



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Engenharia de Alimentos

**PROPRIEDADES MACRO- E MICROSCÓPICAS DE
GÉIS DE PROTEÍNAS DO LEITE E κ -CARRAGENA**

Katiuchia Pereira Takeuchi

Engenheira de Alimentos, 2000 (FEA-UNICAMP)

Mestre em Engenharia de Alimentos, 2003 (FEA/DEA - UNICAMP)

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Orientadora

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Campinas, Fevereiro de 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

T139p Takeuchi, Katiuchia Pereira
Propriedades macro- e microscópicas de géis de
proteínas do leite e κ -carragena / Katiuchia Pereira
Takeuchi. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Kappa-carragena. 2. Leite - Proteínas. 3.
Sacarose. 4. Gelificação. 5. Interação de
biopolímeros. I. Cunha, Rosiane Lopes da. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Título em inglês: Macro- and microscopic properties of milk proteins and
 κ -carrageenan gels

Palavras-chave em inglês (Keywords): Kappa-carrageenan, Milk – proteins, Sucrose,
Gelation, Biopolymer interactions

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Rosiane Lopes da Cunha

Ana Lúcia Gabas

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Divair Christ

Florencia Cecilia Menegalli

Luiz Antonio Viotto

Data de defesa: 27-02-2008

Programa de Pós-Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Orientadora – DEA/FEA – UNICAMP

Profa. Dra. Ana Lúcia Gabas

Membro - ZEA/FZEA – USP

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Membro - DEPAN/FEA – UNICAMP

Prof. Dr. Divair Christ

Membro – UNIOESTE/CCET - Cascavel – PR

Profa. Dr. Florencia Cecilia Menegalli

Membro - DEA/FEA – UNICAMP

Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto

Membro - DEA/FEA – UNICAMP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hideichi e Leonilde,

todo o meu amor, admiração e gratidão.

Aos meus irmãos, Hidekazu, Akikazu e Kelly, pelo carinho e

por me incentivarem a lutar e a superar os obstáculos.

Ao Elói, meu amor, minha felicidade...pelo seu carinho e

estímulo em todos os momentos!!!

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento é sempre um gesto de humildade e reconhecimento, por isso agradeço primeiramente a Deus, pela força divina, saúde, graça e sabedoria. Além de Sua infinita misericórdia, concedendo-me o milagre de ainda estar viva.

À Profa. Dra. Rosiane, pela orientação e ensinamentos... Aos estimados mestres e amigos da Universidade Estadual de Campinas, por todo conhecimento adquirido e troca de experiências que me permitiram crescer e iniciar o meu próprio caminho.

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por me acolher desde a graduação, e pela infra-estrutura para a realização desta.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) meus sinceros agradecimentos pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a execução da atual pesquisa.

À Arla Foods, pela gentil doação do isolado protéico de soro, indispensável para a realização desta.

Aos queridos professores da banca examinadora que contribuíram com valiosas sugestões e correções, aperfeiçoando este trabalho.

Ao Grupo de Pesquisas do Laboratório de Engenharia de Processos, pelo trabalho em equipe, discussões e sugestões que enriqueceram a minha formação.

Ao estimado Prof. Dr. Divair Christ, pela importante participação no meu crescimento pessoal e profissional!

Às queridas ex-alunas de Iniciação Científica, Carol e Monique, vocês nem imaginam o quanto foi bom trabalhar com vocês. Sucesso a vocês!

Aos funcionários da FEA, técnicos de laboratório, bibliotecários, secretários e a todos que cooperaram para a execução desta.

À Profa Maria Júlia Marques por permitir a utilização do microscópio confocal de varredura à laser e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Aos meus pais, irmãos e ao Elói, agradeço o apoio na realização deste trabalho, que por sua instância trouxera o aperfeiçoamento do aprendizado intelectual, mas por inúmeras vezes me privou de suas presenças e da devida atenção e companheirismo.

Aos amigos do cafezinho, momentos de descontração e inspiração!!!

Aos amigos e acadêmicos da Universidade Estadual de Maringá, que sempre me motivaram para a realização dessa obra.

E a todos aqueles com quem convivi, aprendi e recebi incentivos e motivações, pessoas que ainda conseguem cultivar a solidariedade e que diretamente ou indiretamente contribuíram ao longo da jornada.

Sou eternamente grata!!! Muito obrigada!!!

“O coração do homem traça seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos... Porque o Senhor dá sabedoria e da sua boca vem a inteligência e o entendimento”.

Provérbios 16:9 e 2:6

Deus seja louvado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxv
RESUMO GERAL	xxvii
ABSTRACT	xxxi
CAPÍTULO I - Introdução	3
1. Objetivos gerais e específicos	8
2. Organização dos capítulos da tese	10
CAPÍTULO II - Revisão Bibliográfica	15
1. Alimentos: sistemas multi-componentes.....	15
2. Polissacarídeos em alimentos	15
2.1. Carragena	16
3. Proteínas do leite.....	19
3.1. Caseínas e caseinatos.....	19
3.2. Proteínas do soro de leite	22
4. Interação entre as proteínas do leite	24
4.1. Gelificação ácida de micelas de caseínas ou caseinato de sódio.....	24
4.2. Parâmetros que afetam a gelificação ácida da caseína.....	26
4.3. Gelificação térmica de proteínas globulares do leite.....	28
5. Utilização de sacarose em sistemas biopoliméricos.....	31
6. Interações entre proteínas-polissacarídeos em alimentos.....	34
6.1. Forças de interação entre proteínas e polissacarídeos	37
6.2. Gelificação de misturas proteínas-polissacarídeos.....	38
6.3. Interações polissacarídeos-proteínas do leite.....	41
6.4. Efeito de açúcares em sistemas de proteínas e polissacarídeos.....	45
CAPÍTULO III - Propriedades mecânicas, sinerese e microestrutura de géis de caseinato de sódio induzidos pela acidificação com glucona-δ-lactona ..	49
1. Introdução.....	50
2. Material e Métodos	54
2.1. Material	54
2.2. Preparo das soluções de caseinato de sódio e géis	54
2.3. Propriedades mecânicas.....	56
2.4. Determinação da solubilidade protéica dos géis.....	57
2.5. Avaliação da microestrutura dos géis	58
2.6. Sinerese.....	59
2.7. Análise estatística	60
3. Resultados e discussão.....	61
3.1. Cinéticas de gelificação	61
3.2. Propriedades dos géis no estado estacionário de pH: solubilidade protéica, microestrutura e sinerese.....	76
4. Conclusão.....	87

CAPÍTULO IV - Influência das proteínas do leite e sacarose na gelificação da κ -carragena 91

1. Introdução.....	92
2. Material e Métodos	95
2.1. Material.....	95
2.2. Métodos	96
2.2.1. Preparo das formulações	96
A) Preparo da solução de caseinato de sódio (CS)	96
B) Preparo da solução do isolado protéico de soro (IPS)	96
C) Preparo dos sistemas puros e mistos.....	97
2.2.2. Análises reológicas em cisalhamento dinâmico.....	100
A) Processo de desnaturação e formação de estrutura de isolado protéico de soro	100
B) Processo de gelificação: varredura de temperatura	101
C) Estabilização da rede do gel: varredura isotérmica a 5°C	102
D) Espectro mecânico: varredura de frequência	103
2.3. Análise estatística	103
3. Resultados e discussão.....	104
3.1. Influência da concentração da κ -carragena e adição de sacarose ou proteínas do leite no processo de gelificação	104
3.1.1. Efeito da concentração da κ -carragena no processo de gelificação.....	104
3.1.2. Efeito da adição de sacarose no processo de gelificação da κ -carragena ..	110
3.1.3. Efeito da adição de isolado protéico de soro no processo de gelificação da κ -carragena.....	119
A) Efeito da concentração de κ -carragena no processo de formação de estrutura de soluções de IPS	119
B) Efeito da adição de isolado protéico de soro no processo de gelificação da κ -carragena.....	124
3.1.4. Efeito da adição de caseinato de sódio no processo de gelificação da κ -carragena.....	133
3.1.5. Discussão sobre o efeito da adição de sacarose ou proteínas do leite no processo de gelificação da κ -carragena	142
3.2. Varredura isotérmica de géis puros de κ -carragena e mistos: adição de sacarose ou proteínas	144
3.2.1. Estabilidade de géis puros de κ -carragena.....	145
3.2.2. Estabilidade de géis de κ -carragena adicionados de sacarose	147
3.2.3. Estabilidade de géis mistos de κ -carragena e isolado protéico de soro	149
3.2.4. Estabilidade de géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio.....	153
3.2.5. Comportamento cinético dos géis mistos	157
3.2.6. Espectro mecânico	160
4. Conclusão.....	163

CAPÍTULO V - Propriedades mecânicas e microestrutura de géis mistos de caseinato de sódio/proteínas do soro de leite/sacarose e κ-carragena.....	167
1. Introdução.....	168
2. Material e Métodos	170
2.1. Material	170
2.2. Métodos de preparação das soluções	170
2.3. Propriedades mecânicas dos géis	170
2.4. Microscopia confocal de varredura a laser	172
3. Resultados e Discussão	173
3.1. Propriedades mecânicas dos géis	173
3.1.1. Géis de κ -carragena adicionados de sacarose.....	173
3.1.2. Géis de κ -carragena e isolado protéico de soro.	179
3.1.3. Géis de caseinato de sódio e κ -carragena.....	184
3.2. Microestrutura dos géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio ou isolado protéico de soro.....	190
3.2.1. Géis mistos de κ -carragena e isolado protéico de soro	191
3.2.2. Microestrutura de géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio	195
4. Conclusão.....	202
CAPÍTULO VI - Conclusões Finais.....	207
Referências Bibliográficas	211
Anexo	229
Súmula curricular referente ao período de Doutorado (2003 a 2007).....	229

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Estrutura do dissacarídeo cuja repetição forma a molécula de carragena (KNUTSEN et al., 1994; LAHAYE, 2001). 17
- Figura 2.2.** Ilustração esquemática da estrutura da micela de caseína composta por submicelas revestidas pelas porções C-terminal hidrofílica de κ -caseína (GOFF, 1999; WALSTRA, 1999). 21
- Figura 2.3.** Distribuição das moléculas de co-soluto nas proximidades da superfície de uma proteína (TIMASHEFF, 1993). 32
- Figura 2.4.** Principais tipos de interação entre proteínas e polissacarídeos em sistemas mistos (YE, 2007). 35
- Figura 3.1.** Variação do pH das soluções de caseinato de sódio (CS) a 2 e 6% (p/p) acidificados com GDL. As amostras foram acidificadas nas temperaturas de incubação (T) de 4 (\square), 10 (\triangle), 25 (\circ) e 40°C (\diamond). Os símbolos amarelos e azuis representam soluções com 2% e 6% (p/p) de caseinato de sódio, respectivamente. No detalhe da figura, pode-se observar o início da queda de pH até 2000 min para melhor visualização das diferentes taxas de acidificação. 63
- Figura 3.2.** Formação da rede do gel durante acidificação das soluções de caseinato de sódio (CS) com GDL nas concentrações de (A) 2, (B) 4 e (C) 6% (p/p). As amostras foram acidificadas nas temperaturas de incubação (T) de 4 (\square), 10 (\triangle), 25 (\circ) e 40°C (\diamond). 67
- Figura 3.3.** Efeito do pH na tensão na ruptura dos géis de caseinato de sódio acidificados com GDL nas temperaturas de incubação de 4 (\square), 10 (\triangle), 25 (\circ) e 40°C (\diamond). As concentrações de caseinato são (A) 2, (B) 4 e (C) 6% (p/p). 71
- Figura 3.4.** Efeito do tempo de acidificação nos valores de deformação na ruptura (ϵ_{rupt}) de géis de caseinato de sódio acidificados com GDL em temperaturas de incubação de 4 (\square), 10 (\triangle), 25 (\circ) e 40°C (\diamond). Os símbolos abertos e fechados são concentrações de caseinato de sódio de 2% e 6% (p/p), respectivamente. 75
- Figura 3.5.** Solubilidade protéica de géis acidificados contendo 6% (p/p) de caseinato de sódio estocados em diferentes temperaturas. Os géis foram dispersos em diferentes tampões: tampão TRIS (\blacksquare) e uréia (\blacksquare). Letras maiúsculas: diferenças ($p < 0,05$) entre tampão TRIS e uréia e letras minúsculas: diferenças ($p < 0,05$) entre temperaturas de incubação para o mesmo tampão. 77
- Figura 3.6.** Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de géis acidificados de caseinato de sódio (6% p/p) formados em temperaturas de incubação de (A) 4, (B) 10, (C) 25 e (D) 40°C. O aumento foi de 2.000 X e barra de escala = 10 μ m para todas as micrografias. 79

Figura 3.7. Influência das temperaturas de incubação (T: 4, 10, 25 e 40°C) e da concentração de caseinato de sódio (CS: 2, 4 e 6% (p/p)) na sinerese dos géis. Letras maiúsculas: diferenças (p<0,05) entre concentrações de caseinato de sódio nas mesmas temperaturas de incubação e letras minúsculas: diferenças (p<0,05) entre temperaturas de incubação na mesma concentração de caseinato de sódio. 83

Figura 3.8. Relação entre a tensão na ruptura (σ_{ss}) e a sinerese de géis de caseinato de sódio acidificados com GDL no estado estacionário de pH. As temperaturas de incubação são 4 (□), 10 (△), 25 (○) e 40°C (◇) e as concentrações de caseinato de sódio são representadas pelas cores: branco, cinza e preto, representando 2, 4 e 6% (p/p), respectivamente..... 85

Figura 4.1. Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação da κ -carragena nas concentrações de (A) 0,3, (B) 0,5 e (C) 0,8% p/p induzida por resfriamento em uma taxa de 1°C/min. Nas figuras pode-se observar duas inclinações, identificadas por (1) e (2) correspondendo à primeira e segunda transição, respectivamente..... 107

Figura 4.2. Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3; (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) induzida por resfriamento e adicionados de sacarose (SC) em concentração de 5, 15 e 30% (p/p)..... 111

Figura 4.3. Efeito da concentração de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e sacarose - SC (5 a 30% p/p) no comportamento da temperatura de início do processo de gelificação (T_s). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo (p<0,05). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de sacarose..... 115

Figura 4.4. Avaliação do efeito das concentrações de carragena (0,3 a 0,8% p/p) e sacarose (5 a 30% p/p) na temperatura de início de desenvolvimento de estrutura (T_s). 117

Figura 4.5. Comportamento da temperatura de início de formação de estrutura (T_s) de soluções de isolado protéico de soro a 10% (p/p) puro ou com adição de 0,3 a 0,8% (p/p) de carragena (CR). Letras diferentes indicam temperaturas estatisticamente diferentes em relação à variação da concentração de carragena (p<0,05)..... 121

Figura 4.6. Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3; (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) induzida por resfriamento e adicionados de isolado protéico de soro (IPS) em concentração de 0,5; 3; 5 e 7% (p/p). 125

- Figura 4.7.** Efeito da concentração de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e isolado protéico de soro - IPS (0,5 a 7% p/p) no comportamento da temperatura de início do processo de gelificação (T_s). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de isolado protéico de soro. 129
- Figura 4.8.** Avaliação do efeito das concentrações de carragena (0,3 a 0,8% p/p) e isolado protéico do soro (0,5 a 7% p/p) na temperatura de início de desenvolvimento de estrutura (T_s)..... 131
- Figura 4.9.** Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3; (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) induzida por resfriamento e adicionados de caseinato de sódio (CS) em concentração de 2, 5 e 8% (p/p). 135
- Figura 4.10.** Efeito da concentração de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e caseinato de sódio - CS (2 a 8% p/p) no comportamento da temperatura de início do processo de gelificação (T_s). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de caseinato de sódio. 139
- Figura 4.11.** Comportamento do módulo elástico (G') de géis puros de κ -carragena (0,3, 0,5 e 0,8% p/p) durante a varredura isotérmica a 5°C, sob cisalhamento oscilatório. 145
- Figura 4.12.** Comportamento do módulo elástico (G') durante a varredura isotérmica a 5°C, sob cisalhamento oscilatório de géis de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3 e (B) 0,5% (p/p) e adicionados de sacarose (SC) em concentração de 5, 15 e 30% p/p)..... 147
- Figura 4.13.** Comportamento do módulo elástico (G') durante a varredura isotérmica a 5°C, sob cisalhamento oscilatório de géis de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3 e (B) 0,5% (p/p) e adicionados de isolado protéico de soro (IPS) em concentração de 0,5, 3 e 5% (p/p). 151
- Figura 4.14.** Comportamento do módulo elástico (G') durante a varredura isotérmica a 5°C, sob cisalhamento oscilatório de géis de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3, (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) e adicionados de caseinato de sódio (CS) em concentração de 2, 5 e 8% (p/p)..... 155
- Figura 4.15.** Espectros mecânicos dos géis mistos contendo: (A) 0,3 e (B) 0,5% de κ -carragena e caseinato de sódio (5 e 8% p/p) e (C) géis contendo 0,8% de κ -carragena, puro ou com 2 e 8% de caseinato de sódio. 162

Figura 5.1. (A) Tensão, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade de géis puros de κ -carragena - CR (0,5 e 0,8 % p/p) e contendo sacarose - SC (5 a 30% p/p). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de sacarose. 175

Figura 5.2. (A) Tensão, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade de géis puros de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8 % p/p) e contendo isolado protéico de soro - IPS (0,5 a 7% p/p). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de isolado protéico de soro. NG = gel não auto-sustentável..... 181

Figura 5.3. (A) Tensão, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade de géis puros de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8 % p/p) e géis mistos contendo caseinato de sódio - CS (2 a 8% p/p). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de caseinato de sódio. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. NG = gel não auto-sustentável. 185

Figura 5.4. Micrografias obtidas a partir de microscopia confocal de varredura a laser (40 X) para os géis mistos de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e isolado protéico de soro - IPS (3 e 7% p/p). A barra indica uma dimensão de 50 μm 193

Figura 5.5. Micrografias obtidas a partir de microscopia confocal de varredura (40 X) a laser para os géis mistos de κ -carragena (CR) em concentração de 0,3% (A e C) e 0,5% p/p (B e D) e caseinato de sódio (CS) em concentração de 2 (A), 5 (B) e 8% p/p (C e D). A barra indica uma dimensão de 50 μm 197

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1.** Parâmetros de ajuste da Equação 3 obtidos para as soluções de caseinato de sódio (CS) com GDL em diferentes temperaturas de incubação. 65
- Tabela 3.2.** Parâmetros de ajuste obtidos a partir da Equação 3 para o comportamento da tensão na ruptura de géis de caseinato de sódio (CS) durante acidificação com GDL em diferentes temperaturas de incubação (4, 10, 25 e 40°C)..... 68
- Tabela 3.3.** Valores de pH, tensão na ruptura e tempos de início e final do processo de reorganização da rede do gel de caseinato de sódio induzidos por GDL (2 a 6% (p/p)) formados em diferentes temperaturas de incubação (4, 10, 25 e 40°C). Valores de $|\Delta\text{pH}|$ indicam a distância do pH no tempo final da reorganização em relação ao pI (4,6) ($|\Delta\text{pH}| = |\text{pH}_{\text{final}} - \text{pI}|$). 73
- Tabela 4.1.** Composição média dos ingredientes (% p/p) usados no preparo dos sistemas-modelo. 96
- Tabela 4.2.** Faixas de concentração dos componentes dos sistemas-modelo. 98
- Tabela 4.3.** Nomenclatura dos sistemas-modelo avaliados neste estudo com a especificação das concentrações de cada componente em % (p/p)..... 99
- Tabela 4.4.** Valores das temperaturas de início de desenvolvimento de estrutura (T_s) nas duas etapas da formação dos géis de κ -carragena (0,3 a 0,8% p/p)..... 109
- Tabela 4.5.** Parâmetros de ajuste da equação 2 aos dados de G' (Pa) em função do tempo. A diferença entre os módulos elásticos no equilíbrio (G_0) e inicial (G'_{inicial}) está representada por $\Delta G = G_0 - G'_{\text{inicial}}$. A observação refere-se ao comportamento reológico após o resfriamento. 158

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

Propriedades macro- e microscópicas de géis de proteínas do leite e κ -carragena

RESUMO GERAL

Tese de Doutorado

Katiuchia Pereira Takeuchi

A avaliação do processo de gelificação ácida de caseinato de sódio (CS) induzida por glucona- δ -lactona (GDL) foi realizada em diferentes taxas e com ampla faixa de concentração de proteína (2-6% p/p). A cinética de acidificação e gelificação foi avaliada desde o pH 6,7 até o ponto isoelétrico das caseínas através da medida de pH e de propriedades mecânicas obtidas em compressão uniaxial (tensão e deformação na ruptura). A formação da rede do gel foi mais influenciada pelas interações eletrostáticas do que pelas diferentes taxas de acidificação, principalmente em pH próximo ao pI das caseínas. Além disso, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio também estiveram envolvidas na estabilização da estrutura da rede, promovendo géis mais fortes. Também foi avaliado o processo de gelificação de proteínas do leite em pH 6,7 em sistemas contendo carragena. Neste caso, a κ -carragena foi adicionada em concentração de 0,3 a 0,8% (p/p) em misturas contendo caseinato de sódio (2 a 8% p/p), isolado protéico de soro (0,5 a 7% p/p) ou sacarose (5 a 30% p/p). Estes sistemas foram estudados a partir de ensaios reológicos em cisalhamento oscilatório, propriedades mecânicas e microestrutura. A temperatura de início da gelificação ou do desenvolvimento de estrutura (T_s) aumentou com a concentração de carragena em sistemas puros, enquanto que a presença de sacarose ou isolado protéico de soro promoveu um aumento da T_s e a adição de caseinato de sódio

não modificou esta temperatura, em relação aos géis puros. Após a formação do gel, um aumento da concentração de carragena levou a géis mais elásticos, rígidos, deformáveis e firmes, sendo que a adição de sacarose exerceu pouco efeito nas propriedades reológicas destes sistemas. A adição de isolado protéico de soro enfraqueceu a rede do gel em baixas concentrações (até 3%), mas houve formação de uma rede mista em maiores concentrações, sem demonstração de sinergismo entre os biopolímeros. A mistura de carragena e caseinato de sódio mostrou sinergia até 5% (p/p) desta proteína e para maiores concentrações, ocorreu o enfraquecimento da rede, diminuição da rigidez e firmeza do gel, provavelmente relacionada à micro-separação de fases, observada por microscopia confocal. Os espectros mecânicos mostraram que a maioria destes sistemas mistos apresentou comportamento de gel fraco, devido ao efeito simultâneo das interações físicas e incompatibilidade termodinâmica. No entanto, géis fortes foram observados na maior e menor concentração de carragena e caseinato de sódio, respectivamente, indicando a importância da interação eletrostática entre estes dois biopolímeros. O aumento da concentração de carragena e de proteínas promoveu um aumento da heterogeneidade da microestrutura do gel e a intensidade de interações repulsivas entre os biopolímeros e a formação da rede do gel, dominado pela carragena, afetou de maneira complexa as propriedades físicas destes sistemas.

Palavras-chaves: κ -carragena, proteínas do leite, sacarose, gelificação, interação de biopolímeros.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

**Macro- and microscopic properties of milk
proteins and κ -carrageenan gels**

ABSTRACT

Doctor`s Thesis

Evaluation of acid-induced sodium caseinate (CS) gelation promoted by glucono- δ -lactone (GDL) was performed at different acidification rates with several protein concentrations (2-6% w/w). The kinetics of acidification and gelation were followed from pH 6.7 to the isoelectric point of casein by evaluation of the pH and mechanical properties using uniaxial compression measurements (stress and strain at rupture). Gel network formation was more influenced by electrostatic interactions than different acidification rates, showing the contribution of rearrangements of bonds to strengthening the network, mainly at steady-state pH close to pI of caseins. Besides the hydrophobic interactions and hydrogen bonds were also important forces involved in structure stabilization, leading to stronger gels. Moreover, evaluation of gelation process of milk proteins at pH 6.7 in systems containing κ -carrageenan. In this study, the κ -carrageenan was added at concentration from 0.3 to 0.8% (w/w) into mixtures containing sodium caseinate (2 a 8% w/w), whey protein isolate (0.5 a 7% w/w) or sucrose (5 a 30% w/w). This systems was analysed using rheological measurements under oscillatory shear, mechanical properties and microstructure. The temperature at which structure development began or initial of gelation (T_s) augmented with increasing carrageenan concentration for pure systems, but sucrose or whey protein isolate addition promoted an increase of T_s and sodium caseinate did not affect this temperature, in relation to pure gel. After gel formation, increasing carrageenan

concentration promoted more elastic, stronger, deformable and firmer, as well as sucrose addition showed a little effect to decrease elastic character of gel. Whey protein addition weakened gel network at lower concentrations (up to 3% w/w), but at higher concentration was observed a mixed gel network entanglement of carrageenan and whey protein, without synergism between these biopolymers. Mixed gels of carrageenan and sodium caseinate showed synergism up to 5% (w/w) of this protein and increasing concentration led to weaken the gel network, decreasing the rigidity and the firmness of gel, probably related to micro-phase separation, observed by confocal microscopy. Mechanical spectra showed that most of mixed systems presented weak gel behaviour, due to simultaneous effect of physical interactions and thermodynamic interactions. However, stronger gels were formed at higher and lower concentration of carrageenan and sodium caseinate, respectively, which indicate the relevance of electrostatic interactions between these biopolymers. Increasing carrageenan and proteins concentrations led to greater microstructure heterogeneity and increased repulsive interactions between biopolymers and thus gel formation, dominated by carrageenan, affected in a complex way the physical properties of these systems.

Key words: κ -carrageenan, milk proteins, sucrose, gelation, biopolymers interactions.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Introdução

O leite é um dos principais produtos agropecuários da atividade econômica no mundo. Além da sua importância econômica, expressa através de geração de empregos e renda, este produto ainda desempenha um papel considerável na alimentação humana.

No ano de 2006, foram produzidos 550 milhões de toneladas de leite no mundo, sendo o Brasil, o sexto maior produtor, responsável por 4,6% do total mundial (EMBRAPA - GADO DE LEITE, 2007). No Brasil, o setor ocupa a sexta colocação quando se avalia o valor bruto da produção do setor primário, à frente do café, arroz, laranja, feijão e suínos. A cada R\$ 1,00 de aumento da produção da cadeia agroindustrial do leite, há um crescimento de R\$ 4,98 do PIB (MARTINS & GUILHOTO, 2001). É também responsável por gerar 3,6 milhões de empregos apenas no segmento de produção (CNA, 2003).

A indústria de laticínios é de grande importância na economia brasileira, ocupando, o primeiro posto no ranking dos maiores geradores de receita da indústria de alimentos (ABIA, 2007). A indústria de laticínios, principalmente a de queijos, produz o soro de leite, do qual se obtém o concentrado e o isolado protéico de soro, que em um passado recente foi considerado um subproduto de difícil descarte devido a grande alteração que causava na taxa de oxigênio necessária para a sua decomposição. Atualmente, porém, os produtos derivados de proteínas do soro são utilizados como ingredientes funcionais na formulação de

novos produtos, principalmente por possuir um excelente valor nutricional e por sua capacidade de gelificação.

Neste contexto, observa-se uma crescente demanda por produtos alimentícios com propriedades especiais, tanto no quesito nutricional quanto em relação a funcionalidade, em particular a textura. O estudo das interações entre os componentes dos alimentos é importante, pois facilita o desenvolvimento de novos produtos, de forma a atender às necessidades dos consumidores. No entanto, a alteração da formulação de produtos alimentícios pode levar a modificações das características sensoriais, de textura e estabilidade, devido à ausência de determinados componentes. Os alimentos possuem composição complexa, o que dificulta a interpretação das interações que ocorrem entre seus componentes. Este fato fez com que houvesse um aumento no uso de sistemas-modelo para a interpretação das propriedades de textura, estrutura e estabilidade. O estudo de sistemas-modelo tem grande importância para elucidar as alterações micro e macroscópicas pelas quais os ingredientes passam quando são alteradas a composição do sistema e/ou as condições de processo (pH, temperatura, força iônica, co-solutos, etc.) (SCHORSCH et al., 1999; SEDLMEYER et al., 2003; CHRIST et al., 2005; SABADINI et al., 2006; SEDLMEYER & KULOZIK, 2006; VERBEKEN et al., 2006; ARLTOFT et al., 2007; van den BERG et al., 2007).

