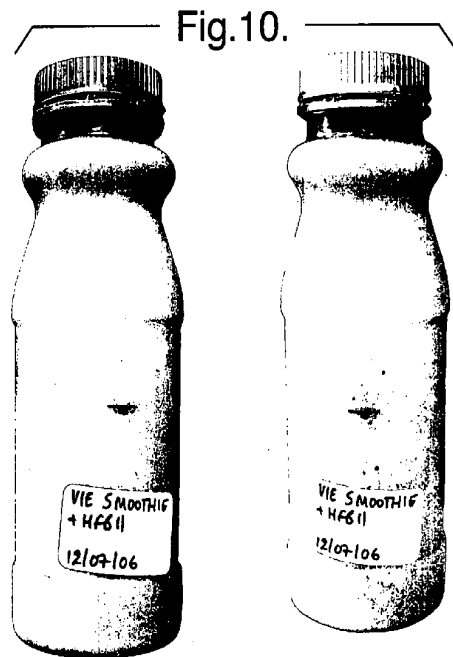
Fig.8.





Tempo = 0 dias

Tempo = 3 semanas



Tempo = 0 dias

Tempo=3 semanas

RESUMO

"PRODUTOS AERADOS COM TEOR REDUZIDO DE CREME"

É proporcionada uma composição aerada capaz de fluir que compreende hidrofobina e um agente de tensão de escoamento, tendo a composição uma viscosidade da fase contínua, medida a uma velocidade de corte de 10 s^{-1} , de 0,01 a 2000 Pa.s, e um limite de elasticidade aparente da fase contínua de, pelo menos, 4 Pa.