O leite pode ser considerado uma emulsão coloidal de partículas de caseína, associadas em uma forma micelar, além da presença das proteínas globulares do soro dispersas na fase contínua. Assim, estudos realizados com sistemas-modelo lácteos contendo caseína micelar ou caseinato de sódio,

juntamente com isolado protéico de soro, podem permitir o entendimento do comportamento dessas proteínas frente a outros componentes e diferentes condições de processo. O caseinato de sódio vem sendo muito utilizado em produtos lácteos análogos, como por exemplo, queijos e o isolado protéico tem apresentado crescente aplicação como ingrediente na formulação de diversos produtos alimentícios, além das específicas para atletas.

O tratamento térmico, importante para a segurança alimentar e desenvolvimento de textura em produtos lácteos, promove significativas mudanças nas proteínas do leite, como desnaturação das proteínas do soro, favorecendo sua interação entre si e com os demais componentes do sistema, afetando as características do produto final (TZIBOULA & HORNE, 1999a; NEISER et al., 2000; OULD ELEYA & TURGEON, 2000a; OULD ELEYA & TURGEON, 2000b;).

Produtos lácteos acidificados apresentam boa aceitação por parte de consumidores e o processo de acidificação é uma etapa muito importante para a obtenção das propriedades sensoriais desejadas, que estão associados à aparência visual do produto, propriedades reológicas e microestrutura. Além disso, o grau de acidificação do produto influencia as interações entre as proteínas e destas com os demais componentes presentes. A acidificação pode ser realizada através de culturas bacterianas (fermentação láctica) ou pela adição de gluconato- δ -lactona (GDL), que hidrolisa a ácido glucônico resultando em uma diminuição do pH. O uso de GDL pode evitar algumas das dificuldades associadas com bactérias lácticas (*starter*), incluindo atividade variável e alteração no tipo de cultura usada. Os géis feitos com estes dois tipos de precursores de acidificação diferem em

suas propriedades reológicas (LUCEY et al., 1998), em parte em função da taxa de acidificação. A acidificação por GDL pode ser executada em diferentes taxas, que pode levar a diferentes valores de pHs finais, dependendo da temperatura, presença de outros componentes (proteínas, açúcares, sais) ou concentração de precursor de ácido.

Em géis induzidos por GDL, o ponto isoelétrico (pH 4,6) pode ser alcançado mais rapidamente e permanece estável, permitindo assim um maior tempo de rearranjo e reorganização perto deste ponto. Este fenômeno contribui para a contínua ligação e rearranjo de partículas de caseína.

Os polissacarídeos têm apresentado crescente aplicação na indústria de alimentos por suas propriedades funcionais como espessante, estabilizante e capacidade de ligar água. Os polissacarídeos podem ser neutros ou carregados eletricamente, lineares ou ramificados e gelificantes ou espessantes. A carragena, que é um polissacarídeo linear aniônico, possui a peculiar característica de apresentar alta reatividade com as proteínas do leite favorecendo a formação de géis. A formação do gel é dependente da temperatura e ocorre sob resfriamento, através da transição conformacional da molécula de carragena do estado enovelado (desordenado) para o estado helicoidal (ordenado), que ocorre em determinada temperatura, dependendo da presença de íons específicos e demais moléculas carregadas (DOYLE et al., 2000; YUGUCHI et al., 2002).

As proteínas do leite podem interagir com os diversos componentes de alimentos, porém são as interações biopoliméricas (proteína-proteína e proteína-polissacarídeo) que levam a uma maior faixa de características de textura-

estrutura (STANDING et al., 1993; VERHEUL & ROEFS, 1998; HEMAR et al., 2002; OLSSON et al., 2002; WALKENSTRÖM et al., 2003; ARLTOFT et al., 2007).

As interações entre os polissacarídeos e as proteínas do leite podem ser controladas e manipuladas em função da composição do sistema (VERHEUL & ROEFS, 1998; SCHORSCH et al., 1999; DEPYPERE et al., 2003; SEDLMEYER et al., 2003; THAIUDOM & GOFF, 2003) ou das condições de processamento, como o tratamento térmico (SINGH et al., 1996; CAPRON et al., 1999; BAEZA et al., 2002; SABADINI, et al., 2006; ALEXANDER & DALGLEISH, 2007; ARLTOFT et al., 2007; GUSTAW & MLEKO, 2007).

Embora as micelas de caseína e a κ -carragena possuam cargas líquidas iguais em pH 6,7, as interações entre estes biopolímeros provavelmente ocorre via interações eletrostáticas (SNOEREN et al., 1975) e a formação de uma rede de gel polissacarídeo/proteína foi demonstrada por microscopia eletrônica (SPAGNUOLO et al., 2005; MARTIN et al., 2006).

A sacarose tem ampla aplicação na alimentação humana. Este dissacarídeo solúvel é encontrado em uma grande variedade de produtos alimentícios, promovendo sabor doce. Este açúcar modifica as propriedades coligativas do solvente, podendo interferir na interação entre os componentes de um alimento e até modificar as propriedades reológicas (KULMYRZAEV et al., 2000; MORA-GUTIERREZ & FARRELL, 2000; BELYAKOVA et al., 2003; TAKEUCHI, 2003; RIBEIRO et al., 2004; CHRIST et al., 2005; SABADINI et al., 2006). Além disso, a adição de dissacarídeos em sistemas alimentícios altera o comportamento de agregação das proteínas, promovido pela alteração das

propriedades termodinâmicas do sistema, influenciando nas interações entre os biopolímeros do sistema e a relação destes com a água (CHRIST et al., 2005).

Apesar das interações que ocorrem entre os polissacarídeos e proteínas serem importantes ferramentas para a otimização do desenvolvimento de novos produtos, os fenômenos que governam estes processos ainda não são bem compreendidos, visto que são influenciados simultaneamente por diversos fatores. Assim, esse trabalho buscou avaliar as interações entre as proteínas do leite e a κ -carragena e o efeito da adição da sacarose na gelificação desse polissacarídeo.

1. Objetivos gerais e específicos

O objetivo geral deste trabalho consistiu em estudar as interações entre biopolímeros utilizando dois processos de gelificação freqüentemente encontrados em alimentos, a gelificação ácida de proteínas e a promovida pelo polissacarídeo em sistemas mistos.

Os objetivos específicos foram avaliar:

1) A gelificação ácida de caseinato de sódio (2 – 6% p/p) induzida por glucona- δ -lactona na faixa de temperatura de 4 a 40°C, levando a diferentes taxas de acidificação. As cinéticas de acidificação e gelificação foram avaliadas desde o pH 6,7 até o pH alcançar o estado estacionário, cujo valor foi próximo ao pI da caseína (4,6). As propriedades mecânicas, solubilidade protéica, microestrutura e de sinerese do gel no estado estacionário de pH foram avaliadas, com o intuito de verificar o efeito da temperatura sobre as interações proteína-proteína.

2) As interações entre a κ -carragena e sacarose ou proteínas do leite (caseinato de sódio ou isolado protéico de soro) em pH neutro e ampla faixa de concentrações, durante o processo de gelificação e após a formação e estabilização do gel. O principal agente gelificante foi a carragena e os demais componentes do sistema foram utilizados buscando simular a formulação de sobremesas lácteas gelificadas. O processo de gelificação dos sistemas foi avaliado sob resfriamento através de análises reológicas sob cisalhamento oscilatório. A partir das varreduras de temperatura foram obtidas as temperaturas de início de desenvolvimento de estrutura, que está associada à transição conformacional da κ -carragena. A estabilidade da rede do gel logo após a sua formação foi verificada através de varreduras isotérmicas e os géis foram avaliados através de varreduras de frequência.

3) O comportamento da microestrutura e das propriedades mecânicas dos géis puros de κ -carragena e mistos, contendo proteínas do leite ou sacarose formados a 10°C. Foi avaliada a influência da concentração dos componentes nas características finais do produto, visto que o balanço de interações entre os componentes variaram de gelificação dominante da carragena à incompatibilidade termodinâmica entre os componentes.

2. Organização dos capítulos da tese

1) Introdução: traz uma visão geral sobre o assunto abordado no trabalho em relação à aplicação dos conhecimentos obtidos no desenvolvimento de produtos lácteos.

2) Revisão Bibliográfica: apresenta uma abordagem geral sobre os conhecimentos científicos relacionados ao entendimento dos processos de interação entre a κ -carragena e as proteínas do leite e sacarose, avaliados neste trabalho. Além disso traz informações necessárias para o entendimento das propriedades e comportamento dos componentes utilizados.

3) Propriedades mecânicas, sinerese e microestrutura de géis de caseinato de sódio induzidos pela acidificação com glucona- δ -lactona. Géis ácidos de caseinato de sódio (CS) formados em diferentes temperaturas de incubação (4, 10, 25 e 40°C) e com ampla faixa de concentração de proteína (2-6% p/p) foram induzidos pela gradual hidrólise de glucona- δ -lactona (GDL) a ácido glucônico promovendo diferentes taxas de acidificação. A cinética de acidificação e gelificação foi avaliada desde o pH 6,7 até o ponto isoelétrico da caseína através das propriedades mecânicas obtidas em compressão uniaxial (tensão e deformação na ruptura). Além disso, foram avaliadas a solubilidade protéica dos géis em diferentes tampões, a sinerese espontânea e a microestrutura por microscopia eletrônica de varredura.

4) *Influência das proteínas do leite e sacarose na gelificação da κ -carragena.* O efeito da adição de caseinato de sódio, isolado protéico de soro ou sacarose na temperatura de transição conformacional da κ -carragena e o comportamento de gelificação destas misturas foi avaliado através de ensaios reológicos a baixas deformações utilizando varreduras de temperatura em resfriamento de 40 a 5°C em uma taxa de resfriamento de 1°C/min, em condições de deformação dentro do intervalo linear das amostras. Após a gelificação, foi realizada uma varredura isotérmica a 5°C por 30 min, de forma a avaliar a estabilidade do gel formado. Após essa análise foi realizada a varredura de frequência de 0,01 a 10 Hz na temperatura de 5°C para avaliar as características do gel formado.

5) *Propriedades mecânicas e microestrutura de géis mistos de caseinato de sódio/proteínas do soro de leite/sacarose e κ -carragena.* O efeito da concentração de κ -carragena no processo de interação com as proteínas do leite (caseinato de sódio e isolado protéico de soro) ou sacarose foi avaliado através de propriedades mecânicas e microestruturais dos géis formados. Após a gelificação das amostras e estabilização a 10°C por 24 h, os sistemas formados foram avaliados através de testes de ruptura em compressão uniaxial e microscopia confocal de varredura à laser.

6) *Conclusão Final:* traz as principais discussões dos resultados obtidos no trabalho e a sua importância para a contribuição científica nessa linha de pesquisa.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão Bibliográfica

1. Alimentos: sistemas multi-componentes

Os produtos alimentícios são geralmente formulados pelo uso específico de um número limitado de ingredientes, principalmente representados pela água, sais minerais, vitaminas, açúcares, lipídeos, proteínas e polissacarídeos (KILARA, 1995). As interações resultantes da mistura e processamento de todos esses componentes são os principais responsáveis pelas propriedades estruturais e de textura dos alimentos (TOLSTOGUZOV, 1996). Em especial, as proteínas e polissacarídeos desempenham um papel chave na estruturação e estabilização de alimentos através das suas propriedades como agentes gelificantes e espessantes (TOLSTOGUZOV, 1991).

Devido ao fato da textura e estabilidade serem importantes critérios de qualidade de alimentos, os cientistas e as indústrias estão focados em identificar ingredientes e suas interações de modo a otimizar a qualidade, atratividade e formulação de novos produtos (SANCHEZ et al., 1997).

2. Polissacarídeos em alimentos

Os polissacarídeos podem ser neutros ou carregados eletricamente, lineares ou ramificados e gelificantes ou espessantes. Em especial, a carragena, que é um polissacarídeo aniônico, possui alta reatividade com as proteínas do leite favorecendo a formação de géis.

As propriedades funcionais dos hidrocolóides estão relacionadas aos mecanismos físico-químicos que regem o seu comportamento em meio aquoso, ou seja, são o resultado das interações macromolécula-água e macromolécula-macromolécula, e destas com os demais componentes do sistema. Todos esses mecanismos são dirigidos pelos parâmetros termodinâmicos do sistema (MANGIONE et al., 2003; DOUBLIER & CUVELIER, 2006). A força das interações entre o polissacarídeo e a água ocorre através de ligações de hidrogênio promovidas por meio de grupos hidrofílicos ao longo da cadeia macromolecular, sendo o volume hidrodinâmico e as propriedades espessantes relacionados a estas interações. Já a gelificação ocorre a partir da formação de zonas de junção e é resultado de um delicado equilíbrio entre as interações macromoleculares e polissacarídeo-água (YUGUCHI et al., 2002; DOUBLIER & CUVELIER, 2006).

2.1. Carragena

As carragenas são polissacarídeos lineares sulfatados, solúveis em água, extraídos de diferentes espécies de algas marinhas vermelhas da classe *Rhodophyceae*. A estrutura primária da κ -carragena consiste idealmente de unidades de D-galactose-4-sulfato, unidas em α -(1→3) e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em β (1→4), que se alternam na cadeia principal (Figura 2.1). No entanto, outros monossacarídeos, tais como a galactose, galactose-2-sulfato, galactose-6-sulfato, galactose-2,6-dissulfato podem estar presentes em menores quantidades na constituição da cadeia de carragena (BONGAERTS et al., 1999; SCHORSCH et al., 2000).

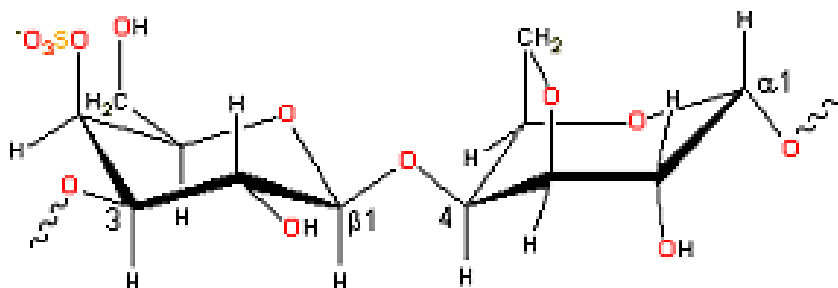


Figura 2.1. Estrutura do dissacarídeo cuja repetição forma a molécula de carragena (KNUTSEN et al., 1994; LAHAYE, 2001).

Uma das propriedades básicas da carragena é a sua habilidade em promover o espessamento (aumentar a viscosidade) ou gelificar soluções. O aquecimento de dispersões aquosas de κ -carragena em temperaturas acima de 60°C permite que o polissacarídeo se hidrate e adote a conformação enovelada. A gelificação ocorre sob resfriamento da dispersão a uma temperatura crítica e este processo tem sido reportado por possuir dois estágios. Inicialmente, ocorre a transição do estado enovelado para helicoidal, seguido pela agregação das hélices (MORRIS et al., 1980; MORRIS, 1998). O resfriamento em temperaturas menores que a de transição da conformação melhora a associação de hélices, formando longas e rígidas ligações (HERMANSSON, 1995).

O processo de gelificação parece ser termo-reversível apresentando ou não histerese entre o processo de formação do gel por resfriamento e a fusão do gel por aquecimento (MANGIONE et al., 2003). A temperatura, concentração de polímeros, força iônica e a natureza de outros componentes iônicos influenciam fortemente e modulam estes mecanismos de uma forma complexa (MORRIS et al., 1980; MEUNIER et al., 2000; MEUNIER et al., 2001).

3. Proteínas do leite

O leite é um dos alimentos mais nutritivos que existem, consistindo em uma emulsão óleo-água estabilizada por proteínas de alta digestibilidade, que fornecem todos os 10 aminoácidos essenciais. A composição média do leite é cerca de 85 a 87,5% de água; 3,5 a 4,2% de lipídios; 3,3 a 3,6% de proteínas; 4,4 a 5,2% de lactose; 0,7 a 0,9% de minerais e traços de enzimas e vitaminas (BEHMER, 1984).

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos: caseínas, proteínas do soro (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e outras, sendo 2,78% de caseína, 0,67% de proteínas do soro e 0,05% das frações restantes (SGARBIERI, 1996).

3.1. Caseínas e caseínatos

As caseínas são fosfoproteínas constituídas de quatro frações principais (α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína), que são proteínas conjugadas e possuem a maioria dos grupos fosfato esterificados nos resíduos de serina (ROEFS et al., 1990; WONG et al., 1996). As α_{s1} -caseínas apresentam estruturas pouco ordenadas e correspondem à fração que apresenta a maior carga iônica. As α_{s2} -caseínas são mais hidrofílicas devido à maior fosforilação e maior quantidade de resíduos catiônicos. As β -caseínas são as que apresentam maior hidrofobicidade, e diferentemente das outras caseínas, a auto-associação da β -caseína é dependente da temperatura. A κ -caseína é a fração que possui o mais baixo teor de fosfato, não precipita em baixos valores de pH, nem em presença de cálcio. As

κ -caseínas possuem uma região N-terminal hidrofóbica e a região C-terminal hidrofílica (BRIGNON et al., 1977).

A hidrofobicidade média das quatro frações de caseína indica a natureza das interações (hidrofóbicas ou eletrostáticas) que ocorrerão entre as moléculas. Elas são em ordem decrescente: β (5,56) > κ (5,37) > α_{s1} (4,89) > α_{s2} (4,64) kJ/mol de resíduo e estão baseadas na energia livre de transferência das cadeias laterais de aminoácido de um meio orgânico para um meio aquoso (BRIGNON et al., 1977), o que indica a natureza das interações que ocorrerão entre as moléculas de proteína.

A conformação das caseínas é similar a de proteínas globulares desnaturadas, com um elevado número de resíduos de prolina que causa uma curvatura particular na cadeia da proteína, inibindo a formação de estruturas secundárias ordenadas. Além disso, a ausência de estrutura terciária contribui para a estabilidade das caseínas à desnaturação térmica e à exposição dos resíduos hidrofóbicos, resultando em fortes reações de associação das caseínas (BRIGNON et al., 1977).

As diferentes frações de caseína agregam-se através de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, formando submicelas. Essas submicelas possuem a parte interna hidrofóbica que é coberta por uma camada hidrofílica formada, em grande parte, por κ -caseína que adquire uma estrutura flexível em água. As submicelas se associam por pontes de fosfato de cálcio constituindo as micelas, conforme representação esquemática mostrada na Figura 2.2 (GOFF, 1999; WALSTRA, 1999).

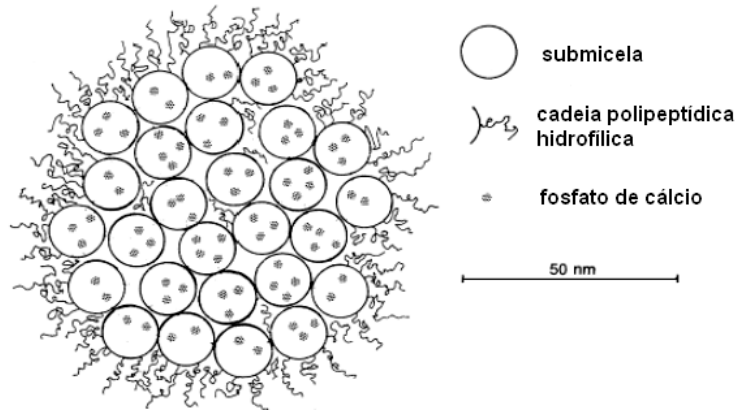


Figura 2.2. Ilustração esquemática da estrutura da micela de caseína composta por submicelas revestidas pelas porções C-terminal hidrofílica de κ -caseína (GOFF, 1999; WALSTRA, 1999).

A dissociação de micelas de caseína através da adição de ácidos, leva à formação de sais de caseinato. Os caseinatos são misturas de frações de caseínas (α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas) sem a presença do fosfato de cálcio coloidal (CCP) que estabiliza o complexo micelar de frações de caseínas. O caseinato de sódio é formado quando ocorre adição de ácido ao leite precipitando a caseína no ponto isoelétrico. A proteína lavada é então redissolvida, através da adição de hidróxido de sódio, de maneira que a neutralidade seja restabelecida. A alta proporção de cadeias de aminoácidos hidrofóbicos em toda a estrutura primária da caseína leva o caseinato de sódio a formar agregados (ou submicelas) em soluções aquosas, com a maior parte das regiões hidrofóbicas localizadas no interior de um denso núcleo com pouca água associada (FARREL et al., 1990).

A associação subsequente das submicelas de caseína para formar as grandes micelas não é possível devido à remoção da maior parte do cálcio da micela durante o processo de acidificação (OAKENFULL et al., 1999). Os

caseínatos possuem predominantemente espécies submicelares com uma pequena quantidade de frações supra-moleculares (CHU et al., 1995) e podem ser usados como sistemas-modelo de caseína.

3.2. Proteínas do soro de leite

O concentrado e o isolado protéico de soro são importantes ingredientes de alto valor nutricional para aplicação na indústria de alimentos, sendo que a capacidade de gelificação é uma das principais propriedades funcionais destas proteínas. As principais proteínas do soro de leite bovino são a β -lactoglobulina, que corresponde a aproximadamente 50% e a α -lactalbumina com 12% do total das proteínas do soro. Além destas, há ainda a presença de 5% de albumina sérica, 10% de imunoglobulinas e 23% são proteases-peptonas, proteínas menores e traços de caseína (BOTTOMLEY et al., 1990).

A α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina consistem em cadeias de aminoácidos dobradas em estruturas compactas tridimensionais, mantidas por ligações não-covalentes. Estas proteínas possuem estruturas lábeis, que podem ser desnaturadas por mudanças na temperatura e pH como consequência da fragilidade destas ligações não-covalentes (STEVENTON et al., 1991). A desnaturação quase sempre é seguida de agregação, que modifica o comportamento reológico dos sistemas lácteos, podendo inclusive levar à gelificação. Os géis protéicos podem ser formados por diferentes tipos de ligação; algumas covalentes e numerosas interações não-covalentes, tais como as de van

der Waals, ligações de hidrogênio e principalmente, as interações hidrofóbicas (STEVENTON et al., 1991).

A β -lactoglobulina é uma proteína globular cuja estrutura secundária possui duas ligações dissulfeto internas e um grupo tiol livre. Estas características possibilitam um intercâmbio entre as ligações dissulfeto durante mudanças conformacionais associadas com o tratamento térmico e alterações de pH. Acima de 30°C os dímeros da β -lactoglobulina dissociam-se em dois monômeros, enquanto que em temperaturas acima de 55°C há um progressivo desdobramento da estrutura globular, ocorrendo exposição de grupos cistina e cisteína e superfícies hidrofóbicas, permitindo a agregação (BOTTOMLEY et al., 1990).

A α -lactoalbumina é a segunda proteína do soro mais abundante. É uma proteína globular e possui uma estrutura ternária esférica estabilizada por ligações dissulfeto, além de uma estrutura secundária altamente ordenada, o que provavelmente dificulta as interações com outras moléculas. Ela apresenta uma conformação estável na faixa de pH entre 5,4 e 9,0 (BOTTOMLEY et al., 1990).

O ponto isoelétrico das proteínas do leite são: 5,2 para a β -lactoglobulina, de 4,2 a 4,5 para α -lactoalbumina, de 4,7 a 4,9 para albumina sérica bovina e entre 5,5 a 6,8 para imunoglobulina (MORR & HA, 1993; BRYANT & McCLEMENTS, 1998).

4. Interação entre as proteínas do leite

4.1. *Gelificação ácida de micelas de caseínas ou caseinato de sódio*

Um gel protéico é formado através da agregação espacial das moléculas de proteínas devido à contribuição de ligações covalentes e não covalentes para a rede. A relativa contribuição destes diferentes tipos de ligações e as propriedades intrínsecas das proteínas (hidrofobicidade, interações eletrostáticas, ligações dissulfeto, massa molar e composição de aminoácidos) dependem das condições em que é realizada a gelificação (concentração de proteínas, pH, temperatura, força iônica e tipo de íons, e pressão hidrostática) (PHILLIPS et al., 1994; SMITH, 1994; TOTOSAUS et al., 2002). Desta maneira, o tamanho, formato e o arranjo espacial dos agregados de proteínas resultantes, assim como sua resposta à deformação, pode variar enormemente, exercendo grande impacto no comportamento reológico, qualidade sensorial e capacidade de retenção de água dos géis (ALTING, 2003).

A gelificação ácida do leite é amplamente usada na indústria láctea como uma forma de obter produtos tais como iogurte ou para induzir a primeira etapa do processamento de queijo em combinação com a coagulação enzimática. Durante a acidificação do leite muitas propriedades físico-químicas das micelas, e provavelmente submicelas, passam por alterações incluindo o volume (TARODO de la FUENTE & ALAIS, 1974; SNOEREN et al., 1984), dissociação das frações de caseína (DALGLEISH & LAW, 1988; LAW & LEAVER, 1998) e uma gradativa redução do diâmetro hidrodinâmico (ROEFS et al., 1985; BANON & HARDY,

1992). O processo de acidificação induz a desmineralização das micelas de caseína (DALGLEISH & LAW, 1989), levando à solubilização do fosfato de cálcio coloidal, que é muito importante para a manutenção da integridade e estabilidade da micela de caseína (WALSTRA & JENNESS, 1984; HORNE, 1998; WALSTRA, 1999).

As micelas de caseína no seu estado natural, ou seja, sem ter passado por tratamento térmico e em pH 6,7 são consideradas partículas coloidais estáveis por possuírem uma camada superficial de κ -caseína, cuja porção glicomacropéptídica está direcionada para a fase soro formando uma camada negativamente carregada. Dessa forma, a micela de caseína é estabilizada por forças de repulsão eletrostática que impedem seu colapso e agregação (WALSTRA, 1990; de KRUIF & ROEFS, 1996; HOLT & HORNE, 1996; de KRUIF, 1997). O processo de acidificação induz uma redução na densidade de carga negativa, pois neutraliza os grupos carboxílicos e cadeias residuais dos aminoácidos da porção glicomacropéptídica. A neutralização resulta em uma diminuição da espessura e das forças de repulsão eletrostática, levando ao colapso da camada superficial (WALSTRA, 1990; BANON & HARDY, 1992; de KRUIF & ROEFS, 1996; HOLT & HORNE, 1996; de KRUIF, 1997) e agregação, que em concentração suficiente, pode formar um gel particulado (BREMER et al., 1989; VÉTIER et al., 1997).

4.2. Parâmetros que afetam a gelificação ácida da caseína

O efeito da temperatura na formação e propriedades finais de géis ácidos de caseinato de sódio está relacionado ao fato de que o aumento da energia cinética em mais altas temperaturas poderia ser importante para elevar a frequência e efetividade de colisões entre as partículas, promovendo sua agregação e levando à formação do gel (BANON & HARDY, 1992). Embora a temperatura afete a taxa das reações de agregação, somente a teoria de colisões não pode explicar as alterações na estabilidade das micelas de caseína devido às mudanças de temperatura em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico.

O efeito da temperatura na estabilidade à acidificação das micelas de caseína tem sido atribuída à dependência das interações hidrofóbicas e à dissociação de frações ou monômeros de caseínas (DALGLEISH & LAW, 1988; WALSTRA, 1990; de KRUIF & ROEFS, 1996; HOLT & HORNE, 1996; LAW & LEAVER, 1998). A redução da temperatura do leite abaixo de 20°C leva a uma migração das frações de caseína, principalmente a κ - e β -caseína, para a superfície da micela que são progressivamente solubilizadas para o soro. Este fenômeno é creditado à diminuição das interações hidrofóbicas com o abaixamento da temperatura, que pode influenciar na integridade da porção central das micelas, e provavelmente submicelas. De uma forma geral, a agregação de partículas de caseína com a acidificação pode ser considerada como resultado de dois principais fatores desestabilizantes: a eliminação da repulsão estérica inerente à camada superficial hidrofílica e negativamente carregada das micelas e a neutralização da repulsão eletrostática.

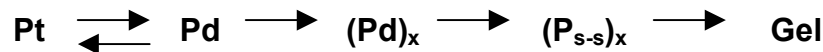
Muitos estudos sobre a formação de géis lácteos ácidos têm sido realizados com a acidificação com glucona- δ -lactona (GDL). A taxa de acidificação é diferente entre os géis induzidos pela acidificação por GDL e por culturas lácteas. O GDL é gradualmente dissociado a ácido glucônico, cuja taxa de reação depende basicamente da temperatura, podendo ser descrita por uma cinética de primeira ordem (de KRUIF, 1997). O pH final dos géis induzidos por GDL é função da quantidade inicialmente adicionada ao leite, enquanto que as bactérias lácticas podem continuar a produzir ácido até serem inibidas em decorrência da elevada acidez do meio (cerca de 4,0). Na prática, os géis lácteos induzidos por bactérias lácticas são resfriados quando a acidez desejada é alcançada, diminuindo a produção de ácido (LUCEY et al., 1998). As propriedades reológicas e físicas de géis induzidos por GDL diferem de géis formados por fermentação com bactérias lácticas particularmente em altas temperaturas de gelificação (LUCEY et al., 1998).

A taxa de acidificação durante a fermentação ou adição de ácido é controlada pelas propriedades tamponantes ácido-base das proteínas do leite (SINGH et al., 1997). O pH ótimo para a obtenção de géis mais fortes é próximo ao ponto isoelétrico das caseínas ($pI = 4,6$), porque há o favorecimento das ligações e rearranjos contínuos das partículas de caseína, apontando para uma agregação com predomínio de interações hidrofóbicas (BRAGA et al., 2006).

4.3. *Gelificação térmica de proteínas globulares do leite*

A maior parte do leite destinado ao consumo humano passa por tratamento térmico, prevenindo problemas de saúde pública, relacionados à presença de microrganismos patogênicos no leite cru. Além de garantir segurança alimentar, o tratamento térmico pode induzir a gelificação térmica de proteínas globulares do leite (SINGH & FOX, 1987; DALGLEISH, 1990; CORREDIG & DALGLEISH, 1996; DALGLEISH et al., 1997; ANEMA, 1998; CORREDIG & DALGLEISH, 1999; ANEMA & LI, 2000).

A desnaturação e gelificação das proteínas do soro ocorre em duas etapas (MULVIHILL & DONOVAN, 1987; de WIT, 1990) conforme o esquema abaixo.



onde Pt representa o monômero da proteína nativa, Pd representa o desdobramento parcial da estrutura ou estado globular condensado da proteína, e $(\text{Pd})_x$ e $(\text{P}_{s-s})_x$ representam os agregados formados de proteína globular condensada (McSWINEY et al., 1994).

Inicialmente a proteína nativa desdobra-se parcialmente, mantendo sua estrutura secundária e expondo grupos hidrofóbicos originalmente escondidos no interior de sua estrutura. Este estado é denominado estado globular condensado (KUWAJIMA, 1989). Na segunda etapa, as interações hidrofóbicas entre esses grupos expostos causam agregação das moléculas de proteína que permanecem no estado globular condensado. Então, ocorre o fortalecimento desses agregados através da formação de ligações dissulfeto inter e intra-moleculares e ligações

iônicas. Entretanto, também é possível que algumas ligações dissulfeto sejam feitas afetando o tamanho e a forma dos agregados finais formados (McSWINEY et al., 1994).

A baixas temperaturas, a reação entre a β -lactoglobulina e a κ -caseína mostra ser direcionada por interações hidrofóbicas (HAQUE & KINSELLA, 1988; JANG & SWAISGOOD, 1990). Já a associação da β -lactoglobulina com as micelas de caseína durante o tratamento térmico envolve duas reações que ocorrem simultaneamente. A primeira é a exposição dos grupos tiol reativos na molécula de β -lactoglobulina, o que permite o intercâmbio de grupos sulfidrilas (tiol) a ligações dissulfeto com a κ -caseína. A segunda reação seria o estabelecimento efetivo de ligações dissulfeto com a κ -caseína (OLDFIELD et al., 1998a; OLDFIELD et al., 1998b). Este complexo formado é tido como um dos maiores fatores responsáveis pela estabilidade térmica em relação ao pH do leite (SINGH & CREAMER, 1992). Por outro lado, a α -lactoalbumina não se associa propriamente à caseína, pois primeiramente ela forma um complexo com a β -lactoglobulina na fase sérica para só então se associar à micela de caseína (ELFAGM & WHEELLOCK, 1978; CALVO et al., 1993; FAMELART et al., 2003).

O mecanismo das interações induzidas pelo calor entre as proteínas do soro com as micelas de caseína, em uma faixa de tratamento térmico de 70 a 90°C foi avaliado em vários tempos de processo, e observou-se que a quantidade de β -lactoglobulina que interage com as micelas foi limitada pelo número de sítios ligantes disponíveis (CORREDIG & DALGLEISH, 1999). Por outro lado, a concentração de α -lactoalbumina foi o único fator determinante no grau de

associação ao agregado micelar. Takeuchi (2003) também verificou que a agregação e interação entre as proteínas do soro de leite e submicelas de caseína ocorreu principalmente entre a κ -caseína e a β -lactoglobulina, em pH 6,7.

Vasbinder et al. (2003) reportaram que não houve influência da temperatura de tratamento térmico (70-90°C) na distribuição das proteínas do soro desnaturadas entre os agregados formados por estas proteínas e as que interagiram com a κ -caseína. No entanto, tratamentos térmicos realizados em altos valores de pH resultaram na formação de maior número de agregados entre proteínas de soro desnaturadas, enquanto que tratamentos térmicos em baixos valores de pH induziram maior associação das proteínas do soro do leite com as sub-micelas de caseinato (CORREDIG & DALGLEISH, 1996; ANEMA & KLOSTERMEYER, 1997; OLDFIELD et al., 1998a; OLDFIELD et al., 1998b). Sistemas-modelo de leite quando aquecidos a 90°C mostraram que aproximadamente 83% da β -lactoglobulina do sistema se associou com as micelas de caseína em pH 5,8, sendo que este valor diminuiu para aproximadamente 76% em pH 6,3, 44% em pH 6,8 e 24% em pH 7,3 (SMITS & VAN BROUWERSHAVEN, 1980). Oldfield et al. (2000) sugeriram que a diminuição da associação das proteínas do leite com as micelas de caseína em elevados valores de pH está relacionada à parcial dissociação da κ -caseína que ocorre em altos valores de pH (KUDO, 1980; SINGH & FOX, 1985; ANEMA & KLOSTERMEYER, 1997; ANEMA & LI, 2000). Em pH 6,7 aproximadamente 23% do total de moléculas de κ -caseína fica solúvel em solução (ANEMA & LI, 2000). Por isso, embora a reatividade dos grupos sulfidríla aumente em altos valores de pH

(TORCHINSKY, 1981), a associação entre as proteínas do soro e a κ -caseína diminui e a formação de agregados entre as proteínas de soro aumenta.

5. Utilização de sacarose em sistemas biopoliméricos

A sacarose é um dissacarídeo amplamente utilizado na formulação de produtos lácteos e pode causar grandes alterações na microestrutura e propriedades reológicas desses produtos, dependendo da concentração adicionada. Recentes estudos têm avaliado a influência de açúcares no processo de gelificação de proteínas e, conseqüentemente da textura do produto (ANTIPOVA et al., 1999; KULMYRZAEV et al., 2000a; KULMYRZAEV et al., 2000b; CHRIST et al., 2005).

A sacarose é um co-soluto que influencia as propriedades termodinâmicas da água devido à alta capacidade de hidratação dos seus grupos hidroxilas equatoriais (FURUKI, 2000). Além disso, pode afetar os parâmetros cinéticos do sistema devido à alteração da viscosidade da fase aquosa, nas quais as proteínas estão dissolvidas. Isto pode resultar em uma modificação da frequência de colisões entre as moléculas de proteínas, retardando as reações cinéticas de agregação e gelificação.

A sacarose também pode interferir nos parâmetros termodinâmicos do sistema por um mecanismo conhecido como interação preferencial, que estabiliza as proteínas globulares e pode favorecer as interações proteína-proteína. As interações preferenciais são definidas como as mudanças que ocorrem na

concentração das moléculas do co-soluto e solvente nas vizinhanças da interface das proteínas em relação a fase aquosa, resultando em uma alteração da concentração das moléculas de solvente e co-soluto ao longo da superfície da proteína. Considerando que a superfície das moléculas de proteínas é heterogênea, com relação a suas propriedades físico-químicas, há regiões com maior afinidade pelo co-soluto que outras regiões (TIMASHEFF, 1993), como mostrado na Figura 2.3.

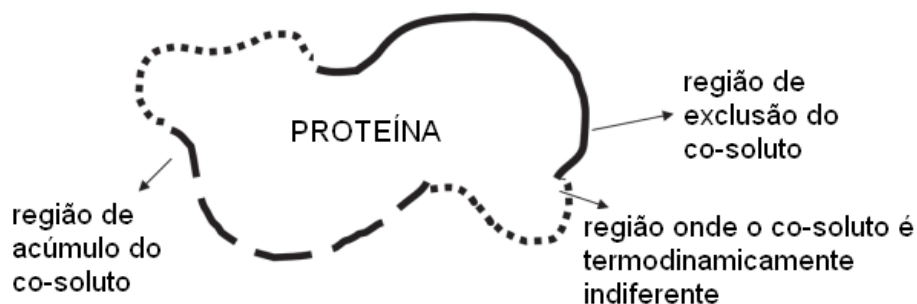


Figura 2.3. Distribuição das moléculas de co-soluto nas proximidades da superfície de uma proteína (TIMASHEFF, 1993).

A presença de açúcares também tem sido relacionada ao aumento da termoestabilidade de proteínas e subsequente gelificação, provavelmente devido ao estabelecimento de ligações de hidrogênio entre açúcares e a água, o que requer uma maior energia térmica para superar a energia de barreira que dificulta o desdobramento das moléculas de proteínas (ANTIPOVA & SEMENOVA 1997a; ANTIPOVA & SEMENOVA 1997b; RODRIGUEZ PATINO et al., 2002).

A adição de sacarose a soluções de caseínas promoveu a estabilidade destas, não pela ligação direta com a proteína, mas pelo mecanismo de hidratação preferencial (MORA-GUTIERREZ & FARREL, 2000). A sacarose

compete com as proteínas do leite pela água de hidratação, levando a um aumento da atração entre os segmentos hidrofóbicos das proteínas (aumento das forças de interação proteína-proteína em relação às interações proteínas-solvente), o que facilitou a agregação e formação do gel (KULMYRZAEV et al., 2000a).

Duan et al. (2001) sugeriram que os grupos hidroxilas presentes nas moléculas de sacarose favorecem as interações proteínas-açúcar em soluções aquosas. Estas interações de curto-alcance podem formar uma camada hidrofílica ao redor das proteínas e assim aumentar a dispersibilidade das mesmas através da hidratação e/ou alterar as interações intramoleculares (SEMENOVA et al., 2002). A sacarose, em concentrações acima de 6% (p/p), promoveu um aumento na taxa de gelificação de proteínas do soro, provavelmente pelo aumento da magnitude das interações entre as proteínas, em relação às interações proteínas-solvente, tal como no estudo de Mora-Gutierrez & Farrel (2000). Em concentrações mais altas de sacarose, pode ocorrer um aumento da eficiência das colisões ou do número de colisões que leva à agregação (BRYANT & McCLEMENTS, 2000).

Assim, a partir da complexidade de mecanismos citados acima pode se concluir que os co-solutos podem ser utilizados efetivamente para governar o processo de gelificação das proteínas globulares e produzir sistemas com desejadas propriedades sensoriais e físico-químicas (BAIER & McCLEMENTS, 2005).

6. Interações entre proteínas-polissacarídeos em alimentos

As misturas proteínas-polissacarídeos são amplamente utilizadas na indústria de alimentos e desempenham um papel essencial na relação entre estrutura, textura e estabilidade. As proteínas contribuem para formação e estabilidade de emulsões, enquanto que os polissacarídeos atuam como espessantes e agentes de ligação de água. A textura global e estabilidade dos alimentos dependem não apenas das propriedades individuais das proteínas e polissacarídeos, mas também da natureza e força das interações proteína-polissacarídeo (DICKINSON, 1995). As misturas de proteína e polissacarídeo são freqüentemente instáveis porque as forças de repulsão (desestabilizantes) geralmente são maiores que as forças de atração e assim, estas misturas estão sujeitas à separação de fases ou formação de complexos. No entanto, a adição de polissacarídeos em baixas concentrações pode criar grandes diferenças estruturais em consequência dos processos de associação entre os biopolímeros na gelificação.

As interações repulsivas são inespecíficas e de curta duração, provenientes dos efeitos de exclusão de volume e/ou interações eletrostáticas e tendem a ser fracas, exceto em curtas distâncias ou em soluções de baixa força iônica. As interações atrativas podem ser fracas ou fortes e também específicas ou não. Por exemplo, as ligações covalentes entre proteínas globulares do soro de leite são um tipo de interação atrativa que é específica, forte e permanente (STAINSBY, 1980). As interações atrativas não-específicas entre proteína-polissacarídeo

resultam de um grande número de interações fracas, tais como as iônicas, de van der Waals, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (SCHMITT et al., 1998).

Assim, o conhecimento dos mecanismos de interação que ocorrem em sistemas proteínas-polissacarídeos é muito importante no desenvolvimento de propriedades desejáveis em alimentos. Essas interações dependem de muitos fatores envolvidos nas condições de processo (pH, força iônica, temperatura, etc.) e também das estruturas químicas destes polímeros (SCHMITT et al., 1998).

Quando ocorre a mistura desses biopolímeros, a solução formada pode apresentar as seguintes situações de equilíbrio mostradas na Figura 2.4:

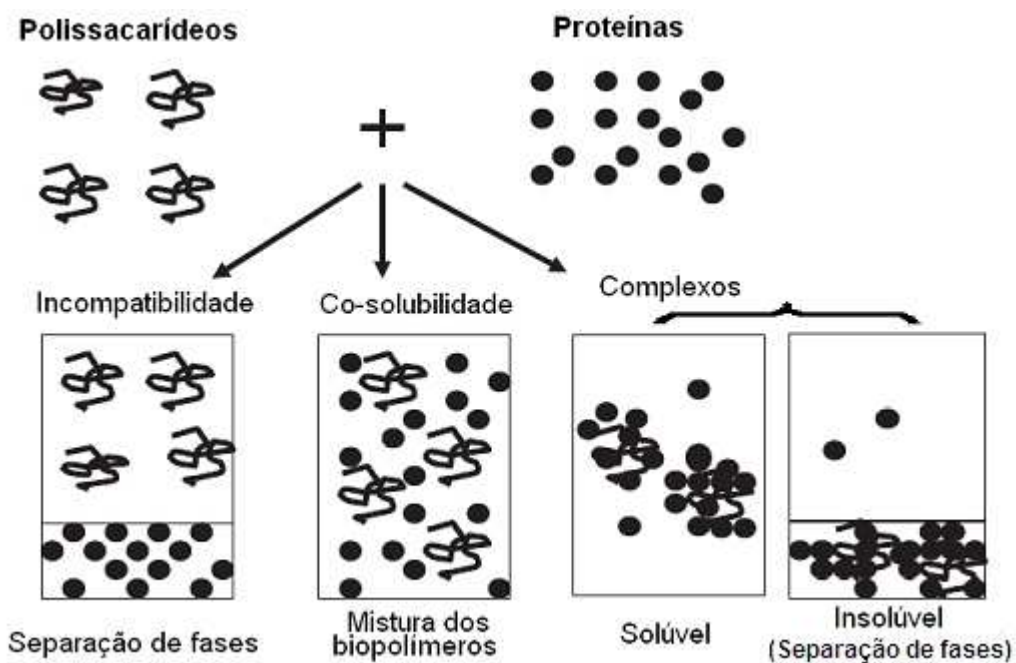


Figura 2.4. Principais tipos de interação entre proteínas e polissacarídeos em sistemas mistos (YE, 2007).

1. Co-solubilidade ou miscibilidade: ocorre quando a interação entre dois biopolímeros diferentes é similar à interação entre hidrocolóides de uma mesma espécie, ou seja, há uma miscibilidade instantânea e pode formar uma solução estável (SYRBE et al., 1998).

2. Incompatibilidade termodinâmica ou separação de fases segregativa: ocorre se as proteínas e polissacarídeos são incompatíveis, ou seja, repelem-se mutuamente e levam à segregação dos biopolímeros (TOLSTOGUZOV, 1991). A separação de fases resulta em duas fases aquosas, imiscíveis, uma rica em proteína e a outra em polissacarídeo. Caso as duas fases se encontrem em equilíbrio termodinâmico não ocorre alteração no sistema a menos que haja uma perturbação externa (ZEMAN & PATTERSON, 1972). Esta situação é comumente encontrada em misturas de proteínas com polissacarídeos não-iônicos ou em misturas de polissacarídeos iônicos e proteínas em valores de pH acima do pI (IMESON et al., 1977; DROHAN et al., 1997; TOSTOGUZOV, 1997; SYRBE et al., 1998).

3. Coacervação ou separação de fases associativa: ocorre se as proteínas e polissacarídeos apresentam interações atrativas, geralmente de natureza eletrostática. As interações eletrostáticas entre macromoléculas carregadas promovem inicialmente uma diminuição na energia livre eletrostática do sistema. A redução da entropia devido a formação de um complexo pode ser compensada pela entalpia de contribuição originada pelas interações entre os políons e a liberação de espécies iônicas e moléculas de água (PICULELL & LINDMAN, 1992; TOLSTOGUZOV, 1997). Fortes interações atrativas podem

ocorrer entre as proteínas positivamente ($\text{pH} < \text{pI}$) carregadas e polissacarídeos aniônicos em condições de baixa força iônica (XIA & DUBIN, 1994). Normalmente, dois tipos de complexos podem ser produzidos pelas interações eletrostáticas (XIA & DUBIN, 1994; MATTISON et al., 1995; TOLSTOGUZOV, 1997):

1) complexos solúveis, obtidos quando cargas opostas das duas macromoléculas iônicas não estão em igualdade estequiométrica. A carga líquida resultante permite a solubilização do complexo através da sua interação com as moléculas do solvente.

2) complexos insolúveis, obtidos quando as quantidades de cargas opostas de cada biopolímero são praticamente iguais e a carga líquida resultante é próxima de zero, ou seja, o complexo é neutro.

6.1. Forças de interação entre proteínas e polissacarídeos

Quando os biopolímeros se colidem, outras forças de interação diferente das eletrostáticas podem induzir à formação de zonas de junção entre os biopolímeros. Estas forças dependem da composição e estrutura das macromoléculas presentes, que são as seqüências de aminoácidos e monômeros de glicídios, a forma da estrutura, compacta ou enovelada (TOLSTOGUZOV, 1993).

As ligações de hidrogênio são de caráter iônico e se referem à interação de um átomo de hidrogênio ligado a um átomo eletronegativo (nitrogênio, oxigênio ou enxofre) com outro átomo eletronegativo (oxigênio de um grupo carbonila ou

carboxílico). A ligação de hidrogênio é favorecida pelas baixas temperaturas, afetando positivamente na formação de complexo proteína-polissacarídeo (STAINSBY, 1980; TOLSTOGUZOV, 1997).

As interações hidrofóbicas também são importantes forças presentes na formação de complexos. Estas interações são de caráter entrópico, promovidas pelo aumento da temperatura e induzidas pelas mudanças conformacionais e estruturais dos biopolímeros. Tais mudanças permitem que diferentes segmentos dos biopolímeros colidam e interajam, rearranjando-se no solvente, que é um importante parâmetro na exposição de segmentos hidrofóbicos das macromoléculas (STAINSBY, 1980; SAMANT et al., 1993; TOLSTOGUZOV, 1997). As interações hidrofóbicas são essenciais na estabilização térmica de complexos biopoliméricos, como foi mostrado para os complexos entre proteínas do soro e xantana e outros complexos proteína-polissacarídeos (CHEN et al., 1989; SANCHEZ & PAQUIN, 1997).

6.2. *Gelificação de misturas proteínas-polissacarídeos*

As propriedades de estruturação dos complexos proteína-polissacarídeo em alimentos dependem da capacidade de interação dos biopolímeros para formar estruturas organizadas. Entre as propriedades funcionais dos biopolímeros na estruturação de materiais, a agregação e gelificação desempenham um importante papel. A gelificação refere-se a uma reação em vários estágios, incluindo a agregação, para a formação de uma rede tridimensional (SCHMITT et al., 1998).

A agregação e gelificação são geralmente induzidas por alterações nas condições do meio, tais como aquecimento, resfriamento, acidificação, tratamentos enzimáticos ou de alta pressão. Dependendo do delicado balanço entre forças atrativas e repulsivas, os agregados formam um coágulo (forças atrativas dominantes) ou géis verdadeiros (forças repulsivas dominantes).

Géis compostos são produzidos a partir de uma mistura de dois ou mais agentes gelificantes ou um componente gelificante e outro não gelificante. Há uma variedade de maneiras que estes componentes podem interagir afetando as propriedades dos géis mistos, tais como: incompatibilidade termodinâmica dos componentes, mútua reatividade ou potencial para interação e combinações de dois ou mais agentes gelificantes (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 1997).

Os principais tipos de géis multicomponentes são:

a. Géis copoliméricos: é um tipo único de gel multicomponente, que ocorre quando dois ou mais polímeros podem copolimerizar para formar uma única rede heterogênea. Os géis de ovalbumina-albumina sérica bovina (BSA) induzidos termicamente são um exemplo deste tipo de gel (ZIEGLER & FOEGEDING, 1990).

b. Géis mistos: os géis mistos podem ser considerados como um caso particular de “redes poliméricas interpenetrantes”. Neste caso, ambos polímeros gelificam e formam redes relativamente independentes que se entrelaçam e são contínuas através de toda a amostra (ZIEGLER & FOEGEDING, 1990). Géis mistos são formados quando as concentrações dos biopolímeros em solução

excedem uma concentração crítica para a gelificação. Estes sistemas mostram interessantes propriedades quando um ou mais componentes formam um gel induzido termicamente e o outro forma um gel que é induzido pela ação de íons (TOLSTOGUZOV, 1998).

c. Géis complexos: são formados quando as interações entre os componentes é de natureza física. Um componente não gelificante pode associar-se com a rede de gel primário de modo aleatório via interações não específicas, reduzindo a flexibilidade das cadeias da rede primária e contribuindo para a rigidez dos géis (TOLSTOGUZOV, 1998). Exemplos de tais géis são os formados pelos complexos gelatina-alginato de sódio e gelatina-pectina de baixo teor de esterificação. É importante notar que nenhum dos biopolímeros sozinhos produziria géis sob as condições utilizadas, porém este fenômeno ocorre devido às interações entre as proteínas e polissacarídeos aniônicos.

d. Géis compactos: obtidos se um ou mais componentes forma uma rede contínua enquanto os outros componentes biopoliméricos, conhecidos como agentes de preenchimento, estão distribuídos através da fase contínua (TOLSTOGUZOV, 1998). Há dois tipos de géis, que podem ser caracterizados dependendo do estado das fases do sistema (ZIEGLER & FOEGEDING, 1990; AGUILERA, 1992). O gel composto por uma única rede polimérica ou gel do tipo I apresenta a mais simples microestrutura e é formado por uma única fase, sendo que apenas um biopolímero gelifica e o agente de preenchimento permanece solúvel. Em sistemas contendo duas fases, uma rede composta é formada (gel do tipo II), sendo que a fase dispersa consiste de partículas de líquido ou gel. Neste

caso, a incompatibilidade termodinâmica causa a separação de fases resultando em ambos polímeros formando redes de géis separadas e segregadas. Um exemplo do gel compacto do tipo II é o produzido pela adição de amido de trigo ou batata ao gel de surimi de peixe (AGUILERA, 1992).

A incompatibilidade dos biopolímeros pode levar a diferentes efeitos durante o processo de gelificação em múltiplos estágios. Polímeros mutuamente incompatíveis promovem a concentração destes, conseqüentemente diminuindo a concentração crítica para o início de formação de gel de cada componente (LEDWARD, 1994). Outro possível efeito da incompatibilidade é a intensificação da agregação de moléculas desnaturadas, o que se deve à conformação desdobrada, aumentando a exposição dos grupos hidrofóbicos e reduzindo a hidrofiliabilidade do sistema.

6.3. Interações polissacarídeos-proteínas do leite

Apesar da mistura de proteínas e polissacarídeos ser encontrada em vários produtos alimentícios, o estudo aprofundado de suas interações tem recebido maior atenção apenas recentemente.

A carragena apresenta interações com as proteínas do leite, ocorrendo formação de gel inclusive a baixas concentrações de ambos biopolímeros. Snoeren et al. (1975) reportaram que interações eletrostáticas específicas ocorrem entre os grupos sulfato da carragena e regiões carregadas positivamente

(resíduos 97-112) na molécula de κ -caseína. Esta interação eletrostática específica foi reportada em valores de pH acima do ponto isoelétrico da proteína e ocorreria na superfície das micelas de caseína (THOMAS, 1992). No entanto, estas interações atrativas entre a κ -carragena e micelas de caseína ocorreram somente em valores de temperatura abaixo da temperatura de transição conformacional (conformação helicoidal da carragena), levando à formação de uma rede tridimensional de duplas hélices mistas (LANGENDORFF et al., 1997; AUGUSTIN et al., 1999). Neste caso, as micelas de caseína agiriam como partículas inseridas na matriz do gel como um preenchedor interagindo na formação da rede, tornando-a mais forte, especialmente em valores do pH fisiológico do leite (DROHAN et al., 1997; LANGENDORFF et al., 2000). Em sistemas proteínas do leite-carragena com altas concentrações de polissacarídeo (0,1% p/p), a gelificação é predominantemente resultado da auto-associação helicoidal da carragena, levando à formação de géis fortes. Em baixas concentrações (0,02% p/p) de carragena, as proteínas do leite interferem na formação do gel, devido às interações proteína-carragena, mas mesmo assim, o processo de gelificação é dominado pela transição conformacional (estado enovelado para estado helicoidal) da carragena (DROHAN et al., 1997; BOURRIOT et al., 1999). O aumento do diâmetro das micelas de caseína na presença de κ -carragena foi interpretada como sendo resultado da ligação entre os biopolímeros (SPAGNUOLO et al., 2005) e a evidência direta para a formação da rede micela-polissacarídeo foi demonstrada por microscopia eletrônica (SPAGNUOLO et al., 2005; MARTIN et al., 2006).

Oakenfull et al. (1999) propuseram um mecanismo de dois passos para explicar a formação de géis de caseinato de sódio- κ -carragena. Em altas concentrações de caseinato e altas temperaturas, quando a carragena está na forma desordenada, os dois biopolímeros formam agregados. Durante o resfriamento, a carragena vai se reordenando e começa a gelificar devido à formação de hélices, promovendo uma rede contínua e fortemente elástica. Sob condições específicas de força iônica e concentração de proteínas, altas concentrações de κ -carragena (acima de 0,2% p/p) e temperaturas acima da transição do estado enovelado para helicoidal levam à depleção-floculação e as micelas de caseína sedimentam na solução, enquanto que abaixo da temperatura de transição a mistura forma um gel (LANGENDORFF et al., 1997). Usando reologia oscilatória sob baixas deformações, foi relatado que em altas concentrações de polissacarídeo a quantidade de proteínas em solução não apresentou um efeito marcante nas propriedades gelificantes do leite, mas quando a concentração foi abaixo de 0,018%, a gelificação esteve em desvantagem, possivelmente pela interação da caseína com a pequena quantidade de moléculas disponíveis em solução, assim, interferindo com a habilidade da carragena em formar gel (THAIUDOM & GOFF, 2003).

Interações entre as proteínas do soro de leite e κ -carragena foram observadas por Mleko (1997), principalmente em valores de pH maiores que 5 e este efeito sinérgico foi maior quando a proteína passou por tratamento térmico. No entanto, não foram observadas interações significativas evidentes entre esses biopolímeros (HEMAR et al., 2002). Tziboula & Horne (1999b) estudaram a

influência da desnaturação das proteínas do soro no leite sobre as propriedades gelificantes da κ -carragena e concluíram que esse processo não afetou a gelificação deste polissacarídeo. Por outro lado, a κ -carragena presente na solução durante o tratamento térmico não influenciou a taxa de desnaturação das proteínas do soro.

Alexander & Dalgleish (2007) reportaram que os sistemas leite/ κ -carragena formaram um gel auto-sustentável de κ -carragena com as partículas de proteínas aprisionadas nos poros da rede. A desnaturação das proteínas do soro também pareceu não interferir no processo de gelificação dos sistemas κ -carragena/leite ou as possíveis interações entre as micelas de caseína e a carragena.

Os ensaios dinâmicos oscilatórios têm sido uma importante ferramenta para a caracterização dos processos de gelificação e fusão de géis de κ -carragena e proteínas de soro de leite ou outras proteínas. As análises térmicas dos géis também contribuem no fornecimento de informações adicionais sobre os fenômenos que ocorrem durante a gelificação, assim como na avaliação da influência do nível de desnaturação térmica das proteínas sobre a rede formada (BAEZA et al., 2002). Através deste estudo, foi demonstrado que o estado de desnaturação das proteínas influenciaram na gelificação da κ -carragena. Géis contendo proteínas desnaturadas apresentaram uma maior resistência da rede do gel à ruptura e este fenômeno foi relacionado aos efeitos de exclusão de volume e interações eletrostáticas com as moléculas de κ -carragena (BAEZA et al., 2002).

Takeuchi (2003) utilizou a técnica de planejamento experimental fatorial para avaliar o processo de formação de géis promovido pela interação entre caseinato de sódio, isolado protéico de soro, κ -carragena e sacarose, devido ao tratamento térmico em pH 6,7. Os géis apresentaram características reológicas fortemente influenciadas pela carragena, a qual favoreceu o caráter elástico. A sacarose pareceu favorecer a interação do isolado protéico de soro com a carragena, levando a uma rede tridimensional mais interconectada, portanto, mais elástica e resistente à ruptura.

6.4. Efeito de açúcares em sistemas de proteínas e polissacarídeos

A conformação e a associação intermolecular de biopolímeros podem ser freqüentemente modificadas pela interação de açúcares que atuam como co-solutos. Este fenômeno pode ser explicado, em parte, pela redução no conteúdo de água.

Schorsch et al. (1999) avaliaram sistemas contendo proteínas do leite, goma locuste, na presença ou ausência de sacarose na concentração de 20, 30 ou 40% (p/p). A sacarose mostrou uma pequena influência na compatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros. A adição de sacarose levou a um efeito de concentração da fase protéica e diluição da fase de goma locuste, mas não observaram a interação entre os componentes por meio de análises reológicas, turbidimetria e microscopia eletrônica e confocal.

A adição de sacarose em géis ácidos compostos por proteínas do leite e κ -carragena em diferentes condições de processo resultou em géis mais duros, elásticos e firmes que os géis sem sacarose, mostrados através da avaliação de suas propriedades reológicas. A adição da sacarose provavelmente produziu um aumento das interações proteína-proteína e polissacarídeo-proteína, fortalecendo a rede do gel (SABADINI et al., 2006).

O efeito de co-solutos (sacarose e sucralose) em géis ácidos de κ -carragena e caseinato de sódio foi avaliado e os resultados mostraram que os géis mistos apresentaram maior resistência à ruptura que os géis contendo apenas um dos biopolímeros, o que denota o sinergismo entre os componentes. Além disso, a adição de sacarose aos géis mistos promoveu uma maior resistência da rede do gel e a sucralose mostrou um efeito mais limitado que o da sacarose, provavelmente devido a falta de formação de ligações de hidrogênio por causa da troca dos grupos OH^- pelos grupos cloretos da molécula de sucralose. No entanto, a presença de sacarose aumentou a incompatibilidade termodinâmica, que pode ser explicado por uma redução na afinidade da proteína pelo solvente no início da acidificação, ou através de hidratação preferencial da proteína, levando à formação de mais ligações entre as moléculas de proteínas e a uma rede mais ramificada. A sacarose também estabilizou as zonas de junção da carragena facilitando a formação da rede de carragena-carragena, que foi provavelmente responsável pela estrutura principal destes sistemas (RIBEIRO et al., 2004).

CAPÍTULO III

PROPRIEDADES MECÂNICAS, SINERESE E MICROESTRUTURA DE GÉIS DE CASEINATO DE SÓDIO INDUZIDOS PELA ACIDIFICAÇÃO COM GLUCONA- δ -LACTONA

Propriedades mecânicas, sinerese e microestrutura de géis de caseinato de sódio induzidos pela acidificação com glucona- δ -lactona

Resumo

Géis ácidos de caseinato de sódio (CS) formados em diferentes temperaturas de incubação (4, 10, 25 e 40°C) e com ampla faixa de concentração de proteína (2-6% p/p) foram induzidos pela gradual hidrólise de glucona- δ -lactona (GDL) a ácido glucônico promovendo diferentes taxas de acidificação. A cinética de acidificação e gelificação foi avaliada desde o pH 6,7 até o ponto isoelétrico das caseínas através da medida de pH e propriedades mecânicas obtidas em compressão uniaxial (tensão e deformação na ruptura). Como uma tendência geral, altas taxas de acidificação promoveram a formação da rede do gel mais rapidamente, enquanto que temperaturas de incubação mais baixas produziram valores mais altos de pH no estado estacionário (pH_{ss}) e o aumento da concentração de CS promoveu um pequeno aumento do valor de pH. A formação da rede do gel foi mais influenciada pelas interações eletrostáticas do que pelas diferentes taxas de acidificação, principalmente em pH próximo ao pI das caseína, além das interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio que foram importantes forças envolvidas na estabilização da microestrutura da rede do gel. O rearranjo da rede foi observado principalmente em pH_{ss} próximo ao pI das caseínas, promovendo géis mais fortes na temperatura de incubação de 10°C seguidos por 25, 4 e 40°C, sendo também um indicativo do comportamento da microestrutura da rede do gel, pois em altas temperaturas os poros foram maiores e a sinerese foi mais pronunciada.

Palavras-chave: caseinato de sódio, glucona- δ -lactona, taxa de acidificação, propriedades mecânicas.

1. Introdução

A compreensão do processo de gelificação ácida de proteínas do leite é muito importante para o processamento de diversos produtos lácteos como sobremesas e iogurtes. Géis ácidos de caseína podem ser obtidos a partir de uma variedade de partículas primárias, indo desde moléculas simples de proteína ou grupos de proteínas (nanopartículas de caseinato) até partículas nativas de caseína micelar (PUGNALONI et al., 2005). O caseinato de sódio é um ingrediente lácteo preparado por meio da precipitação ácida da caseína do leite em seu ponto isoelétrico. O hidróxido de sódio é adicionado para redissolver a proteína e para restabelecer a neutralidade do meio. Nestas condições, os caseinatos formam agregados ou submicelas devido à alta proporção de resíduos laterais de aminoácidos hidrofóbicos que se auto-associam em soluções aquosas (FARRELL et al., 1990). O posterior processo de associação de submicelas para a formação de micelas de caseína não ocorre devido à remoção do cálcio durante a precipitação ácida (OAKENFULL et al., 1999). As micelas de caseína e, provavelmente as submicelas, em pH natural do leite (6,7) são estabilizadas principalmente pela camada superficial carregada negativamente, composta principalmente de moléculas de κ -caseína (WALSTRA, 1990; de KRUIF & ROEFS, 1996; HOLT & HORNE, 1996). No entanto, a redução do pH promove a neutralização dos grupos carboxílicos e dos resíduos carregados negativamente dos aminoácidos levando à agregação da proteína (WALSTRA, 1990; de KRUIF & ROEFS, 1996; HOLT & HORNE, 1996) em um valor de pH ao redor do ponto isoelétrico da caseína, que é próximo a 4,6.

Por outro lado, independente do pH, a temperatura tem uma grande influência nas interações proteína-proteína (HEARLE, 1982), dado que em temperaturas elevadas as vibrações térmicas permitem que as moléculas de proteína deslizem mais rapidamente umas sobre as outras, enquanto que com o resfriamento estas vibrações diminuem e as forças atrativas das moléculas prevalecem. Assim, o movimento das cadeias ou grupos de proteínas distantes umas das outras diminui muito e a estrutura se solidifica como um gel (CARR & MUNRO, 2004). Além do pH final, a cinética do processo de acidificação, que é função da temperatura, também pode influenciar os atributos físicos do produto final, que contribuem à percepção sensorial e à funcionalidade (HORNE, 1998; ETTELAIE, 2003) tais como aparência visual, microestrutura e propriedades reológicas. Isto ocorre porque durante a acidificação do leite, muitas das propriedades físico-químicas das caseínas mudam consideravelmente, em especial na faixa de que vai entre 5,5 a 5,0, incluindo a observação de um volume máximo da micela de caseína e a dissociação das proteínas (ROEFS et al., 1985; WALSTRA, 1990). Além disso, o grau de liberação das caseínas durante a acidificação também é dependente da temperatura, pois a 30°C uma diminuição no pH não promove nenhuma liberação, enquanto que a 4°C aproximadamente 40% das caseínas são dissociadas no pH 5,5 (DALGLEISH & LAW, 1988). Em baixas temperaturas há um favorecimento das interações hidrofílicas, enquanto que as interações hidrofóbicas são predominantes em mais altas temperaturas, promovendo diferentes propriedades físicas do gel conforme a temperatura de formação da rede.

O leite pode ser acidificado através de culturas bacterianas (fermentação láctica) ou pela adição de glucona- δ -lactona (GDL), que se hidrolisa a ácido glucônico resultando em uma diminuição do pH. O uso de GDL pode evitar algumas das dificuldades associadas com bactérias lácticas (*starter*), tais como atividade variável e alteração no tipo de cultura usada. Os géis feitos com estes dois tipos de precursores ácidos diferem em suas propriedades reológicas (LUCEY et al., 1998), em parte em função da taxa de acidificação. A acidificação por GDL pode ser executada em diferentes taxas, que pode levar a diferentes valores de pHs final, dependendo da temperatura, presença de outros componentes (proteínas, açúcares, sais) ou concentração de precursor ácido. Em géis induzidos por GDL, o ponto isoelétrico (pH 4,6) pode ser alcançado mais rapidamente e permanecer estável, permitindo assim um maior tempo de reorganização em torno deste pH contribuindo para o contínuo rearranjo das partículas de caseína.

Vários trabalhos foram realizados usando GDL como precursor ácido para obter géis lácteos ácidos (van VLIET et al., 1991; de KRUIF, 1997; GASTALDI et al., 1997; LUCEY et al., 1997a; LUCEY et al., 1997b; LUCEY & SINGH, 1997; van VLIET et al., 1997; LUCEY et al., 1998; HORNE, 2003), mas entre estes trabalhos não há uma consideração clara sobre as taxas de acidificação e a sua consequência na formação da rede do gel. Além disso, estes trabalhos usaram diferentes concentrações de GDL e temperaturas de incubação, portanto diferentes taxas de acidificação foram obtidas, embora os resultados tenham sido

analisados a um mesmo pH final e os efeitos de cinética não tenham sido considerados.

Braga et al. (2006) avaliaram a influência da taxa de acidificação e o pH final nas propriedades de géis de caseinato de sódio através da adição de diferentes concentrações de GDL a 10°C e reportou que a taxa de acidificação teve um efeito significativo nas propriedades mecânicas em estado estacionário, mas não afetou as propriedades reológicas analisadas sob cisalhamento durante a gelificação.

Vétier et al. (1997) estudaram a influência da temperatura e da taxa de acidificação na estrutura fractal de agregados de caseína acidificada com GDL usando técnicas de espalhamento de luz (*light scattering*) e turbidimetria. Diferentes taxas de acidificação promovidas pela adição de 0,40 a 1,50% (p/v) de GDL em leite desnatado reconstituído e diluído foram analisadas somente a 20°C e não foi observado o efeito da cinética de agregação na dimensão fractal. Entretanto, o efeito de temperatura (10 - 40°C), utilizando a mesma taxa de acidificação, mostrou que os agregados de caseína com estruturas mais preenchidas (maior dimensão fractal) foram observados em menores temperaturas de incubação, enquanto que em temperaturas mais altas, notou-se a formação de agregados mais ramificados.

Entretanto, não foram encontrados estudos sobre a avaliação da força da rede de géis de caseinato de sódio durante seu processo de formação e após o alcance do pH em estado estacionário, considerando o efeito da temperatura e rearranjo no ponto isoelétrico como parâmetros fundamentais para a relação estrutura – propriedades mecânicas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de uma ampla faixa de temperaturas de incubação (4 a 40°C) e a concentração de caseinato de sódio (2 a 6% (p/p)) nas propriedades mecânicas (tensão e deformação na ruptura), solubilidade protéica, microestrutura e sinerese de géis acidificados com GDL. Além disso, estas condições experimentais permitiram observar o efeito de diferentes taxas de acidificação e valores de pH final no processo de rearranjo da rede do gel durante longo tempo de incubação.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Os ingredientes usados para o preparo dos sistemas-modelo foram caseína e glucona- δ -lactona (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). A caseína em pó foi caracterizada por espectroscopia de absorção atômica e a seguinte composição de íons foi obtida: $\text{Na}^+ = 0,16\%$, $\text{Ca}^{+2} = 0,14\%$ e $\text{K}^+ = 0,08\%$. Os conteúdos de proteína ($\text{N} \times 6,38$), gordura e umidade do pó de caseína foram $88,2 \pm 0,9\%$, $0,84 \pm 0,08\%$ e $6,5 \pm 0,1\%$ (base úmida), respectivamente.

2.2. Preparo das soluções de caseinato de sódio e géis

As soluções de caseinato de sódio foram preparadas pela dispersão do pó de caseína em água deionizada com adição de hidróxido de sódio (10 M) para manter o pH em 6,7 sob agitação magnética por 4 horas à temperatura máxima de

50°C. A solução-estoque de caseinato de sódio foi preparada com concentração de 10% (p/p), a qual foi posteriormente diluída até as concentrações de 2, 4 e 6% (p/p). O GDL em pó foi rapidamente dissolvido em pequena quantidade de água deionizada, previamente equilibrada a 4, 10, 25 ou 40°C, antes de ser adicionado nas soluções de caseinato de sódio também equilibradas à mesma temperatura. Ambas soluções foram rapidamente misturadas sob constante agitação magnética para evitar uma agregação prévia da caseína e permitir uma rápida dissolução homogênea (cerca de 2 minutos). A concentração do GDL adicionado foi calculada utilizando-se uma razão GDL/caseinato (concentração em % p/p) correspondente a 0,135 (Braga et al., 2006) para obter o pH final em torno de 4,6. As soluções mistas (caseinato de sódio e GDL) foram colocadas em tubos plásticos cilíndricos (30 mm de diâmetro e 30 mm de altura) e armazenadas nas temperaturas de incubação de 4, 10, 25 e 40°C para a formação dos géis e análise das propriedades mecânicas, sinerese e microestrutura. Para as medidas de pH, alíquotas de soluções mistas foram colocadas em tubos *Eppendorf* de 2,5 mL e estocadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. A diminuição do pH dos sistemas de caseinato de sódio devido à hidrólise do GDL foi medida utilizando-se um pHmetro Digimed Analítica (Mod. DME-CF1, São Paulo, Brasil) para semi-sólidos (géis). O pH das amostras foi monitorado durante todo o processo, a partir de 6,7 até cerca de 4,6. No início da cinética, o valor de pH foi medido a cada 10 min por 1h, depois a cada 30 min por 3h, até cerca de 4h de intervalo, quando se alcançou o estado estacionário, ou seja, quando o valor de pH não se alterou com o passar do tempo. A cinética de pH foi medida em

duplicata. As propriedades mecânicas foram avaliadas durante o processo de acidificação a partir do momento que os géis eram auto-sustentáveis (quando foi possível retirar os géis dos tubos e a estrutura se manter) e foram analisadas até aproximadamente 5 dias para 4 e 10°C e 3 dias para 25 e 40°C. As avaliações de sinerese, solubilidade protéica e microestrutura por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas após o gel alcançar o estado estacionário de pH.

2.3. *Propriedades mecânicas*

As propriedades mecânicas dos géis foram determinadas por compressão uniaxial usando um texturômetro TA-XT2i Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Godalming, Inglaterra) equipado com uma placa cilíndrica de acrílico (40 mm de diâmetro). As superfícies em contato com a amostra foram lubrificadas com óleo de silicone para evitar atrito com a amostra. As propriedades mecânicas durante a gelificação foram obtidas a partir dos primeiros géis auto-sustentáveis até alcançar o estado estacionário das propriedades mecânicas. Os testes de ruptura foram rápidos e cuidadosamente realizados nas temperaturas de incubação dos géis para evitar uma alteração da temperatura maior que $\pm 1^\circ\text{C}$. Os géis auto-sustentáveis foram submetidos a 80% de compressão em relação a sua altura inicial e a velocidade do teste foi de 1 mm/s. Todas as medidas foram realizadas em quintuplicata. Os dados de força e distância de compressão foram transformados em deformação (ϵ_H) e tensão (σ) real ou de Hencky através das equações (1) e (2), respectivamente (STEFFE, 1996). A área real utilizada para o cálculo da tensão (σ) foi determinada assumindo incompressibilidade dos géis. Os

valores de tensão (σ_{rupt}) e deformação (ε_{rupt}) na ruptura foram determinados a partir do ponto máximo da curva tensão-deformação.

$$\varepsilon_H = \left| \ln \left(\frac{H(t)}{H_0} \right) \right| \quad (1)$$

$$\sigma = \frac{F(t)H(t)}{A_0H_0} \quad (2)$$

onde ε_H é a deformação de Hencky (adimensional), $H(t)$ é a altura no tempo t (mm), H_0 é a altura no início da compressão (mm), $F(t)$ é a força no tempo t (N) e A_0 é a área de contato inicial do gel (mm^2).

Uma equação de cinética de primeira ordem (Equação 3) foi usada para ajustar os dados de pH e tensão na ruptura como uma função do tempo após a adição de GDL, para as diferentes soluções de caseinato de sódio em cada temperatura de incubação.

$$x(t) = x_{ss} + A \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (3)$$

onde $x(t)$ é a propriedade medida (pH ou tensão na ruptura) como uma função do tempo, x_{ss} é o valor da propriedade no estado estacionário, t é o tempo após a adição de GDL, k é a taxa do processo de acidificação (min^{-1}) ou de aumento da força do gel (min^{-1}) e A é um parâmetro de ajuste.

2.4. Determinação da solubilidade protéica dos géis

Uma alíquota dos géis, cerca de 2,5 g, foi dispersa em diferentes soluções (15 mL) a fim de ajustar a concentração de proteína das dispersões para 0,1% (p/p). Os géis foram solubilizados em água deionizada (DW), em um tampão

padrão pH 8,0 (0,086 M Tris, 0,09 M glicina, 4 mM Na₂EDTA) (B) e 6 M uréia (U). As soluções foram homogeneizadas à temperatura ambiente usando um homogeneizador Ultra-Turrax IKA model T18 basic (Staufen, Alemanha) a 10000 rpm por 2 minutos. As soluções homogeneizadas foram então centrifugadas a 10000 x g por 30 minutos em uma centrífuga Allegra 25 R Beckman (Fullerton, CA, EUA) e as proteínas solúveis foram determinadas na fração sobrenadante. Todas as dispersões dos géis foram feitas em triplicata. A concentração de proteína solúvel foi determinada a 280 nm em um espectrofotômetro Beckman Du-70 (Fullerton, CA, EUA) e calculada usando a lei de Lambert-Beer (Equação 4).

$$A = E_{280\text{nm}} \cdot C \cdot l \quad (4)$$

onde A é a absorvância a 280 nm, $E_{280\text{nm}}$ é o coeficiente de extinção, igual a 1,3461 mg/mL.cm, C é a concentração de proteína solubilizada e l é o comprimento da cubeta de quartzo (igual a 1 cm). O coeficiente de extinção foi obtido por medidas de absorvância a 280 nm para uma solução de caseinato de sódio à concentração de 1 mg.mL⁻¹ que foi determinada pelo método de Kjeldhal.

2.5. Avaliação da microestrutura dos géis

Para a análise da microestrutura dos géis formados foram coletadas amostras do gel (aproximadamente 10 x 2 x 2 mm) que foram fixados durante 12 h com glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pH 7,2. Depois do enxágüe em tampão cacodilato (0,1 M), as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido, seguido por outro enxágüe em tampão cacodilato. Na etapa seguinte, as amostras fraturadas foram pós-fixadas em uma solução tamponada

de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% (p/v). Em seguida, as amostras foram enxaguadas por duas vezes em tampão cacodilato e foram desidratadas com etanol em diferentes graduações em cada etapa: 30, 50, 70 e 90% (v/v). Cada etapa teve uma duração de 20 min. A desidratação continuou em etanol anidro, em 3 etapas de 1 h cada, com troca de solução. As amostras foram secas no ponto crítico utilizando CO_2 (Critical Point Dryer, mod. CPD 03, Balzers, Alzenau, Alemanha) e posteriormente, foram montadas no porta-amostras de alumínio e cobertas com ouro (Balzers, mod. SCD 050, Balzers, Alzenau, Alemanha). As micrografias foram feitas em quintuplicata e estruturas típicas dos géis foram obtidas em uma ampliação de 2000 x com um microscópio de varredura JEOL JSM-5800 LV (Tóquio, Japão) em uma voltagem de 10 kV.

2.6. Sinerese

Após alcançar o estado estacionário de pH, os géis foram cuidadosamente retirados dos tubos plásticos e uma alíquota do gel (cerca de 2,0 g) foi colocada em bquer contendo um filtro de papel duplo (densidade superficial: 80 g.cm^2 , espessura: $205 \mu\text{m}$, tamanho médio dos poros: $1,4 \mu\text{m}$) para apoiar o gel. Os béqueres foram acondicionados em recipientes fechados e mantidos na temperatura de incubação durante 3 h. Depois desse tempo pesou-se a quantidade de água liberada pelo gel, que foi o exsudado recolhido no bquer e a umidade absorvida pelo papel filtro. O valor de sinerese foi calculado através da Equação 5:

$$\text{Sinerese (\%)} = \left(\frac{m_{\text{liberada}}}{m_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (5)$$

onde $m_{\text{inicial}}(\text{g})$ e $m_{\text{liberada}}(\text{g})$ são as quantidades de água inicialmente presentes no gel (calculado a partir da composição centesimal do gel) e a água liberada após 3 h de acondicionamento na temperatura de incubação (4, 10, 25 e 40°C), respectivamente. Todas as medidas foram realizadas em quintuplicata.

2.7. Análise estatística

As diferenças entre os resultados de solubilidade protéica e sinerese dos diversos tratamentos foram avaliadas através do procedimento de Tukey usando o software Statistica v. 5.5 (STATSOFT INC., 2000) com $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Cinéticas de gelificação

A variação do pH em função do tempo pode ser observada na Figura 3.1, a qual mostra uma rápida queda do pH durante os primeiros 500 minutos (cerca de 8 h) e, posteriormente, há uma diminuição da taxa de acidificação até alcançar o estado estacionário. Nessa figura foram apresentados apenas os géis de caseinato de sódio com 2 e 6% (p/p), já que os resultados obtidos a 4% apresentaram tendências muito similares. Além disso, a curva de acidificação mostra apenas o tempo de acidificação até cerca de 8000 min (cerca de 133 h) pois foi o intervalo de tempo suficiente para que o pH atingisse e permanecesse no estado estacionário (Figura 3.1). No entanto, a leitura de pH foi realizada até aproximadamente 12000 min (200 h). O padrão de redução do pH foi muito similar para todas as temperaturas de incubação (Figura 3.1), com algumas diferenças no valor do pH em estado estacionário e velocidade de acidificação. Os valores finais de pH variaram entre 4,45 e 4,55 para as temperaturas de incubação mais altas (40 e 25°C), os quais foram alcançados em aproximadamente 2000 minutos (cerca de 34 h) e de 4,53 a 4,74 para as temperaturas mais baixas (10 e 4°C) obtidos em cerca de 4000 minutos (cerca de 67 h).

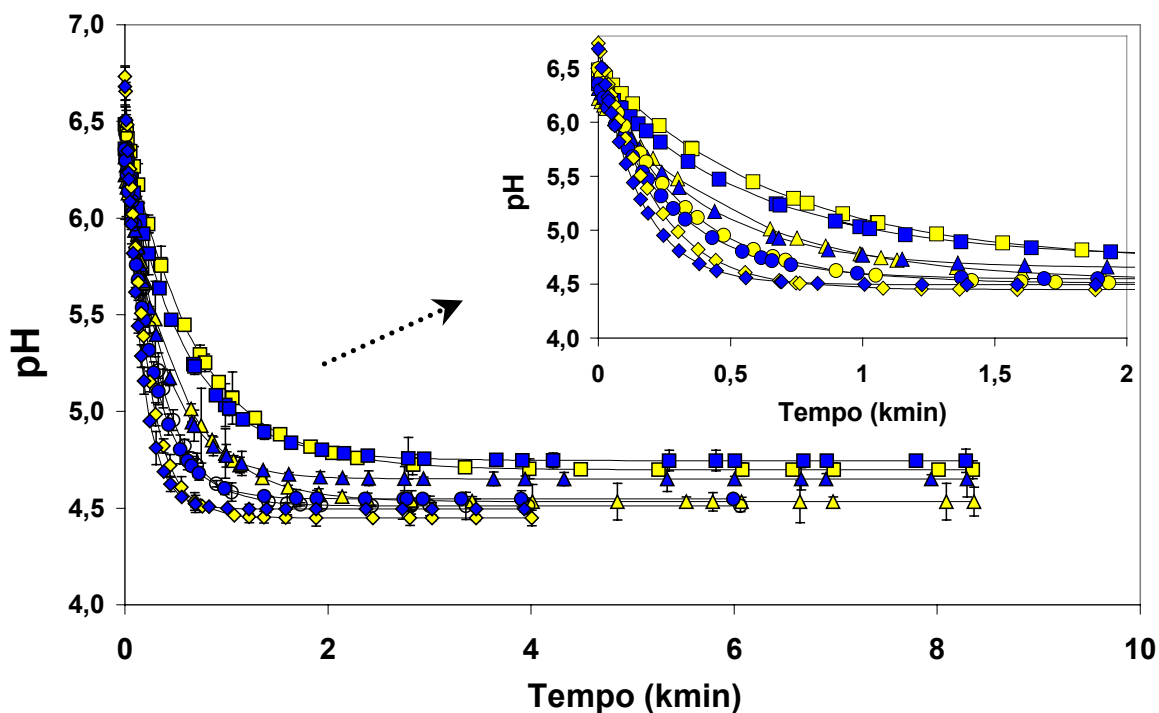


Figura 3.1. Variação do pH das soluções de caseinato de sódio (CS) a 2 e 6% (p/p) acidificadas com GDL. As amostras foram acidificadas nas temperaturas de incubação (T) de 4 (□), 10 (△), 25 (○) e 40°C (◇). Os símbolos amarelos e azuis representam soluções com 2% e 6% (p/p) de caseinato de sódio, respectivamente. No detalhe da figura, pode-se observar o início da queda de pH até 2000 min para melhor visualização das diferentes taxas de acidificação.

O efeito da temperatura de incubação e concentração de caseinato de sódio nos valores de pH em estado estacionário (pH_{ss}) está apresentado na Tabela 3.1. Altas temperaturas de incubação promoveram um aumento da velocidade de acidificação e uma diminuição do pH final, provavelmente devido à intensificação na taxa de dissociação do éster GDL em ácido glucônico (de KRUIF, 1997).

O valor do pH final não se alterou com o passar do tempo após atingir o estado estacionário, pois a reação de hidrólise do GDL alcançou o equilíbrio químico. Por outro lado, um aumento da concentração de caseinato de sódio promoveu um leve aumento nos valores de pH_{ss} , o que pode estar relacionado ao efeito tampão das proteínas que induziram a uma menor diminuição dos valores de pH_{ss} em função da maior quantidade de aminoácidos com resíduos NH capazes de neutralizar os íons H^+ liberados do ácido glucônico (SALAÜN et al., 2005). Este efeito combinado da concentração de proteínas e da temperatura poderia ser manipulado para controlar o pH final das formulações alimentícias baseadas em proteínas.

Tabela 3.1. Parâmetros de ajuste da Equação 3 obtidos para as soluções de caseinato de sódio (CS) com GDL em diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura	CS (% p/p)	pH_{ss}	A	$k_{pH} (10^{-4} \cdot \text{min}^{-1})$	r^2
4°C	2	4,70	1,79	14,84	0,99
	4	4,71	1,68	15,20	0,99
	6	4,74	1,61	17,41	0,99
10°C	2	4,53	1,69	19,38	0,98
	4	4,63	1,65	23,90	0,98
	6	4,65	1,67	26,32	0,99
25°C	2	4,51	1,99	31,57	0,99
	4	4,54	1,83	33,61	0,98
	6	4,55	1,81	35,88	0,99
40°C	2	4,45	2,28	47,97	0,99
	4	4,46	2,26	57,98	0,99
	6	4,50	2,19	63,47	0,99

A faixa de valores de pH final ($4,45 < \text{pH}_{\text{ss}} < 4,75$) obtida para os géis de caseinato de sódio pode levar a diferentes observações sobre o efeito do balanço das interações eletrostáticas, porque os géis resultantes foram formados em condições de excesso ($\text{pH}_{\text{ss}} < 4,6$) e insuficiência ($\text{pH}_{\text{ss}} > 4,6$) de acidificação em relação ao ponto isoelétrico (4,6) do caseinato de sódio. Neste caso, os géis formados podem apresentar diferentes intensidades de interações eletrostáticas, que poderiam tornar a rede do gel mais fraca ou mais forte, dependendo da distância do valor do pH final em relação ao pI das proteínas.

O parâmetro de ajuste A mostrou uma tendência de aumento com o aumento da temperatura de incubação e uma diminuição com o aumento da concentração de caseinato de sódio.

A tensão na ruptura está relacionada com a força da rede de gel e tal propriedade foi avaliada em função do tempo durante o processo de acidificação (Figura 3.2). Os tempos de avaliação das propriedades mecânicas (tensão e deformação na ruptura) variaram em função da temperatura de incubação devido, principalmente, à velocidade de acidificação e do tempo necessário para alcançar o estado estacionário destas propriedades. O tempo necessário para se alcançar o estado estacionário das propriedades mecânicas foi superior ao do pH, visto que o processo de gelificação só foi iniciado em valores de pH menores que 5,0. Para os géis formados a 4°C , os tempos de análise variaram de 6000 a 12000 min, já para os géis a 10°C o tempo foi de cerca de 6000 min e para os géis formados a 25 e 40°C foi de aproximadamente 3000 min. O valor de pH foi medido durante

toda cinética de gelificação simultaneamente às análises das propriedades mecânicas.

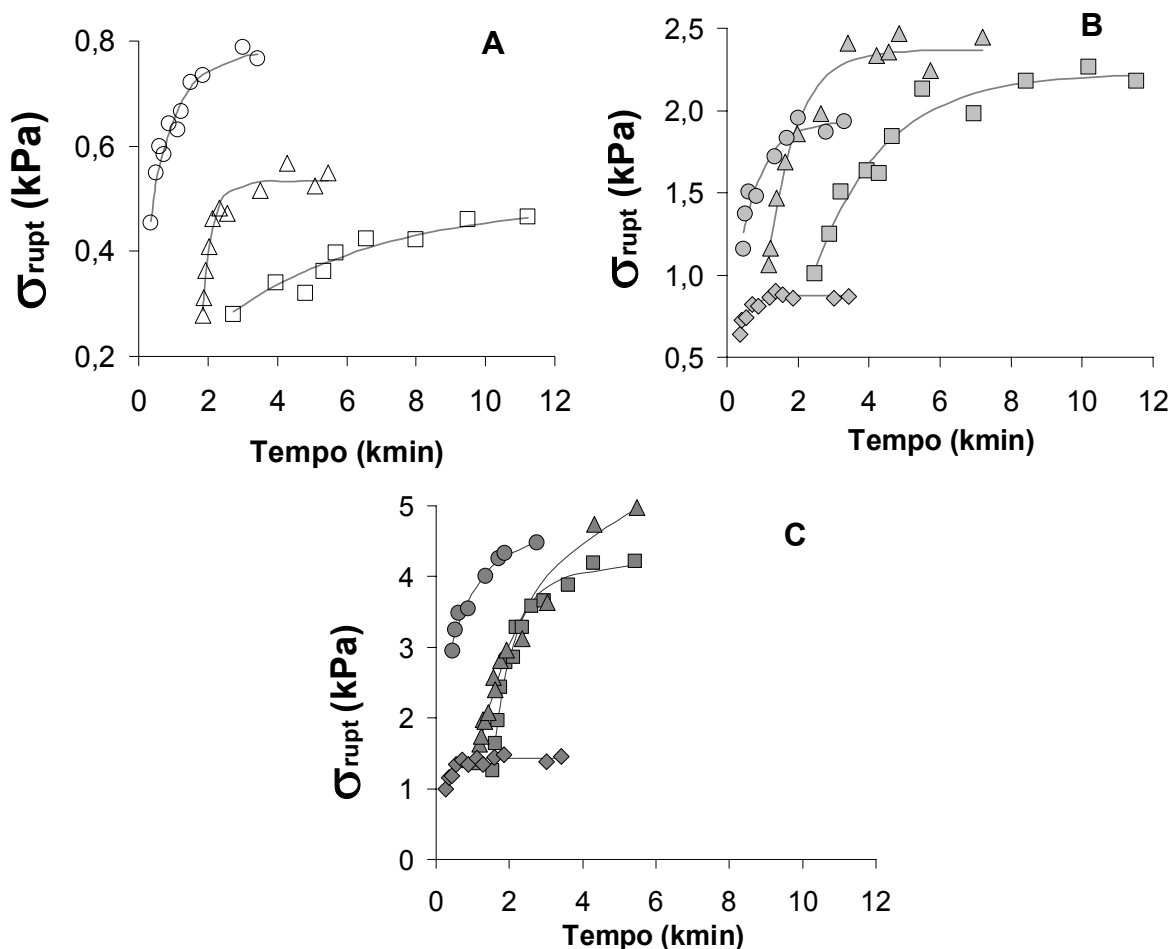


Figura 3.2. Formação da rede do gel durante acidificação das soluções de caseinato de sódio (CS) com GDL nas concentrações de (A) 2, (B) 4 e (C) 6% (p/p). As amostras foram acidificadas nas temperaturas de incubação (T) de 4 (□), 10 (△), 25 (○) e 40°C (◇).

Géis mais fortes (maior valor de tensão na ruptura) foram observados para as maiores concentrações de caseinato de sódio como ocorreu para a taxa de formação da rede do gel (k_{tens}), sendo que ambos efeitos podem ser atribuídos à maior quantidade de moléculas de proteínas presentes no gel formado. Esta

influência da concentração na tensão na ruptura foi observada para todos os sistemas e foi mais expressivo para 4, 10 e 25°C que para 40°C (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Parâmetros de ajuste obtidos a partir da Equação 3 para o comportamento da tensão na ruptura de géis de caseinato de sódio (CS) durante acidificação com GDL em diferentes temperaturas de incubação (4, 10, 25 e 40°C).

Temperatura	CS (% p/p)	σ_{ss} (kPa)	A	k_{tens} (10^{-4} min^{-1})	r^2
4°C	2	0,44	-0,38	3,54	0,98
	4	2,23	-4,17	5,06	0,98
	6	4,09	-33,65	16,43	0,99
10°C	2	0,54	-1,19	10,44	0,97
	4	2,37	-5,82	12,86	0,98
	6	5,22	-25,41	14,24	0,98
25°C	2	0,78	-0,47	12,66	0,97
	4	1,74	-1,42	15,68	0,98
	6	4,36	-3,22	19,54	0,98
40°C	4	0,87	-0,76	34,44	0,97
	6	1,42	-1,29	43,59	0,96

Os géis formados a 10°C apresentaram um intenso aumento da tensão na ruptura no início da gelificação e alcançaram o estado estacionário da força da rede em torno de 2000 min, principalmente para as concentrações de 2 e 4% de caseinato de sódio. Já para os géis contendo 6% de proteína, esse comportamento foi observado para os géis formados a 4°C. Esse resultado poderia ser um indicativo para a otimização do processo de obtenção do produto final, o qual estaria estável nas condições desejada após o tempo previsto.

O aumento da temperatura de incubação e concentração de caseinato de sódio também promoveram um aumento da taxa de formação da rede do gel (k_{tens}) (Tabela 3.2), do mesmo modo que a velocidade de acidificação (k_{pH}) (Tabela 3.1). Esta relação direta entre as taxas de acidificação e formação da rede do gel foi também relatada por Bringe & Kinsella (1993) para a gelificação ácida de leite desnatado. A dissociação de GDL que ocorreu mais rapidamente em temperaturas de incubação mais altas está associada à formação mais rápida da rede do gel em tais condições. Entretanto, um aumento na taxa de acidificação não implicou necessariamente em menores valores de tensão na ruptura no estado estacionário (σ_{ss}) ou uma rede de gel mais fraca.

Géis de caseinato de sódio formados em temperaturas de incubação de até 25°C exibiram crescentes valores de tensão na ruptura no estado estacionário (σ_{ss}), valor similar a 10°C quando incubado a 25°C, mas a 40°C foi observada uma forte diminuição. As amostras contendo 2% (p/p) de caseinato de sódio, incubadas a 40°C, apresentaram uma rede de gel tão frágil, que foi considerada como não auto-sustentável, não sendo possível calcular sua tensão na ruptura. Tal efeito poderia estar parcialmente associado a rede mais fraca formada com menor quantidade de proteínas, pois os géis contendo apenas 2% (p/p) de caseinato de sódio apresentaram menor força ou dureza que os géis contendo maiores concentrações de proteína, para todas temperaturas de incubação. Entretanto, o pronunciado decréscimo da força da rede do gel observado somente a 40°C poderia ser também atribuído à alteração das propriedades das micelas da caseína a altas temperaturas com o fortalecimento das interações hidrofóbicas,

dificultando a liberação das frações desta proteína para o soro (DALGLEISH & LAW, 1988; BREMER et al., 1990). Provavelmente, tais interações também ocorrem com as submicelas de caseína do caseinato de sódio, já que o caseinato é uma mistura de caseínas sem o fosfato de cálcio coloidal (CCP) que estabiliza o grande complexo de caseína micelar.

Géis formados em temperaturas de incubação mais baixas levaram mais tempo para alcançar o estado estacionário devido às menores taxas de acidificação, e provavelmente a rede de gel formada foi mais ordenada do que a altas temperaturas (BRINGE & KINSELLA, 1993). De fato, os géis formados em temperaturas de incubação inferiores a 40°C mostraram valores mais altos de tensão na ruptura, similar ao relatado por Arshad et al. (1993) para géis de leite desnatado acidificados com GDL.

Os baixos valores da tensão na ruptura ou dureza dos géis formados em 40°C também podem ter sido causados pelo intenso rearranjo local das partículas durante a formação do gel, resultando na formação de agregados protéicos heterogêneos que resultam em uma rede menos contínua (ZOON et al., 1988).

A Figura 3.3 mostra o comportamento da tensão na ruptura dos géis de caseinato de sódio durante o processo de acidificação promovida pelo GDL. Durante a diminuição do pH ocorreu o fortalecimento ou endurecimento da rede do gel, devido à gradual neutralização das cargas negativas das moléculas de proteínas, diminuindo a repulsão eletrostática e promovendo as interações proteína-proteína. Os géis formados em menores temperaturas (menores taxas de acidificação), principalmente a 4 e 10°C, apresentaram um aumento mais

acentuado na tensão na ruptura em uma determinada faixa de pH (Figura 3.3). Este aumento foi atribuído ao fortalecimento da rede do gel com as mudanças mais lentas no valor de pH próximo ao pI, permitindo interações proteína-proteína mais efetivas devido à menor repulsão eletrostática e este processo foi denominado de rearranjo ou reorganização da rede do gel.

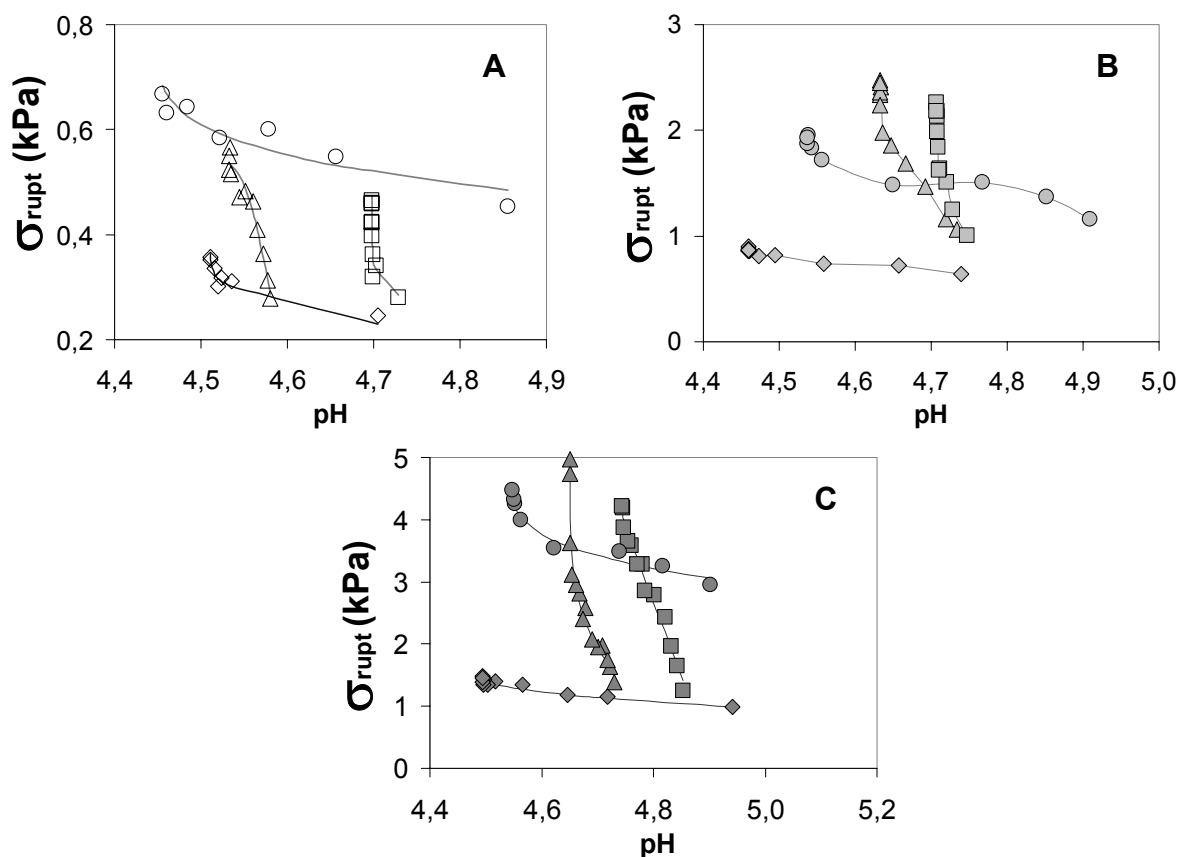


Figura 3.3. Efeito do pH na tensão na ruptura dos géis de caseinato de sódio acidificados com GDL nas temperaturas de incubação de 4 (□), 10 (△), 25 (○) e 40°C (◇). As concentrações de caseinato são (A) 2, (B) 4 e (C) 6% (p/p).

Os géis formados a mais altas temperaturas, 25 e 40°C apresentaram comportamento de rearranjo diferente dos formados a mais baixas temperaturas, visto que os primeiros apresentaram um forte rearranjo, enquanto que os últimos

não apresentaram um endurecimento expressivo da rede com o contínuo abaixamento de pH, uma vez que a rede formada foi auto-sustentável.

O aumento nos valores de tensão na ruptura se iniciou em diferentes valores de pH dependendo da concentração de CS e temperatura de incubação. A reorganização da rede do gel ou rearranjo das partículas de caseinato de sódio ou mesmo dos agregados de proteínas em uma estreita faixa de pH melhorou a força e interconectividade da rede (van VLIET et al., 1997). O pH de início de rearranjo foi avaliado a partir da taxa de variação da tensão em função do pH, ou seja, de $d\sigma/dpH$ e foi determinado no ponto onde $d\sigma/dpH < 1$. Este critério foi escolhido para facilitar a determinação do ponto de início de rearranjo para todos os géis. Dessa forma, a tensão e o tempo de início de rearranjo foram os valores correspondentes ao ponto onde $d\sigma/dpH < 1$ e o valores finais de pH, tempo e tensão na ruptura corresponderam aos resultados finais da cinética. O pH final deste rearranjo foi mais próximo do pH inicial de rearranjo para 10 e 25°C, quando o gel também foi mais forte.

Assim, a força do gel foi influenciada por uma combinação de fatores tais como a proximidade dos valores de pH inicial e final de rearranjo, em relação ao pI, durante a formação da rede e a escala de tempo para avaliar o processo de reorganização, mostrando que a taxa de acidificação induzida por diferentes temperaturas de incubação exerceu influência nas propriedades da rede do gel. Além disso, como o aumento da temperatura de incubação provocou uma diminuição do pH_{SS} , isto pode ter afetado o balanço das forças de interação relacionadas à reorganização da rede do gel em torno do pI. De fato, foi

observado que o processo de reorganização foi fortemente influenciado pela temperatura e pH no início do processo de rearranjo (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Valores de pH, tensão na ruptura e tempos de início e final do processo de reorganização da rede do gel de caseinato de sódio induzidos por GDL (2 a 6% (p/p)) formados em diferentes temperaturas de incubação (4, 10, 25 e 40°C). Valores de $|\Delta\text{pH}|$ indicam a distância do pH no tempo final da reorganização em relação ao pI (4,6) ($|\Delta\text{pH}| = |\text{pH}_{\text{final}} - \text{pI}|$).

Temperatura	CS (% p/p)	pH (-)			Tensão (kPa)		Tempo (kmin)	
		início	final	$ \Delta\text{pH} $	início	final	início	final
T = 4°C	2	4,73	4,70	0,10	0,28	0,40	2,73	5,69
	4	4,75	4,71	0,11	1,01	2,13	2,47	5,52
	6	4,85	4,74	0,14	1,25	4,22	1,54	5,43
T = 10°C	2	4,58	4,53	0,07	0,28	0,57	1,84	5,46
	4	4,73	4,63	0,03	1,06	2,47	1,17	5,73
	6	4,73	4,65	0,05	1,38	4,97	1,16	5,49
T = 25°C	2	4,52	4,51	0,09	0,67	0,79	1,59	2,79
	4	4,56	4,54	0,06	1,72	1,96	1,35	2,78
	6	4,56	4,55	0,05	4,00	4,47	1,35	2,76
T = 40°C	2	4,46	4,45	0,15	-	-	-	-
	4	4,46	4,46	0,14	0,86	0,87	1,20	3,44
	6	4,50	4,50	0,10	1,34	1,46	0,87	3,43

Os géis avaliados antes do processo de reorganização mostraram uma rede mais forte quando incubados a 25°C. Entretanto, depois do processo de reorganização os géis com os maiores valores de tensão na ruptura foram observados a 10°C, provavelmente devido a taxa de acidificação mais lenta que permitiu maior tempo para o rearranjo em valores de pH próximos ao pI . Assim, como uma tendência geral, os valores mais altos de dureza da rede do gel foram observados em valores mínimos de $|\Delta\text{pH}|$ e máximos de tempo de reorganização

da rede (diferença entre tempo final e inicial), que está relacionado a um longo rearranjo em valores de pH mais próximos ao pI das caseínas ou em mais baixa repulsão eletrostática entre as moléculas de proteínas. Apesar dos géis formados a 10 e 25°C apresentarem uma faixa de pH de reorganização mais próxima ao pI que os formados a 4°C, o último mostrou valores similares de tensão na ruptura em relação aos anteriores. Este fato pode estar relacionado ao efeito da temperatura no balanço das forças de interação. O aumento da temperatura leva a um aumento das interações hidrofóbicas e conseqüentemente a um decréscimo das ligações de hidrogênio (interações atrativas), resultando em um aumento das repulsões eletrostáticas. Desse modo, o balanço de forças poderia ser deslocado em direção a uma maior repulsão, levando a um enfraquecimento da matriz do gel (BRYANT & McCLEMENTS, 1998), o que é claramente observado para os géis formados a 40°C.

Em altas concentrações de caseinato de sódio foi observada a maior variação de tensão na ruptura durante o rearranjo, provavelmente devido ao maior número de moléculas que participam e reforçam a rede do gel (Tabela 3.3).

A temperatura de incubação não influenciou a deformação na ruptura (Figura 3.4) como ocorreu para a tensão na ruptura (Figura 3.2). Foi observada uma tendência à diminuição da deformação na ruptura durante a acidificação até alcançar o estado estacionário, que foi próximo ao tempo para alcançar o pH_{ss} . Tal comportamento foi mais pronunciado em altas concentrações de CS.

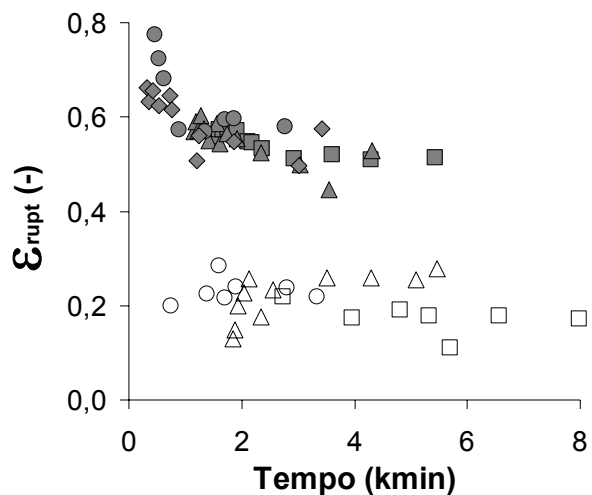


Figura 3.4. Efeito do tempo de acidificação nos valores de deformação na ruptura (ϵ_{rupt}) de géis de caseinato de sódio acidificados com GDL em temperaturas de incubação de 4 (\square), 10 (\triangle), 25 (\circ) e 40°C (\diamond). Os símbolos abertos e fechados são concentrações de caseinato de sódio de 2% e 6% (p/p), respectivamente.

Géis contendo 2% (p/p) de caseinato de sódio formados nas temperaturas de 4, 10 e 25°C apresentaram menores valores de deformação na ruptura (cerca de 0,1 a 0,3) e foram mais frágeis do que aqueles contendo 4% (resultados não apresentados) e 6% (deformação de ruptura na faixa de 0,4 a 0,8, para todas as temperaturas).

Assim, a deformabilidade dos géis foi uma função da densidade da rede do gel, devido à concentração de macromoléculas, e ao pH_{ss} , diferente da força do gel que também foi dependente da taxa de acidificação, do tempo para o rearranjo das partículas e da proximidade de pH_{ss} em relação ao pI .

3.2. Propriedades dos géis no estado estacionário de pH: solubilidade protéica, microestrutura e sinerese

Os géis com 6% (p/p) de caseinato de sódio formados em diferentes temperaturas de incubação foram usados para avaliar a solubilidade protéica e a microestrutura dos géis de caseinato de sódio em estado estacionário de pH, pois foram mais firmes e apresentaram a mesma tendência de comportamento dos géis com 2 e 4% (p/p).

A solubilidade protéica dos géis foi analisada em água deionizada, tampão TRIS e solução de uréia e os resultados estão apresentados na Figura 3.5. A solubilização protéica em água deionizada foi muito baixa, menor do que 1% (p/p) da quantidade inicial de proteína, provavelmente devido à baixa solubilidade das proteínas em torno do pI. Este resultado pode indicar a quase inexistência de moléculas de proteínas livres, que significa que as moléculas de caseína, na sua maioria, estavam unidas para a formação da rede do gel. A solubilidade das proteínas em solução de uréia foi cerca de 26-28% (Figura 3.5), mostrando que parte da rede estava ligada por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (TOTOSAUS et al., 2002; XIONG & KINSELLA, 1990) e esses resultados não foram dependentes das temperaturas de incubação ($p < 0,05$).

A solubilidade das proteínas em tampão TRIS foi cerca de 70%, indicando que a interação mais importante entre proteínas envolvidas na estabilização da microestrutura foi a interação eletrostática. De maneira similar, esses resultados não apresentaram dependência com a temperatura ($p < 0,05$), mas apenas pequenas diferenças entre 25 e 40°C. Os resultados indicaram que não foi

possível detectar pequenas diferenças das forças de interação devido à mudança de temperatura a partir dessa técnica, como observado para os resultados de tensão na ruptura.

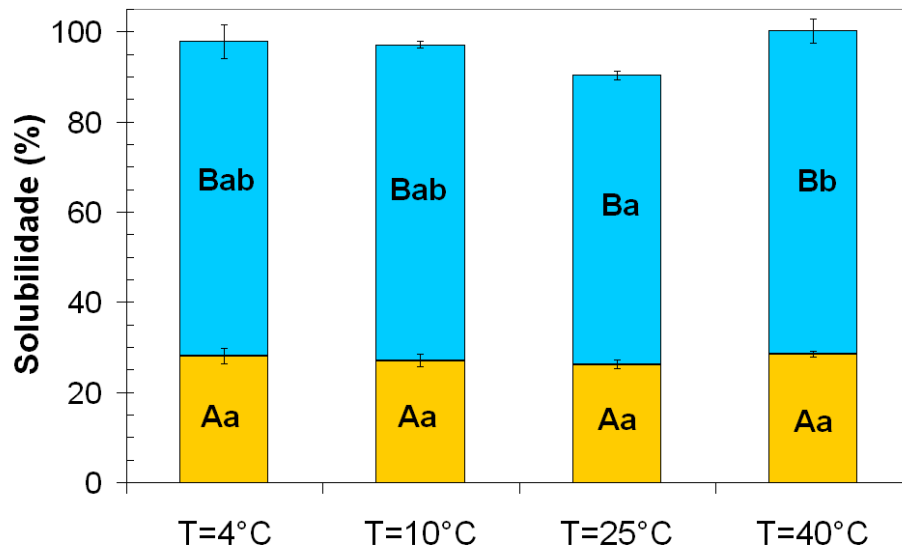
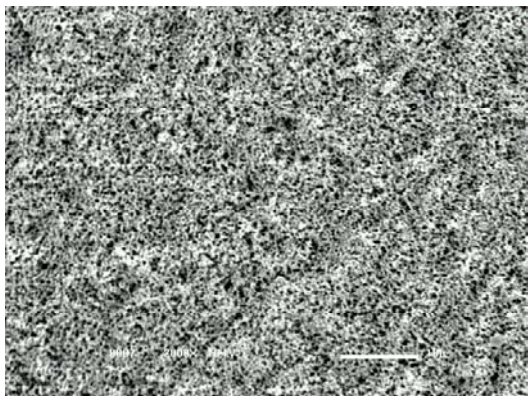


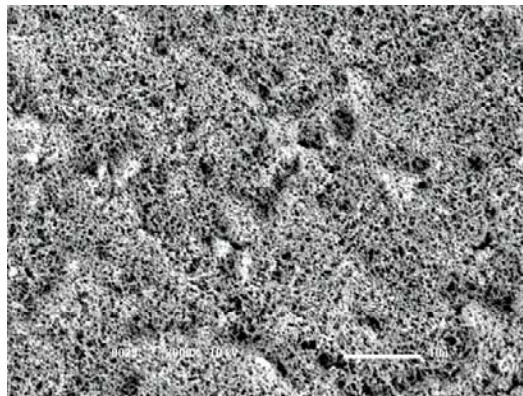
Figura 3.5. Solubilidade protéica de géis acidificados contendo 6% (p/p) de caseinato de sódio estocados em diferentes temperaturas. Os géis foram dispersos em diferentes tampões: tampão TRIS (■) e uréia (■). Letras maiúsculas: diferenças ($p < 0,05$) entre tampão TRIS e uréia e letras minúsculas: diferenças ($p < 0,05$) entre temperaturas de incubação para o mesmo tampão.

As micrografias dos géis contendo 6% (p/p) de caseinato de sódio foram analisadas a fim de entender o efeito das temperaturas de incubação (4, 10, 25 e 40°C) na microestrutura dos géis (Figura 3.6). As diferenças entre as microestruturas são evidentes, mostrando o efeito do aumento da temperatura na organização das ligações para a constituição das redes de partículas de caseína e formação do gel (Figura 3.6 C e D). Essas microestruturas mostram que os géis de caseína acidificados consistem de uma rede de proteína particulada constituída de partículas de caseínas ligadas em agregados como reportado por Kalab et al. (1983).

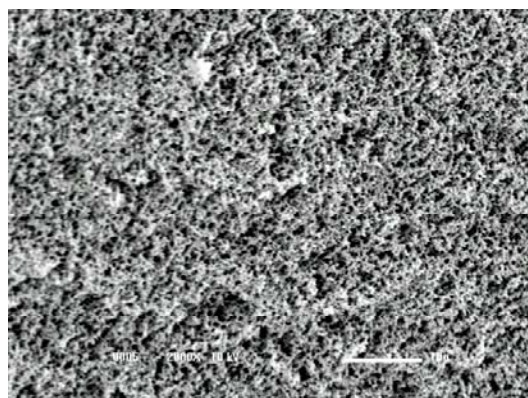
A) T= 4°C



B) T= 10°C



C) T= 25°C



D) T= 40°C

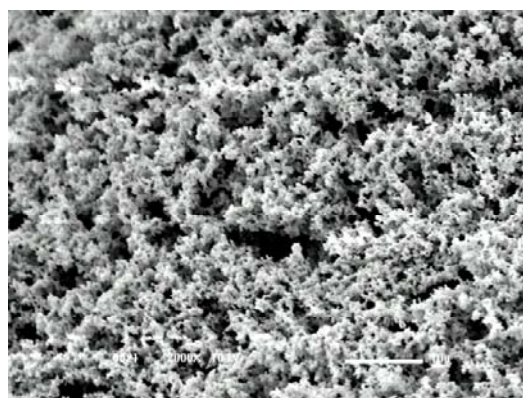


Figura 3.6. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de géis acidificados de caseinato de sódio (6% p/p) formados em temperaturas de incubação de (A) 4, (B) 10, (C) 25 e (D) 40°C. O aumento foi de 2.000 X e barra de escala = 10µm para todas as micrografias.

A 4°C, a rede do gel pareceu ser bastante homogênea, com poros pequenos, mas esses géis apresentaram uma rigidez similar aos formados a 10 e 25°C. Com o aumento da temperatura observou-se um aumento no tamanho dos poros das redes de gel e, como uma tendência geral, em temperaturas maiores que 10°C, foi observada uma estrutura mais particulada, que poderia estar relacionada a um enfraquecimento da rede de gel. Além disso, é evidente a formação de rede de gel a 4°C observada na Figura 3.6 A, diferente do apresentado por Roefs et al. (1985) e de Kruif & Roefs (1996). Estes autores mostraram uma inibição da gelificação das micelas de caseína em temperaturas abaixo de 10°C e em valores de pH próximos do pI (4,6), como uma consequência da diminuição das reações de agregação devido à forte redução das interações hidrofóbicas nessas condições (ROEFS, 1986).

Provavelmente, a gelificação de partículas de caseinato de sódio observada a 4°C foi resultado da agregação de frações de caseína liberadas ou solubilizadas no soro, principalmente β - e κ -caseínas promovidas pelo enfraquecimento das interações hidrofóbicas em baixas temperaturas sob condições ácidas (WALSTRA, 1990; de KRUIF & ROEFS, 1996; HOLT & HORNE, 1996). Esse processo de dissociação diminui drasticamente em temperaturas acima de 20°C. Em baixas temperaturas a região hidrofílica carregada negativamente da β -caseína emerge na superfície da micela, aumentando a densidade da camada superficial polieletrólítica. Quando os valores do pH estão próximos ao pI, a neutralização destas cargas negativas causa uma diminuição das repulsões

eletrostáticas, promovendo interações proteína-proteína mais pronunciadas levando à formação de gel.

Os valores de sinerese para os géis de caseinato de sódio foram avaliados após 95 h da adição de GDL para as temperaturas de incubação mais baixas (4 e 10°C) e 42 a 45 h para as temperaturas mais elevadas, 40 e 25°C, respectivamente. Como tendência geral, foram observados valores elevados, entre 35 e 82% (p/p) de exsudação em relação à quantidade inicial de água no gel (Figura 3.7).

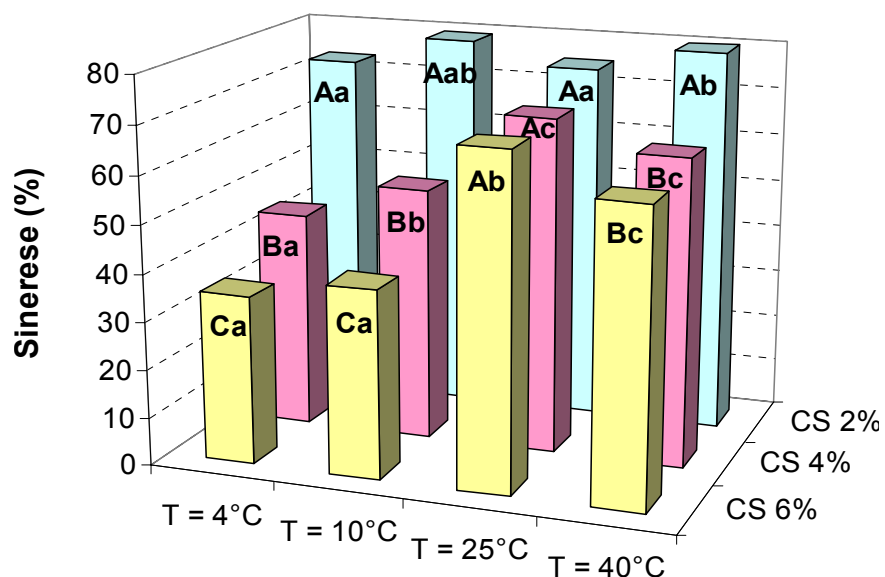


Figura 3.7. Influência das temperaturas de incubação (T: 4, 10, 25 e 40°C) e da concentração de caseinato de sódio (CS: 2, 4 e 6% (p/p)) na sinerese dos géis. Letras maiúsculas: diferenças ($p < 0,05$) entre concentrações de caseinato de sódio nas mesmas temperaturas de incubação e letras minúsculas: diferenças ($p < 0,05$) entre temperaturas de incubação na mesma concentração de caseinato de sódio.

Géis contendo 2% (p/p) de caseinato de sódio exibiram os maiores valores de sinerese e o efeito da temperatura de incubação nesses géis não apresentou uma tendência clara. Géis contendo maiores concentrações de caseinato de sódio exibiram menores valores de sinerese (Figura 3.7), provavelmente devido a maior quantidade de sítios hidrofílicos capaz de se ligar às moléculas de água e também à característica da rede do gel de ser mais interconectada e com menores poros.

Em altas concentrações de caseinato de sódio (4 e 6 % p/p) foi observado um aumento dos valores de sinerese com o aumento das temperaturas de incubação de 4 a 25°C, quando também foram observados os géis mais fortes (Figuras 3.7 e 3.8). Entretanto, um maior aumento da temperatura, de 25 para 40°C levou a uma diminuição da sinerese (Figura 3.7), mesmo com o gel sendo formado por uma rede mais frágil (Figura 3.8).

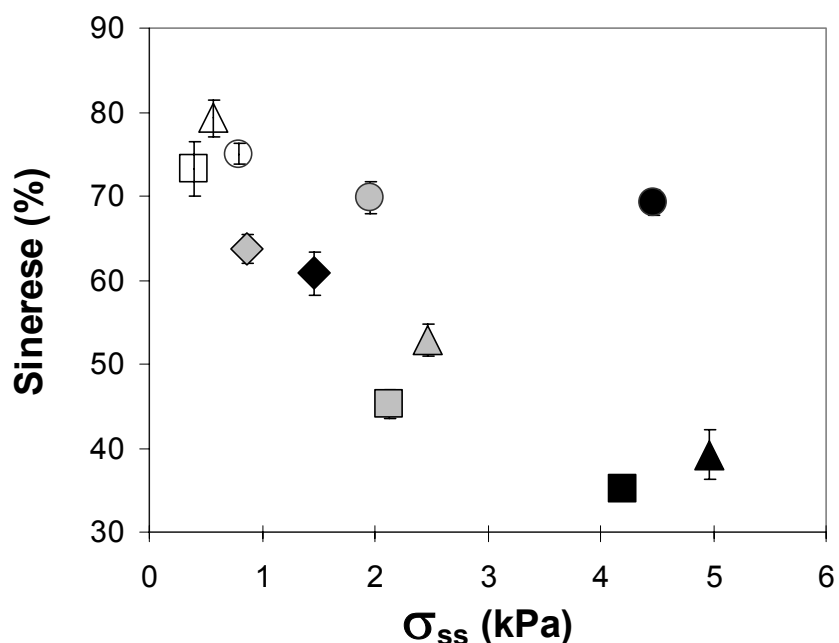


Figura 3.8. Relação entre a tensão na ruptura (σ_{ss}) e a sinerese de géis de caseinato de sódio acidificados com GDL no estado estacionário de pH. As temperaturas de incubação são 4 (\square), 10 (\triangle), 25 (\circ) e 40°C (\diamond) e as concentrações de caseinato de sódio são representadas pelas cores: branco, cinza e preto, representando 2, 4 e 6% (p/p), respectivamente.

Os mais baixos valores de sinerese foram observados nas mais baixas temperaturas de incubação, principalmente a 4 e 10°C (Figura 3.7), o que poderia estar relacionado à maior quantidade de κ -caseína dissociada das submicelas e liberadas no soro (DALGLEISH & LAW, 1988; BRAGA et al., 2006). A molécula de

κ -caseína possui uma porção altamente hidrofílica, favorecendo a formação de ligações de hidrogênio entre a água e as proteínas (SWAISGOOD, 1982). Surpreendentemente, a 25°C o efeito da concentração de caseinato de sódio em diminuir a sinerese espontânea não foi observado, apesar de elevadas durezas da rede do gel (Figura 3.8) estarem associadas à menor sinerese a 4 e 10°C.

A correlação entre os dados de sinerese e tensão na ruptura (σ_{ss}) não permitiu visualizar uma relação clara entre a dureza da rede do gel e a sua habilidade em reter água na sua matriz ou evitar a sinerese espontânea. Poderia se esperar que géis com uma rede mais forte, que são principalmente formadas por densas ligações formadas pelas interações macromoleculares, mostrasse uma grande quantidade de sítios ou grupos disponíveis para ligar as moléculas de água do que as redes de gel mais fracas, que de fato ocorreu para os géis formados a 4 e 10°C. Possivelmente, géis mais fracamente estruturados suportam pequena tensão, provavelmente devido à baixa densidade de ligações, o que poderia ser menos eficiente para aprisionar a água livre. Entretanto, os resultados observados para os géis a 25°C mostraram que a sua estrutura mais porosa foi um indicativo de menor capacidade de retenção de água mesmo possuindo uma estrutura mais rígida. Provavelmente, nesta temperatura ocorra um efetivo favorecimento das interações hidrofóbicas que promove a agregação das proteínas através dessa interação, diminuindo a capacidade de ligar água devido ao desfavorecimento do caráter hidrofílico destas.

Assim, as propriedades de sinerese provavelmente foram um complexo resultado do efeito das temperaturas de incubação no balanço entre as interações

atrativas e repulsivas entre as proteínas e destas com a água. Além disso, o efeito do pH final dos géis no estado estacionário poderia ter influenciado o tipo de interações proteína-proteína e a afinidade proteína-água.

4. Conclusão

Os resultados desse estudo mostraram que a gelificação ácida do caseinato de sódio induzida pelo GDL foi afetada pela concentração, temperatura de incubação e taxa de acidificação. Aumentando a concentração de caseinato de sódio foram observados maiores valores de pH no estado estacionário, maiores taxas de acidificação e de formação da rede do gel, maiores valores de tensão na ruptura no estado estacionário e menor sinerese. Por outro lado, o aumento da temperatura de incubação também promoveu altas taxas de acidificação e de formação do gel, porém menores valores de pH final, menor dureza da rede do gel e pronunciada sinerese, devido à formação de uma rede com poros maiores. Géis mais rígidos e com maior rearranjo da rede do gel foram observados em valores de pH próximo ao pI das caseínas, o que foi possível de se alcançar com menores taxas de acidificação. As principais interações entre as proteínas, responsáveis pela estabilização da microestrutura foram as eletrostáticas, seguidas pelas hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, que influenciaram as interações proteína-proteína e proteína-água. Os géis formados a 10°C mostraram maior rigidez da rede e menores valores de sinerese, em uma mesma concentração de proteína, devido ao balanço entre as forças repulsivas e atrativas causado pelo elevado tempo de rearranjo próximo ao pI.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DO LEITE E SACAROSE NA GELIFICAÇÃO DA κ -CARRAGENA

Influência das proteínas do leite e sacarose na gelificação da κ -carragena

Resumo

O processo de gelificação de soluções de κ -carragena (concentração de 0,3 a 0,8% p/p) puras ou mistas contendo caseinato de sódio (2 a 8% p/p), isolado protéico de soro (0,5 a 7% p/p) ou sacarose (5 a 30% p/p) foi estudado a partir de ensaios reológicos em cisalhamento oscilatório. A temperatura de início da gelificação ou do desenvolvimento de estrutura (T_s) foi determinada a partir de varredura de temperatura em resfriamento, sendo verificado que esta aumentou com a concentração de carragena em sistemas puros. Já a adição de caseinato de sódio não modificou a T_s , enquanto que a presença de sacarose ou isolado protéico de soro houve um aumento da T_s em relação aos géis puros. Após o processo de gelificação, observou-se que os géis mais elásticos foram os com maior concentração de carragena, sendo que a adição de sacarose exerceu pouco efeito nas propriedades reológicas destes sistemas. A adição de isolado protéico de soro enfraqueceu a rede do gel em baixas concentrações, mas pareceu haver formação de uma rede mista com a carragena em concentrações mais elevadas. Já a mistura de carragena e caseinato de sódio mostrou efeito sinérgico até certa concentração (5%) desta proteína e para maiores concentrações, o enfraquecimento da elasticidade da rede do gel foi observado. Em altas concentrações de carragena e principalmente de proteínas do soro e sacarose foi notado o efeito de escorregamento, dificultando a avaliação dos resultados. Os espectros mecânicos dos géis mostraram que a maioria apresentou comportamento de gel fraco, devido ao efeito simultâneo das interações físicas e incompatibilidade termodinâmica. No entanto, géis fortes foram observados na maior e menor concentração de carragena e caseinato de sódio, respectivamente, o que poderia ser um indicativo da interação eletrostática entre estes dois biopolímeros.

Palavras-chave: κ -carragena, caseinato de sódio, isolado protéico de soro, sacarose, gelificação, transição conformacional, reologia

1. Introdução

As proteínas e polissacarídeos podem contribuir para a estrutura, textura e estabilidade dos alimentos, que são essenciais para a aceitação sensorial dos produtos pelos consumidores. As principais propriedades funcionais das proteínas e polissacarídeos são a sua capacidade de gelificação, estabilização de emulsões e aumento de viscosidade de soluções (SGARBIERI, 1998; SYRBE et al., 1998).

No entanto, as características de um produto não dependem somente das propriedades individuais das proteínas e polissacarídeos (DICKINSON & MERINO, 2002). As propriedades viscoelásticas de géis mistos de biopolímeros diferem significativamente dos géis formados por apenas um único biopolímero por causa das interações intermoleculares adicionais e a possibilidade de formação de redes interpenetrantes (SYRBE et al., 1998). Dessa forma, para desenvolver produtos alimentícios com propriedades desejáveis, o conhecimento dos mecanismos de interação em sistemas proteína-polissacarídeo é extremamente importante (HEMAR et al., 2002).

Um importante polissacarídeo utilizado em alimentos é a κ -carragena, que possui cadeia sulfatada aniônica. Este polissacarídeo é extraído de espécies de algas vermelhas da classe *Rhodophyta* e as suas principais aplicações em produtos alimentícios são em derivados de leite como agentes estabilizantes, espessantes e gelificantes, pois apresenta forte sinergismo com as proteínas do leite (SCHORSCH et al., 2000). A altas temperaturas, a κ -carragena se encontra no estado enovelado aleatório, porém sob resfriamento, este polissacarídeo passa por uma transição conformacional do estado desordenado para o ordenado

(helicoidal) que é acompanhada pela agregação e formação do gel. A temperatura em que ocorre a transição é dependente da natureza e concentração dos cátions presentes na solução (SCHORSCH et al., 2000), principalmente K^+ , Na^+ e Ca^{2+} (ROCHAS & RINAUDO, 1980; MORRIS & CHILVERS, 1983).

As proteínas do leite podem ser divididas em duas principais classes: as frações de caseína (α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína) e as proteínas do soro (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, imunoglobulinas e albumina sérica bovina), sendo que as caseínas estão presentes em maior concentração (SGARBIERI, 1998). O sinergismo entre as caseínas e a κ -carragena é bastante conhecido e explorado em sistemas gelificados, sendo relacionado a interações específicas que ocorrem entre estes biopolímeros (SNOEREN et al., 1975). Em baixas concentrações de κ -carragena parece ocorrer de fato uma interação entre a caseína e este polissacarídeo para formar um gel misto (OAKENFULL et al., 1999), porém em altas concentrações de κ -carragena ($\geq 0,1\%$ p/p), a gelificação é resultado da predominante auto-associação do polissacarídeo formando uma rede de gel auto-sustentável (DROHAN et al., 1997). Estas interações podem ocorrer tanto quando o polissacarídeo se encontra na forma helicoidal (DALGLEISH & MORRIS, 1988) como na forma enovelada (AUGUSTIN et al., 1999).

A possível interação entre a β -lactoglobulina e a κ -carragena foi avaliada por diversos autores (CAPRON et al., 1999a; CAPRON et al., 1999b; TZIBOULA & HORNE, 1999b; OULD ELEYA & TURGEON, 2000a; OULD ELEYA & TURGEON, 2000b; NEISER et al., 2000), sendo observado que o polissacarídeo acelerou o processo de gelificação da proteína e inibiu a micro-separação de fases. Em

sistemas mistos contendo proteínas do soro, a aplicação de tratamento térmico em temperaturas acima de 60°C pode induzir a desnaturação destas proteínas (DANNENBERG & KESSLER, 1988). Um efeito sinérgico entre a κ -carragena e proteínas desnaturadas, em condições de pH próximo à neutralidade, foi considerada uma consequência de duas redes co-contínuas resultantes da separação de fases antes da gelificação ocorrer (CAPRON et al., 1999a; CAPRON et al., 1999b; TZIBOULA & HORNE, 1999b; OULD ELEYA & TURGEON, 2000a; OULD ELEYA & TURGEON, 2000b).

Açúcares são amplamente utilizados em géis alimentícios para promover o sabor doce. No entanto, a adição de açúcares pode afetar as propriedades da água como solvente, levando a alterações das interações entre os componentes, principalmente de proteínas e polissacarídeos. Um exemplo, é o aumento da elasticidade e do ponto de fusão dos géis de κ -carragena com a adição de açúcares, como a sacarose e glicose (NISHINARI et al., 1990). No entanto, o aumento das características elásticas dos géis ocorreu até uma certa concentração, pois a adição excessiva destes açúcares diminuiu este parâmetro reológico. Assim, o efeito dos açúcares na interação entre os componentes de alimentos depende dos diferentes tipos e faixa de concentração destes.

O objetivo desse trabalho foi avaliar as interações entre a κ -carragena e caseinato de sódio, isolado protéico de soro ou sacarose em condições de gelificação dominada pela carragena em pH próximo a neutralidade, buscando entender o papel de cada componente na formação destes géis mistos. O

processo de gelificação foi avaliado através de testes reológicos oscilatórios a baixas deformações.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Os ingredientes usados para o preparo dos sistemas-modelo foram caseína e κ -carragena adquiridas da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), isolado protéico de soro (IPS - PSD-26) gentilmente cedido pela Arla Food Ingredients (Dinamarca) e sacarose adquirida da Synth (São Paulo, Brasil).

O IPS usado neste trabalho apresentou cerca de 52% de β -lactoglobulina, 18% de α -lactoalbumina e 6% de albumina sérica bovina conforme análise de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e quantificação por densitometria (Eagle Eye II, Strategene, EUA).

Na Tabela 4.1 é apresentada a composição média de alguns componentes presentes nos ingredientes utilizados neste trabalho.

As determinações das concentrações de proteína e lactose foram realizadas pelos métodos de Kjeldahl (AOAC, 1996) e fenol-sulfúrico (HODGE & HOFREITER, 1962), respectivamente, enquanto que o conteúdo de íons foi determinado por espectroscopia de absorção atômica.

Tabela 4.1. Composição média dos ingredientes (% p/p) usados no preparo dos sistemas-modelo.

	Proteína	Umidade	Lactose	Lipídeos	Ca²⁺(*)	K⁺(*)	Na⁺(*)
Caseína	88,2	6,5	-	0,84	0,14	0,08	0,16
IPS	92,4	5,7	0,6	-	0,05	0,65	0,63
Carragena	-	8,4	-	-	0,70	2,70	0,10
Sacarose	-	0,3	-	-	-	-	-

* Concentração em base úmida (% b.u.) e demais concentrações em base seca (% b.s.).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo das formulações

A) Preparo da solução de caseinato de sódio (CS)

As soluções estoque de caseinato de sódio (10% p/p) foram preparadas de acordo com a seção 2.2 do Capítulo III. As soluções-estoque foram posteriormente dissolvidas nas concentrações de 2, 5 e 8% (p/p) e o pH foi ajustado para 6,7 com adição de NaOH a 1M.

B) Preparo da solução do isolado protéico de soro (IPS)

A hidratação do IPS em água deionizada foi realizada sob agitação magnética por 30 min em temperatura ambiente (25°C), sendo o pH da solução ajustado para 6,7 com adição de solução NaOH 1M. A solução-estoque de IPS (10% p/p) foi armazenada a 10°C por 24 h para a sua completa hidratação, sendo posteriormente diluída para as concentrações de 0,5; 3, 5 e 7% (p/p).

C) Preparo dos sistemas puros e mistos

A suspensão de carragena foi preparada pela dispersão lenta deste polissacarídeo em água deionizada (géis puros de κ -carragena) ou em soluções de proteínas do leite (géis mistos) ou em soluções de sacarose à temperatura de 40°C sob agitação mecânica durante 15 min. O pH dos sistemas foi mantido em pH 6,7 com adição de NaOH 1M. Após a hidratação da carragena foi realizado o tratamento térmico em um tanque encamisado com circulação forçada, também sob agitação mecânica, à temperatura de 70°C por 30 min. Este tratamento térmico foi realizado para completa hidratação da carragena, permitir que a molécula de carragena estivesse no seu estado enovelado (desordenado), promover a desnaturação parcial das proteínas do soro e maior interação entre os componentes dos sistemas analisados. Após o tratamento térmico, as soluções foram rapidamente resfriadas com auxílio de um banho de água gelada até alcançar 50°C, quando foram levadas ao reômetro.

As faixas de concentração (Tabela 4.2) utilizadas para a composição dos sistemas-modelo foram escolhidas com base na formulação de produtos lácteos adicionados de polissacarídeos e adoçados, tais como sorvetes, sobremesas congeladas, “flans” e recheio de tortas.

Tabela 4.2. Faixas de concentração dos componentes dos sistemas-modelo.

Concentração (% p/p)	κ-Carragena	Caseína	Isolado protéico de soro	Sacarose
	0,3 – 0,8	2 - 8	0,5 – 7	5 – 30

A nomenclatura dos sistemas-modelo contendo solução pura de carragena ou em mistura com o caseinato de sódio, isolado protéico de soro ou sacarose, utilizada neste estudo está apresentada na Tabela 4.3. As concentrações de cada componente do sistema estão em % (p/p).

Tabela 4.3. Nomenclatura dos sistemas-modelo avaliados neste estudo com a especificação das concentrações de cada componente em % (p/p).

Sistemas puros	
CR03	Solução pura de carragena contendo 0,3 % (p/p)
CR05	Solução pura de carragena contendo 0,5 % (p/p)
CR08	Solução pura de carragena contendo 0,8 % (p/p)
Sistemas mistos contendo carragena e caseinato de sódio	
CR03CS2	Mistura contendo 0,3% de carragena e 2% de caseinato de sódio
CR03CS5	Mistura contendo 0,3% de carragena e 5% de caseinato de sódio
CR03CS8	Mistura contendo 0,3% de carragena e 8% de caseinato de sódio
CR05CS2	Mistura contendo 0,5% de carragena e 2% de caseinato de sódio
CR05CS5	Mistura contendo 0,5% de carragena e 5% de caseinato de sódio
CR05CS8	Mistura contendo 0,5% de carragena e 8% de caseinato de sódio
CR08CS2	Mistura contendo 0,8% de carragena e 2% de caseinato de sódio
CR08CS5	Mistura contendo 0,8% de carragena e 5% de caseinato de sódio
CR08CS8	Mistura contendo 0,8% de carragena e 8% de caseinato de sódio
Sistemas mistos contendo carragena e isolado protéico de soro	
CR03IP05	Mistura contendo 0,3% de carragena e 0,5% de isolado protéico de soro
CR03IP3	Mistura contendo 0,3% de carragena e 3% de isolado protéico de soro
CR03IP7	Mistura contendo 0,3% de carragena e 5% de isolado protéico de soro
CR03IP7	Mistura contendo 0,3% de carragena e 7% de isolado protéico de soro
CR05IP05	Mistura contendo 0,5% de carragena e 0,5% de isolado protéico de soro
CR05IP3	Mistura contendo 0,5% de carragena e 3% de isolado protéico de soro
CR05IP7	Mistura contendo 0,5% de carragena e 5% de isolado protéico de soro
CR05IP7	Mistura contendo 0,5% de carragena e 7% de isolado protéico de soro
CR08IP05	Mistura contendo 0,8% de carragena e 0,5% de isolado protéico de soro
CR08IP3	Mistura contendo 0,8% de carragena e 3% de isolado protéico de soro
CR08IP5	Mistura contendo 0,8% de carragena e 5% de isolado protéico de soro
CR08IP7	Mistura contendo 0,8% de carragena e 7% de isolado protéico de soro
Sistemas contendo carragena e adicionados de sacarose	
CR03SC5	Mistura contendo 0,3% de carragena e 5% de sacarose
CR03SC15	Mistura contendo 0,3% de carragena e 15% de sacarose
CR03SC30	Mistura contendo 0,3% de carragena e 30% de sacarose
CR05SC5	Mistura contendo 0,5% de carragena e 5% de sacarose
CR05SC15	Mistura contendo 0,5% de carragena e 15% de sacarose
CR05SC30	Mistura contendo 0,5% de carragena e 30% de sacarose
CR08SC5	Mistura contendo 0,8% de carragena e 5% de sacarose
CR08SC15	Mistura contendo 0,8% de carragena e 15% de sacarose
CR08SC30	Mistura contendo 0,8% de carragena e 30% de sacarose

2.2.2. Análises reológicas em cisalhamento dinâmico

As propriedades reológicas a baixas deformações foram determinadas em um reômetro de tensão controlada, cujo controle de temperatura é feito por sistema Peltier (Carri-Med CSL² 500, TA Instruments, New Castle, EUA). As análises reológicas para avaliação da gelificação da carragena foram realizadas utilizando uma geometria cone e placa de acrílico com 6 cm de diâmetro e um ângulo de 2°. Já para a avaliação do processo de desnaturação e detecção do início de formação de estrutura de soluções de isolado protéico foi utilizada uma geometria cone e placa de aço inoxidável de 4 cm de diâmetro e um ângulo de 1°59'.

A completa descrição dos ensaios reológicos realizadas será mostrada a seguir.

A) Processo de desnaturação e formação de estrutura de isolado protéico de soro

As soluções puras de isolado protéico de soro (10% p/p) foram preparadas conforme seção 2.2.1 B e as soluções mistas foram preparadas conforme seção 2.2.1 C, porém foi realizado somente um tratamento térmico à temperatura de 40°C por 45 min, para a completa homogeneização da solução. As soluções à 40°C foram colocadas na placa inferior do reômetro, a qual também estava na mesma temperatura. As amostras foram cobertas com uma camada fina de silicone de baixa viscosidade para prevenir a perda de umidade e ressecamento durante os experimentos.

A varredura de temperatura foi realizada entre 40 e 95°C em uma taxa de aquecimento de 1°C/min para a promover a parcial desnaturação e formação de estrutura, à frequência constante de 0,1 Hz. Os dados obtidos foram avaliados através de Figuras de Lissajous (gráfico das senóides da variável de entrada (perturbação) em função da de saída (resposta do sistema à perturbação)) para assegurar que foram medidos dentro do intervalo de viscoelasticidade linear.

A partir dos dados de G' (módulo de armazenamento) foi possível avaliar a temperatura de início de formação da rede do gel, pois esta foi considerada como o ponto em que G' ou G^* (Equação 1) começou a mudar bruscamente, deixando a linha base (SAVOIE & ARNTFIELD, 1996). A fim de melhor visualizar este evento, foi avaliada a variação no módulo complexo (G^*), em função da temperatura (dG^*/dT), pois neste caso a alteração na inclinação é mais pronunciada. A temperatura de início de desenvolvimento da estrutura (T_s) foi definida arbitrariamente como o ponto em que dG^*/dT era maior que 0,1 Pa/°C (TAKEUCHI, 2003; CHRIST et al., 2005).

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (1)$$

onde: G' e G'' são os módulos elástico e viscoso, respectivamente.

B) Processo de gelificação: varredura de temperatura

Após o tratamento térmico e resfriamento das misturas em banho de gelo de acordo com a seção 2.2.1 C, estas foram colocadas na placa inferior do reômetro, a qual estava na temperatura de 50°C de maneira a evitar que ocorresse a gelificação antes do início da varredura de temperatura. A amostra em

análise foi protegida da perda de umidade e ressecamento da superfície, utilizando uma placa de acrílico recobrimo a geometria e denominada de “solvent-trap”. Uma varredura de temperatura foi realizada entre 50 e 5°C em uma taxa de resfriamento de 1°C/min, à frequência constante de 0,1 Hz, avaliada em uma tensão dentro do intervalo de viscoelasticidade linear de acordo com as figuras de Lissajous. A temperatura de início de formação da rede do gel foi determinada sob as mesmas considerações do item anterior.

As curvas de G^* em função da temperatura durante a varredura de temperatura para os géis puros de κ -carragena mostraram duas inclinações, o início da primeira inclinação correspondeu ao ponto de início de desenvolvimento de estrutura e foi determinada conforme item 2.2.2 A. Já a temperatura de início da segunda inclinação foi determinada através da intersecção entre as duas máximas tangentes na região anterior e posterior à inclinação analisada.

C) Estabilização da rede do gel: varredura isotérmica a 5°C

Após o processo de resfriamento foi realizada uma varredura isotérmica mantendo a temperatura a 5°C por 30 min, com frequência de 0,1 Hz e tensão dentro do intervalo linear, de maneira que o sistema alcançasse o equilíbrio de propriedades reológicas.

A partir desse ensaio foram obtidas as cinéticas de primeira ordem (Equação 2) de fortalecimento da elasticidade da rede do gel (aumento de G') em função do tempo, na temperatura de 5°C para as amostras que não alcançaram o equilíbrio durante o resfriamento.

$$G'(t) = G_0 + A \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (2)$$

onde: G' é o módulo elástico avaliado em função do tempo (t em min) durante a varredura isotérmica (5°C); G_0 é módulo elástico no equilíbrio (Pa), k é a taxa de aumento de G' durante o processo de formação da rede do gel (min^{-1}) e A é um parâmetro de ajuste (Pa).

D) Espectro mecânico: varredura de frequência

Após a estabilização da rede foi realizada uma varredura de frequência, também dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, entre 0,01 e 10 Hz na temperatura de 5°C , para a avaliação de G' e G'' em função da frequência.

2.3. Análise estatística

As diferenças entre os resultados de temperatura de início de desenvolvimento de estrutura (T_s) dos diversos tratamentos foram avaliadas através do procedimento de Tukey usando o software Statistica v. 5.5 (STATSOFT INC., 2000) com 95% de confiança.

A obtenção de um modelo de primeira ordem de três parâmetros (Equação 3) para correlacionar as variáveis independentes, concentrações de κ -carragena e IPS ou sacarose e sua resposta (T_s) foi avaliado através do módulo de ajuste não-linear (*nonlinear estimation*) usando o software Statistica v. 5.5 (STATSOFT INC., 2000). O coeficiente de determinação (r^2) foi utilizado para avaliar a eficiência do ajuste.

$$T_s = a + b \cdot [X_1] + c \cdot [X_2] \quad (3)$$

onde a , b e c são os coeficientes da regressão do modelo e X_1 e X_2 são as variáveis independentes, ou seja, a concentração de κ -carragena, IPS ou sacarose, respectivamente.

3. Resultados e discussão

Neste trabalho foram avaliados os processos de gelificação de géis puros de κ -carragena e de sistemas mistos adicionados de caseinato de sódio ou isolado protéico de soro de leite ou ainda sacarose. O processo de gelificação foi dominado pela carragena, visto que as soluções puras de caseinato de sódio e isolado protéico de soro não gelificaram nas condições de pH 6,7 e concentrações estudadas. A influência de cada um dos componentes adicionado foi avaliada durante o processo de gelificação da κ -carragena e após a formação do gel.

3.1. Influência da concentração da κ -carragena e adição de sacarose ou proteínas do leite no processo de gelificação

3.1.1. Efeito da concentração da κ -carragena no processo de gelificação

Os perfis reológicos típicos do desenvolvimento do módulo complexo (G^*) durante o resfriamento (transição do estado sol para gel) de soluções de κ -carragena nas concentrações de 0,3 a 0,8% (p/p) estão mostrados na Figura 4.1.

O processo de gelificação da κ -carragena (CR) induzida pelo abaixamento da temperatura está relacionado ao fato de que este polissacarídeo, em solução e

em altas temperaturas, adota a conformação enovelada aleatória. Durante o abaixamento da temperatura, ocorre a associação das cadeias através da ordenação de sua estrutura e formação de duplas hélices, favorecidas em presença de determinados cátions (K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Na^+ , Ca^{2+} , etc.). A proporção de hélices agregadas aumenta com a concentração de íons (PICULELL, 1995; PICULELL et al., 1997; VIEBKE et al., 1998), pois estes reduzem a densidade de carga ao longo das cadeias, promovendo a auto-associação das hélices e resultando na formação de gel (HOSSAIN et al., 2001; PELLETIER et al., 2001). A carragena utilizada para o preparo das soluções possui uma determinada carga iônica (Tabela 4.1), que pareceu exercer maior influência no processo de gelificação nas maiores concentrações de polissacarídeo, devido a maior quantidade de encontros efetivos entre as macromoléculas disponíveis para formar o gel. De fato, pode-se observar na Figura 4.1 que o aumento de G^* ocorreu em temperaturas mais elevadas para as maiores concentrações de carragena.

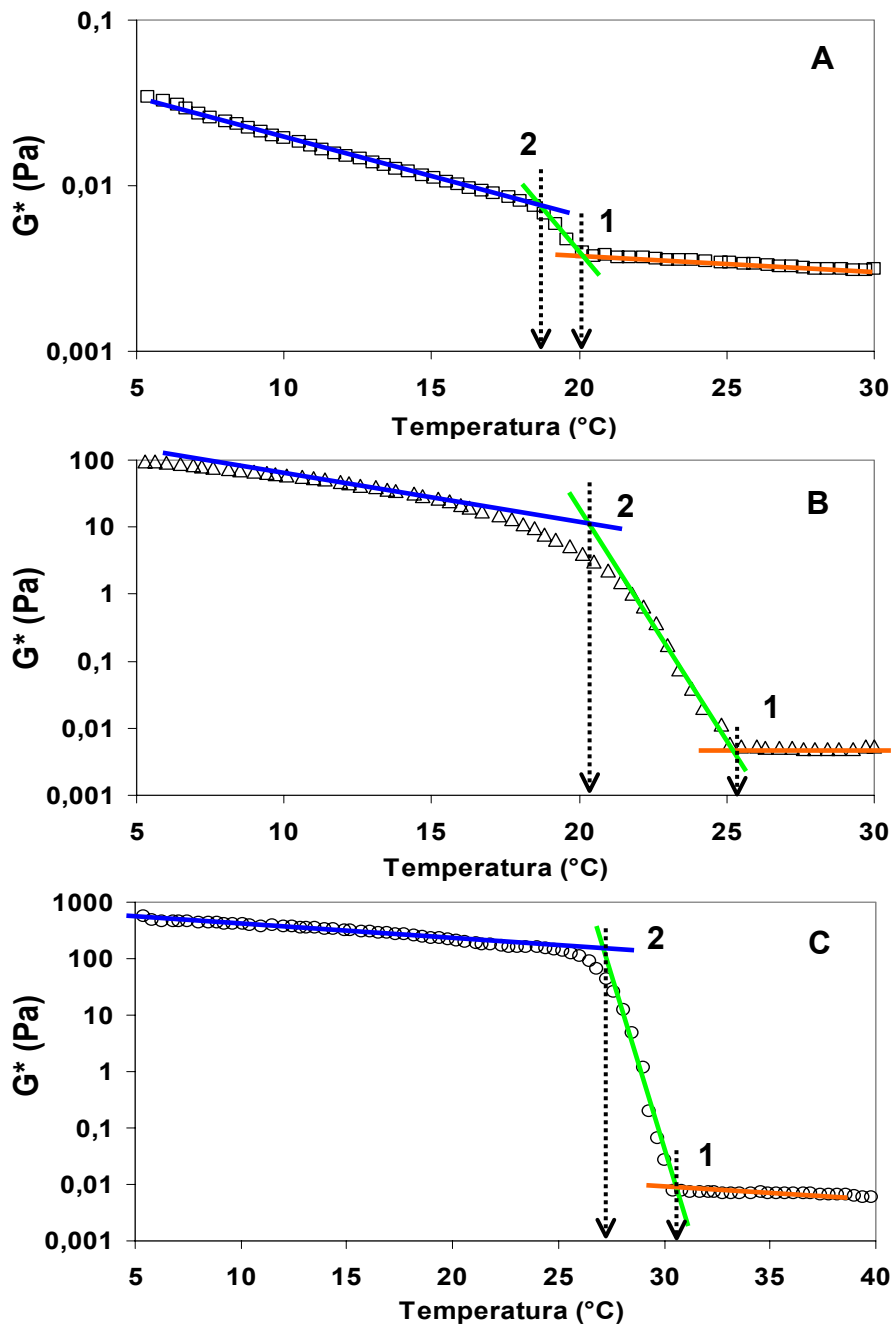


Figura 4.1. Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação da κ -carragena nas concentrações de (A) 0,3, (B) 0,5 e (C) 0,8% p/p induzida por resfriamento em uma taxa de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Nas figuras pode-se observar duas inclinações, identificadas por (1) e (2) correspondendo à primeira e segunda transição, respectivamente.

Durante o processo de gelificação de soluções aquosas de κ -CR, a curva de G^* em função da temperatura mostrou duas inclinações diferentes (Figura 4.1 A, B e C), o que poderia ser atribuído à ocorrência do processo em duas etapas. A primeira e mais inclinada está associada à formação das duplas hélices (interações intramoleculares) e a segunda à associação destas hélices. Um acentuado efeito da concentração de carragena na temperatura de início da formação de estrutura (T_s) foi observado, pois maiores concentrações levaram a uma maior T_s , ou seja, a temperatura variou de 20 a 30,4°C para os géis contendo 0,3 e 0,8% (p/p) de carragena, respectivamente (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Valores das temperaturas de início de desenvolvimento de estrutura (T_s) nas duas etapas da formação dos géis de κ -carragena (0,3 a 0,8% p/p).

κ -carragena (% p/p)	Transição	T_s (°C)
0,3	1	20
	2	18,5
0,5	1	25,1
	2	20,5
0,8	1	30,4
	2	27,3

Em menores concentrações de carragena, a temperatura de início de agregação é menor que nas concentrações mais elevadas, uma vez que a frequência de choques moleculares é menor. Assim, uma diminuição da temperatura promove um aumento da viscosidade facilitando a agregação dos sistemas com menor densidade molecular. Também é interessante observar que nas mais altas concentrações, os valores de G^* tendem ao equilíbrio a 5°C,

enquanto que na menor concentração após o resfriamento o gel ainda estava em formação.

3.1.2. Efeito da adição de sacarose no processo de gelificação da κ -carragena

A influência da adição de sacarose na faixa de concentração de 5 a 30% (p/p) no processo de gelificação da carragena e na temperatura de início da formação de estrutura pode ser observada nas Figuras 4.2 (A, B e C) e Figura 4.3, respectivamente.

Para os géis mistos contendo 0,3% de carragena, a adição de sacarose favoreceu o módulo complexo (G^*) através do aumento do caráter elástico (G') dos géis em relação ao gel puro (Figura 4.2 A). Já para os géis contendo 0,5% essa tendência não foi observada, pois um maior valor de G^* para maiores concentrações de sacarose foi observado apenas no início do processo de gelificação, o qual tendeu a um mesmo valor de G^* após a formação do gel (Figura 4.2 B).

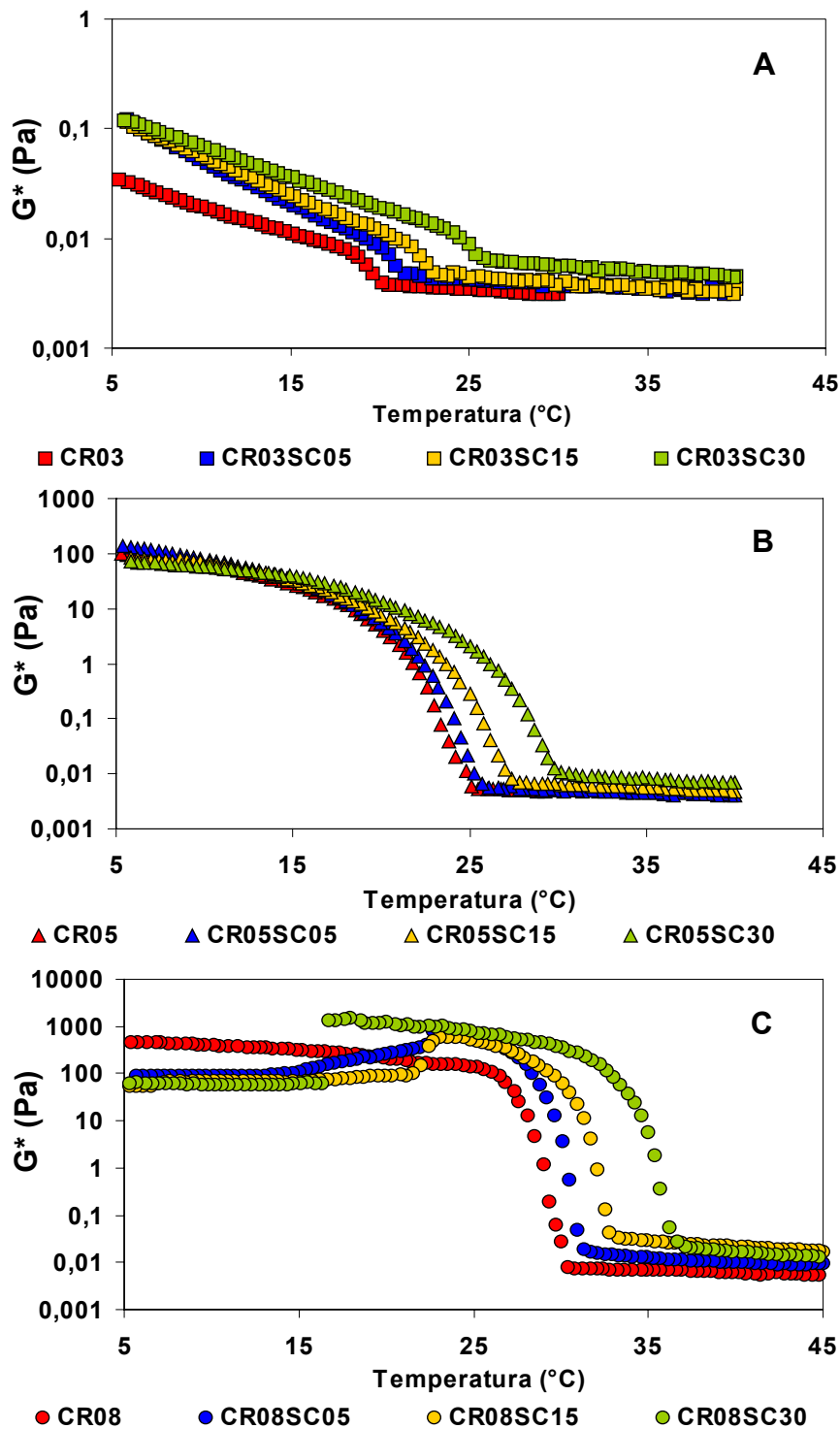


Figura 4.2. Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3; (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) induzida por resfriamento e adicionados de sacarose (SC) em concentração de 5, 15 e 30% (p/p).

Interessantes resultados foram obtidos para os géis contendo 0,8% de carragena, pois a adição de sacarose deslocou o início da gelificação para maiores temperaturas como ocorreu com 0,3 e 0,5% de polissacarídeo. No entanto, após a formação dos géis mistos, estes apresentaram uma brusca diminuição do valor de G^* , provavelmente provocado pela reorganização da rede do gel. Ould-Eleya & Turgeon (2000b) também observaram um valor máximo para G' e depois uma queda para soluções puras de κ -carragena e misturas com β -lactoglobulina nativa. Estes autores concluíram que o efeito não foi provocado por escorregamento, porque a resposta oscilatória permaneceu senoidal, mas devido à parcial ruptura da estrutura fina formada durante a agregação. No presente estudo, os géis também se apresentavam no intervalo linear de perturbação visto que as respostas eram senoidais. Baussay et al. (2006) também observaram esse fenômeno para misturas de κ -carragena e β -lactoglobulina, com adição de KCl e NaCl, mas não para soluções puras de carragena. Neste caso, os autores relataram que o máximo valor de G' e G'' próximo à temperatura crítica de formação do gel e posterior queda, ocorreu devido a um efeito na interface com a geometria de medida, embora também tenha sido observada uma perfeita resposta senoidal. A partir destas observações, acredita-se que esta queda no módulo elástico estaria associada a uma pequena exsudação de líquido ou um pequeno descolamento da amostra com a geometria de medida provocado pelo encolhimento do gel.

A temperatura de início da formação do gel mostrou um aumento de cerca de 5°C com a adição de 30% (p/p) de sacarose em relação ao gel puro ($p < 0,05$)

para todas as concentrações de carragena, como pode ser observado na Figura 4.3. Provavelmente, isto se deve à diminuição das ligações de hidrogênio entre a carragena e água, pois a sacarose é altamente hidrofílica (presença dos grupos hidroxila) e disputa a água presente no sistema. Assim, uma maior interação macromolecular ocorre, favorecendo o processo de gelificação (SALAZAR-MONTOYA et al., 2002), além da presença dos grupos hidroxila da sacarose também ajudam a estabilizar a estrutura da rede do gel ou as zonas de junção da κ -carragena (BAYARRI et al., 2004), mas a adição excessiva de açúcares imobiliza a água livre, necessária para a formação de zonas de junção (NISHINARI et al., 1995).

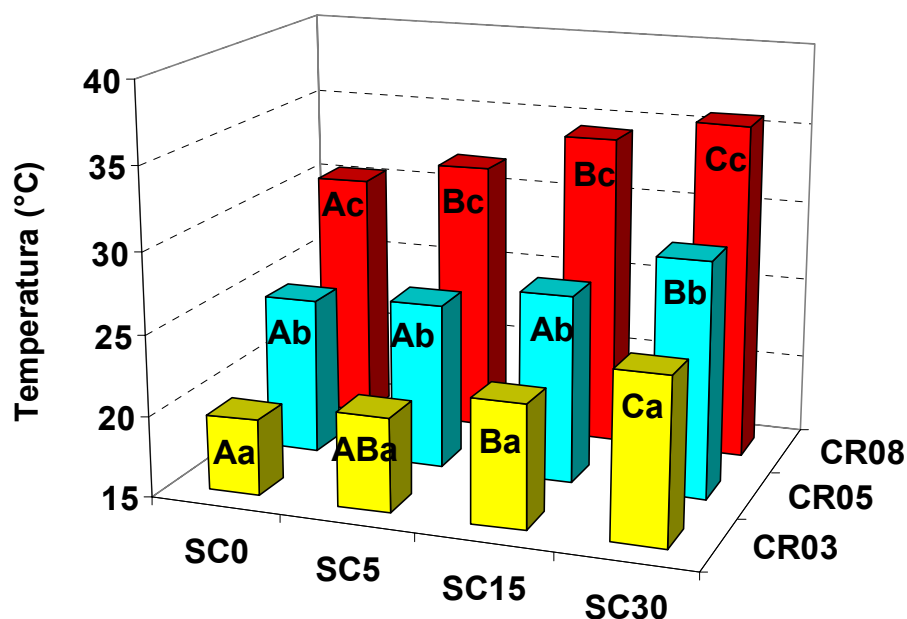


Figura 4.3. Efeito da concentração de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e sacarose - SC (5 a 30% p/p) no comportamento da temperatura de início do processo de gelificação (T_g). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de sacarose.

A avaliação da Figura 4.4 permite observar uma relação entre a temperatura de início de desenvolvimento de estrutura (T_s) em função das concentrações de carragena e sacarose, dada pela Equação 4, onde se observa uma forte contribuição do polissacarídeo sobre o início do processo de gelificação.

$$T_s = 13,70 + 20,68.[CR] + 0,18.[SC] \quad (4)$$

onde: [CR] e [SC] são as concentrações de carragena e sacarose em % (p/p), respectivamente. O coeficiente de determinação (r^2) da equação foi de 0,98.

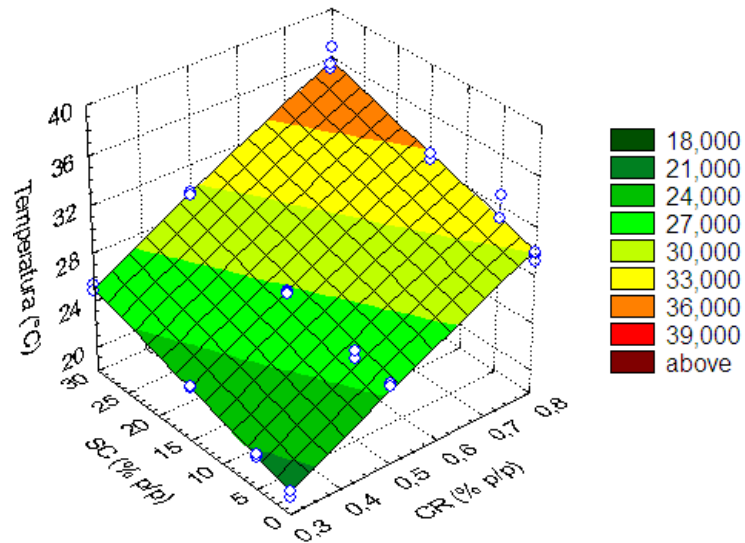


Figura 4.4. Avaliação do efeito das concentrações de carragena (0,3 a 0,8% p/p) e sacarose (5 a 30% p/p) na temperatura de início de desenvolvimento de estrutura (T_s).

3.1.3. Efeito da adição de isolado protéico de soro no processo de gelificação da κ -carragena

A) Efeito da concentração de κ -carragena no processo de formação de estrutura de soluções de IPS

O isolado protéico de soro (IPS) é uma proteína globular, que é facilmente desnaturada pela temperatura, podendo formar agregados solúveis e até mesmo géis, dependendo da concentração no sistema e condições do meio. Nesse estudo realizou-se um tratamento térmico de 70°C durante 30 min na mistura de IPS (0,5, 3, 5 e 7% p/p) e carragena, o qual poderia permitir uma maior interação entre os biopolímeros, pois a carragena se encontrava no estado enovelado e a proteína parcialmente desnaturada. De forma a avaliar se houve formação de estrutura durante o tratamento térmico foi realizada a avaliação reológica das misturas IPS-carragena no aquecimento entre 40 e 95°C.

A partir da avaliação dos resultados obtidos de G^* em função da temperatura foi possível obter a temperatura de início de formação de estrutura (Figura 4.5). Pode-se observar que a menor temperatura de início de desenvolvimento de estrutura foi de cerca de 74°C para a concentração de 0,8% (p/p) de carragena, valor superior à temperatura de tratamento térmico. Assim, provavelmente não ocorreu a formação de gel durante o preparo das misturas de IPS e carragena, mesmo porque a concentração de IPS usada nos sistemas mistos era menor (de 0,5 a 7% p/p) e portanto, a T_s seria maior que as obtidas nestas medidas reológicas.

A concentração utilizada nesse estudo foi de 10% (p/p) porque para soluções contendo 7% (p/p) de IPS não foi possível determinar a T_s por meio desta técnica, visto que a estrutura formada era muito frágil. Se houve a formação de uma rede a partir da desnaturação do IPS em presença de carragena, os géis mistos contendo IPS poderiam ser formados por duas redes, possivelmente interpenetrantes, uma de carragena no resfriamento e outra de IPS no tratamento térmico.

Apesar de não ter sido observada a formação de estrutura mensurável por reologia, o tratamento térmico realizado pode ter levado à formação de agregados solúveis ou mesmo uma débil interação das proteínas com a carragena.

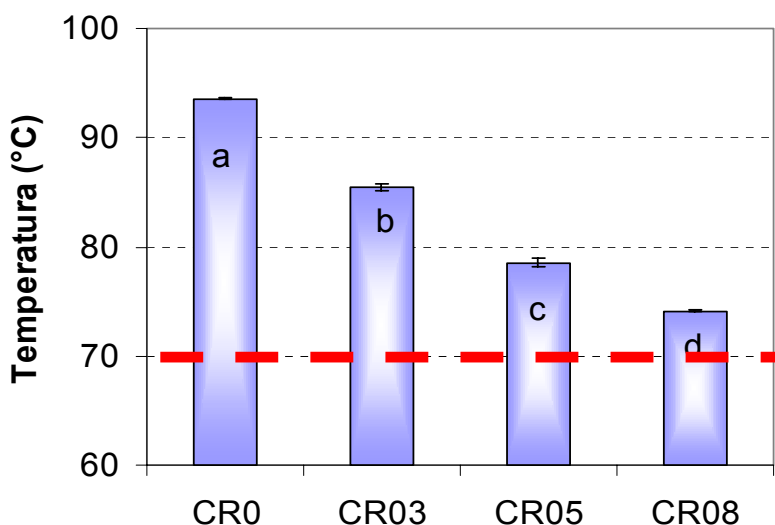


Figura 4.5. Comportamento da temperatura de início de formação de estrutura (T_s) de soluções de isolado protéico de soro a 10% (p/p) puro ou com adição de 0,3 a 0,8% (p/p) de carragena (CR). Letras diferentes indicam temperaturas estatisticamente diferentes em relação à variação da concentração de carragena ($p < 0,05$).

A presença de polissacarídeos no processo de desnaturação térmica das proteínas poderia promover o impedimento estérico, especialmente em condições de repulsão com a proteína (pH acima do pI e polissacarídeo aniônico). Nestas condições, a proteína desnaturada não se agregaria devido ao bloqueio dos sítios hidrofóbicos presentes na superfície da cadeia (IBANOGLU, 2006; de la FUENTE et al., 2004), pois a temperatura de formação de estrutura diminuiu com o aumento da concentração de polissacarídeo, mas não parece ter sido o caso observado nesse estudo. No entanto, a complexação de uma proteína globular com um polissacarídeo pode alterar a estrutura da proteína e promover a diminuição da estabilidade térmica desta (IMESON et al., 1977), o que poderia ser associado à diminuição da T_s com o aumento da concentração da carragena.

Capron et al. (1999a-b) avaliaram o efeito da κ -carragena no processo de desnaturação e agregação da β -lactoglobulina durante o tratamento térmico na faixa de temperatura de 60 a 80°C por até 1000 min. Estes autores relataram que a primeira etapa da agregação da β -lactoglobulina não foi alterada pela presença de κ -carragena, mas ocorreu uma aceleração do processo de gelificação da proteína em uma segunda etapa. Foi observada também uma micro-separação de fases, porém, assim que a rede de proteína foi formada, a gelificação prevaleceu sobre a separação de fases e o sistema estabilizou-se. No caso do presente estudo, este fato se refletiu em uma menor temperatura de início do desenvolvimento de estrutura detectado pelos ensaios sob cisalhamento oscilatório.

B) Efeito da adição de isolado protéico de soro no processo de gelificação da κ -carragena.

O aumento da concentração de IPS favoreceu a formação do gel misto para as concentrações de carragena avaliadas (0,3 a 0,8% p/p), como está mostrado na Figura 4.6. Comparando-se com a adição de sacarose (Figura 4.2), observa-se que a formação da rede elástica ocorreu de uma forma muito mais pronunciada. Para os géis contendo 0,3% de carragena, o aumento da concentração de IPS promoveu a formação de uma rede mais elástica. Já para os géis contendo 0,5% de CR, em concentrações de 5 e 7% de IPS pareceu ter ocorrido um leve efeito de escorregamento ou encolhimento do gel, diminuindo o valor do módulo de armazenamento (G'). Este efeito predominou nos géis contendo 0,8% de carragena e foi mais pronunciado com o aumento da concentração das proteínas do soro.

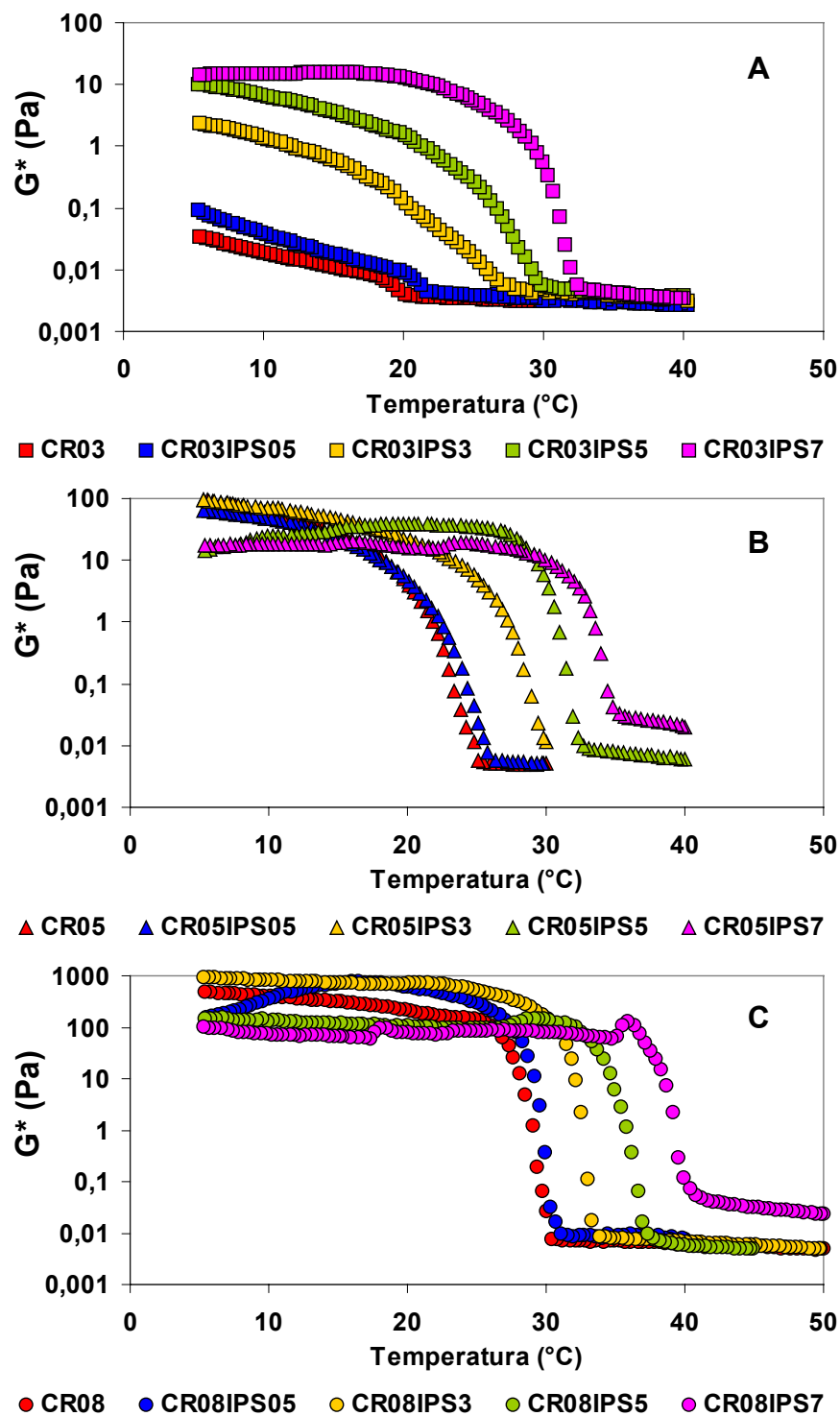


Figura 4.6. Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3; (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) induzida por resfriamento e adicionados de isolado protéico de soro (IPS) em concentração de 0,5; 3; 5 e 7% (p/p).

Os efeitos sinérgicos entre a κ -carragena e as proteínas globulares desnaturadas foram confirmados por vários estudos usando ensaios reológicos (NEISER et al., 2000; OULD ELEYA & TURGEON, 2000a; OULD ELEYA & TURGEON, 2000b; TZIBOULA & HORNE, 1999b). Ould Eleya & Turgeon (2000 a, b) avaliaram a mistura de κ -carragena complexada com K^+ na presença de β -lactoglobulina utilizando testes reológicos e relataram que uma sinergia foi observada em condições que ambos biopolímeros gelificavam (em pH próximo à neutralidade). Esta sinergia foi considerada como consequência de duas redes co-contínuas ou interpenetrantes, resultante da separação de fases segregativa antes da gelificação ocorrer. Neiser et al. (2000) também observaram esse fenômeno para sistemas contendo albumina sérica bovina e κ -carragena- K^+ , os quais foram confirmados através de micrografias de transmissão de elétrons (TEM).

O efeito da adição de IPS em géis de carragena na temperatura de início da formação do gel foi significativo para a maioria das dispersões avaliadas ($p < 0,05$), como pode ser observado na Figura 4.7. O efeito da concentração de IPS na T_s foi muito maior que o da sacarose (Figura 4.3) e tão pronunciado como o da carragena (Figura 4.1), dentro dos intervalos de concentrações estudados.

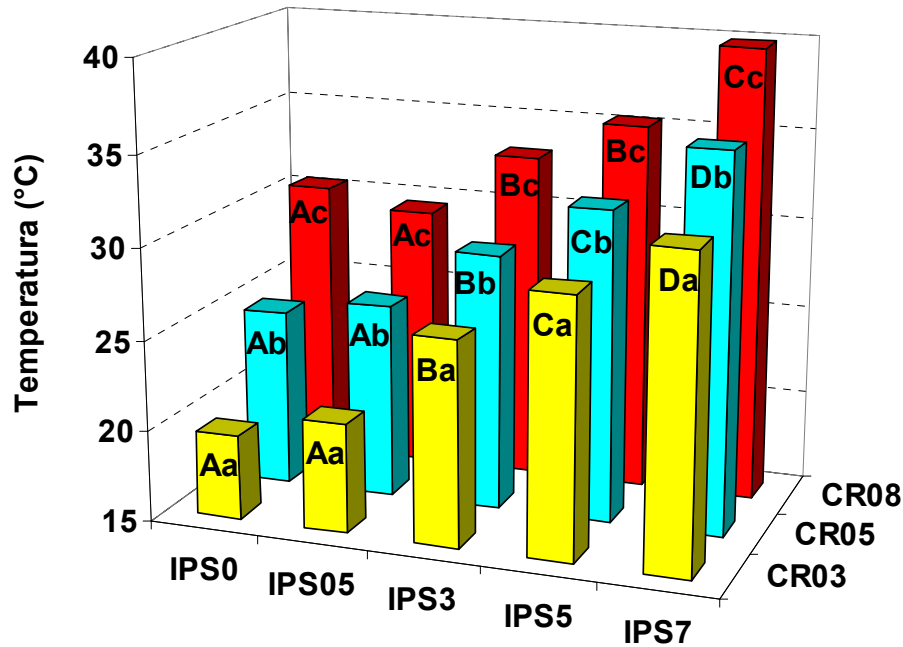


Figura 4.7. Efeito da concentração de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e isolado protéico de soro - IPS (0,5 a 7% p/p) no comportamento da temperatura de início do processo de gelificação (T_s). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de isolado protéico de soro.

A avaliação da Figura 4.8 permite observar uma relação entre a temperatura de início de desenvolvimento de estrutura (T_s) em função das concentrações de carragena e isolado protéico de soro, dada pela Equação 5:

$$T_s = 16,83 + 14,96.[CR] + 1,52.[IPS] \quad (5)$$

onde: [CR] e [IPS] são as concentrações de carragena e isolado protéico de soro em % (p/p), respectivamente. O coeficiente de determinação (r^2) da equação foi de 0,97.

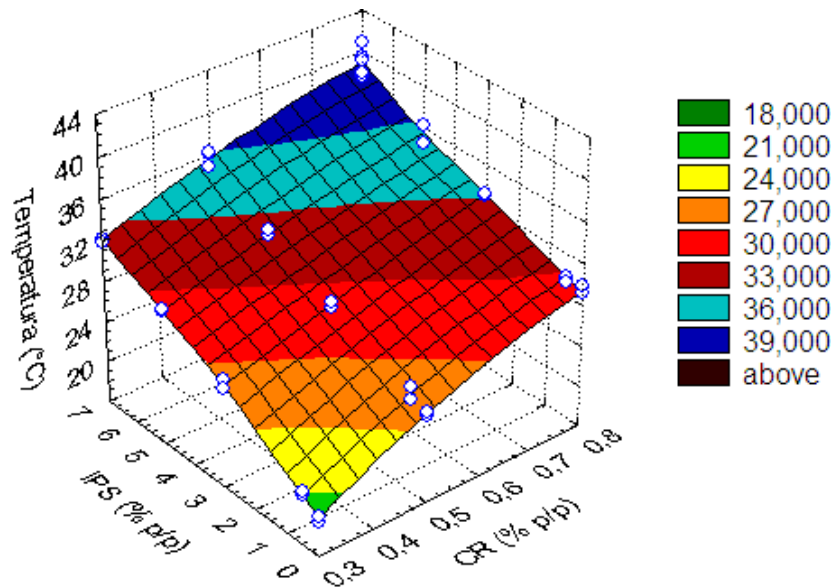


Figura 4.8. Avaliação do efeito das concentrações de carragena (0,3 a 0,8% p/p) e isolado protéico do soro (0,5 a 7% p/p) na temperatura de início de desenvolvimento de estrutura (T_s).

Baussay et al. (2006) relataram que em altas concentrações de β -lactoglobulina nativa, foi observado um pequeno aumento da temperatura de gelificação da κ -carragena com o aumento da concentração de proteína (acima de 70 g/L), também avaliado por reologia oscilatória. No entanto, estes resultados mostraram que o aumento da concentração de proteína levaram a um forte acréscimo de T_s (Figura 4.7 e 4.8), pois o tratamento térmico pode ter proporcionado interações entre os biopolímeros.

3.1.4. Efeito da adição de caseinato de sódio no processo de gelificação da κ -carragena

Os perfis reológicos típicos do desenvolvimento do módulo complexo (G^*) durante o resfriamento (transição do estado sol para gel) para os sistemas mistos formados por κ -carragena e caseinato de sódio (2, 5 e 8% p/p) estão mostrados na Figura 4.9 A, B e C, para as concentrações de κ -carragena de 0,3; 0,5 e 0,8% (p/p), respectivamente.

Como uma tendência geral, a adição de até 5% (p/p) de caseinato de sódio em soluções de κ -carragena promoveu um aumento de G^* (Figuras 4.9 A, B e C) devido ao aumento do módulo elástico (G'). No entanto, o aumento da concentração de caseinato de 5 para 8% provocou um enfraquecimento da rede do gel, sendo este efeito antagônico mais pronunciado para as concentrações mais elevadas de carragena (0,5 e 0,8% p/p) (Figuras 4.9 A, B e C). Nestes casos, os géis mistos foram inclusive mais fracos que os géis puros de carragena.

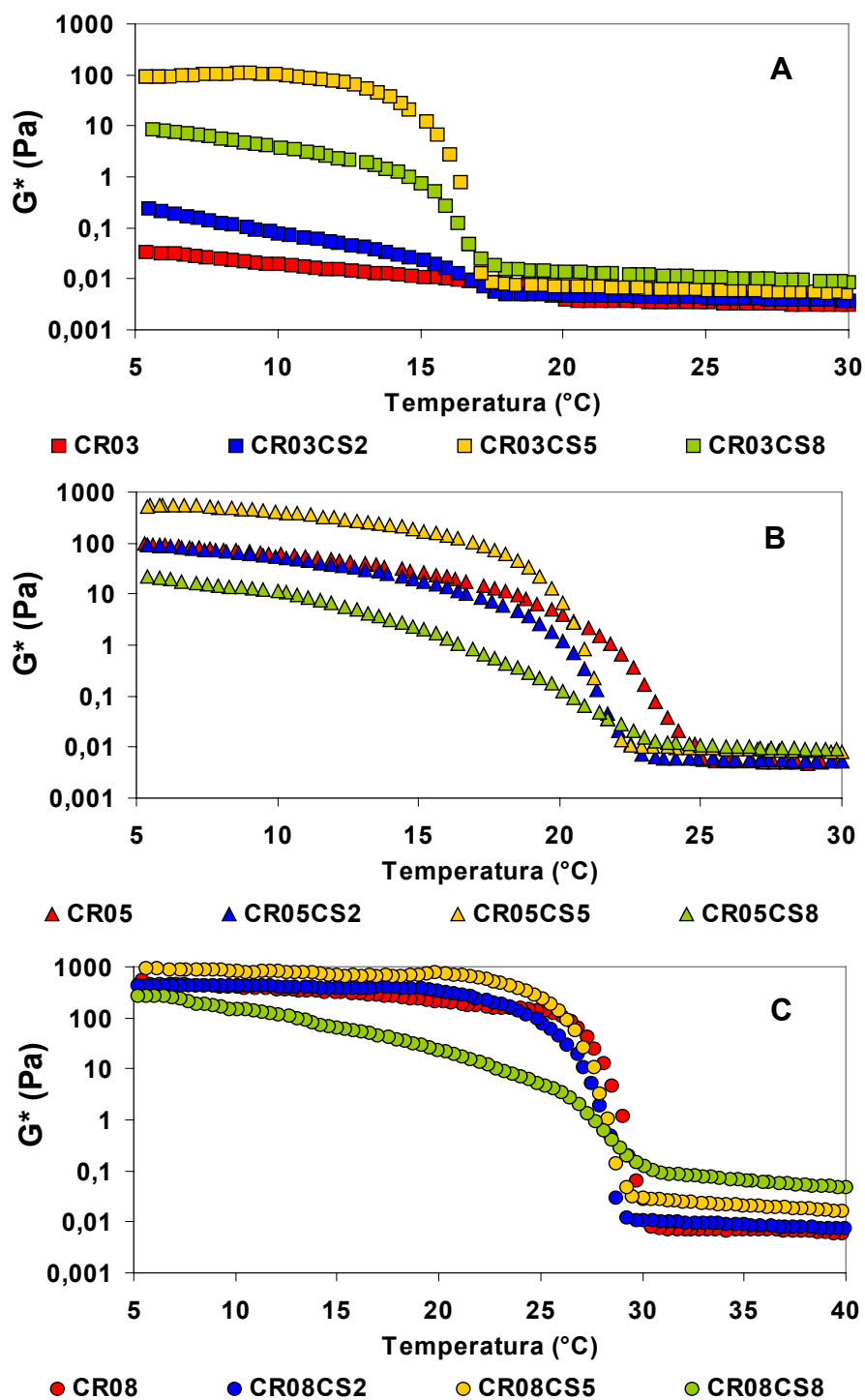


Figura 4.9. Comportamento do módulo complexo (G^* (Pa)) durante o processo de gelificação de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3; (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) induzida por resfriamento e adicionados de caseinato de sódio (CS) em concentração de 2, 5 e 8% (p/p).

A partir da avaliação de G^* em função da temperatura foi possível determinar a temperatura de início da formação de estrutura (T_s), que pode ser observada na Figura 4.10. Este parâmetro não foi influenciado pela presença de caseinato de sódio no intervalo de concentrações estudado (2 a 8% p/p), mas o aumento da concentração de carragena promoveu um grande aumento da temperatura de transição conformacional (T_s), como observado nos outros sistemas mistos. Provavelmente, o fenômeno de gelificação mista da carragena na presença de caseinato foi governado pelo polissacarídeo, mais evidente nas mais elevadas concentrações de biopolímeros. Este resultado é surpreendente, pois como observado nos demais sistemas mistos, a presença de outros componentes desloca a temperatura de transição a valores mais elevados. É possível que o aumento da concentração de caseinato tenha promovido uma ligação mais intensa com os sítios reativos da carragena, através de interações eletrostáticas favorecidas a altas temperaturas quando a carragena estava no estado desordenado (DALGLEISH & MORRIS, 1988).

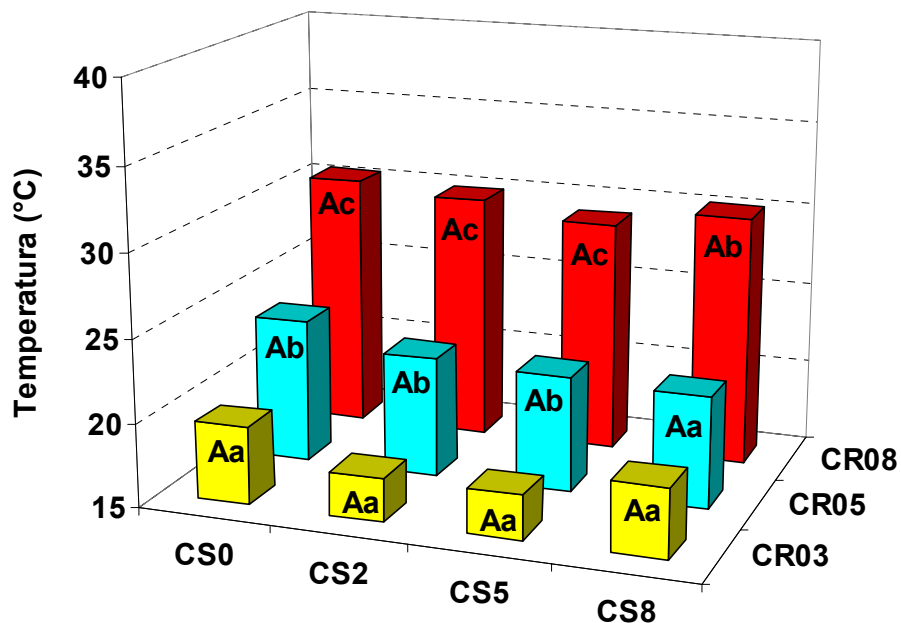


Figura 4.10. Efeito da concentração de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e caseinato de sódio - CS (2 a 8% p/p) no comportamento da temperatura de início do processo de gelificação (T_s). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de caseinato de sódio.

O efeito sinérgico demonstrado pela interação carragena-caseinato até certa concentração de proteína promoveu uma maior elasticidade da rede do gel mas não afetou a T_s , não interferindo na transição conformacional da carragena, mesmo estando ligada à macromolécula do polissacarídeo. Já o efeito antagônico entre esses biopolímeros, observado na maior concentração de proteína, provavelmente se deve ao excesso de proteína não ligada à carragena, o que levou a uma maior heterogeneidade e enfraquecimento da rede do gel. Este comportamento é favorecido em pH 6,7, pois o caseinato possui a carga predominantemente negativa, como a carragena, levando à incompatibilidade termodinâmica entre os dois biopolímeros.

As misturas de biopolímeros que apresentam cargas de sinais iguais, como é o caso da κ -carragena e caseinato de sódio em pH 6,7, apresentam interações termodinamicamente desfavoráveis à agregação, representada basicamente pelo efeito de exclusão de volume. Como resultado dessas interações, no qual está presente um polissacarídeo gelificante como a κ -carragena, a taxa de gelificação e o módulo elástico (G') dos géis mistos podem ser maiores e a concentração mínima para a gelificação pode se tornar menor, porque o efeito de exclusão de volume leva a uma maior concentração em relação a um mesmo volume, designado nesse estudo de “concentração virtual”. O efeito da separação de fases nas propriedades viscoelásticas de géis mistos de biopolímeros depende da força de adesão entre as partículas dispersas e a fase contínua, que podem contribuir para um forte efeito sinérgico ou antagônico (APPELQVIST & DEBET, 1997; GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; SANCHEZ et al., 1997; TOLSTOGUZOV, 1997; ZASYPKIN et al., 1997). Dessa forma, o aumento do G^* , associado ao aumento do caráter elástico durante a gelificação, provavelmente está associado apenas ao efeito de exclusão de volume da carragena, sendo que em maiores concentrações parece que o caseinato passa a interferir na continuidade da rede de carragena, enfraquecendo o gel (menores valores de G^*).

3.1.5. Discussão sobre o efeito da adição de sacarose ou proteínas do leite no processo de gelificação da κ -carragena

O efeito da concentração da κ -carragena na temperatura de início de formação de estrutura (T_s) refletiu a importância da densidade e mobilidade molecular para a formação da rede do gel, pois em baixas concentrações desse polissacarídeo a transição conformacional ocorreu mais lentamente que em maiores concentrações. Inclusive, em baixas concentrações de carragena foi possível observar mais claramente duas etapas no processo de gelificação, o que também ocorreu em maiores concentrações, porém em uma taxa muito mais elevada. Estas duas etapas foram identificadas como um primeiro processo de formação das hélices, seguido de uma fase de ordenação das cadeias, com menores alterações no módulo complexo (G^*). Além disso, foi observado que maiores concentrações de carragena levaram a uma maior temperatura de início da formação de estrutura (T_s), ocorrendo a gelificação em temperaturas mais elevadas.

O aumento da concentração de sacarose mostrou incremento da temperatura de início da formação do gel, de 3,9 a 4,3°C, para as concentrações de 0,3 e 0,8% de carragena, respectivamente. Este resultado, provavelmente está relacionado à diminuição das ligações de hidrogênio entre a carragena e água. Como a sacarose é altamente hidrofílica (presença dos grupos hidroxila) esta compete com a carragena pela água presente no sistema, promovendo um aumento das interações hidrofóbicas inter- e/ou intramoleculares. Dessa maneira, houve um aumento do módulo complexo (G^*) em relação ao gel puro em baixas

concentrações de carragena, porém em maiores concentrações deste polissacarídeo ocorreu uma diminuição do valor de G^* , provavelmente devido ao escorregamento ou descolamento da amostra com a geometria de medida.

O aumento da concentração de IPS em géis de carragena também levou a um aumento da temperatura de início da formação do gel (T_s), porém seu efeito foi maior que o da sacarose e tão pronunciado como o da carragena. De maneira similar à adição da sacarose, em baixas concentrações de carragena (0,3% p/p), o aumento da concentração de IPS promoveu a formação de uma rede mais elástica, porém com o aumento das concentrações do polissacarídeo e IPS observou-se também uma diminuição do valor do módulo de armazenamento (G') da rede do gel formado. Esta redução da elasticidade da rede pode estar relacionado a um efeito de escorregamento ou ainda à incompatibilidade termodinâmica entre estes biopolímeros.

A temperatura de início da formação de estrutura (T_s) não foi influenciada pela presença de caseinato de sódio no intervalo de concentrações estudado (2 a 8% p/p). No entanto, a adição de até 5% (p/p) de caseinato de sódio apresentou efeito sinérgico na elasticidade, mas uma maior concentração (8% p/p) provocou um enfraquecimento da rede do gel, sendo este efeito antagônico mais pronunciado para as concentrações mais elevadas de carragena (0,5 e 0,8% p/p). Neste caso, os géis mistos foram inclusive mais fracos que os géis puros de carragena. Este fato pode estar relacionado à interação eletrostática entre o polissacarídeo e essa proteína, pois o aumento gradativo da concentração de proteína levou à saturação dos sítios de interação, e em excesso promoveu a

heterogeneidade da rede em função das macromoléculas não ligadas, diminuindo a elasticidade do gel.

De maneira geral, a interação entre as proteínas do leite e a carragena mostrou um efeito sinérgico até uma certa concentração de biopolímeros, o que pode ter sido promovido pela formação de uma rede mista no caso de altas concentrações de isolado protéico de soro ou interação eletrostática da carragena e caseinato, levando a um aumento da elasticidade da rede. No entanto, a incompatibilidade termodinâmica entre estes biopolímeros em pH próximo ao neutro, provavelmente levou à micro-separação de fases, refletindo na diminuição da elasticidade do gel.

3.2. Varredura isotérmica de géis puros de κ -carragena e mistos: adição de sacarose ou proteínas

Após o processo de gelificação induzido pelo abaixamento da temperatura analisou-se o comportamento dos géis formados sob cisalhamento oscilatório através de varredura isotérmica a 5°C durante 30 min, de maneira que os parâmetros reológicos dos géis se estabilizassem, principalmente o módulo elástico (G'). A alteração de G' , após o alcance da temperatura final, possivelmente está associada ao processo de formação de novas interações, junções ou rearranjo das macromoléculas do sistema.

3.2.1. Estabilidade de géis puros de κ -carragena

Na Figura 4.11 pode-se observar que apenas os géis puros contendo 0,8% (p/p) de κ -carragena já se encontravam estabilizados após o resfriamento. Já para os géis com menores concentrações de biopolímeros, provavelmente ainda ocorre formação de novas interações devido à maior mobilidade molecular, o que fica mais evidente à medida que a concentração de carragena diminui (Figura 4.11). Esse processo de fortalecimento da rede do gel em baixas temperaturas (5°C), possivelmente é favorecido pelas ligações de hidrogênio, que são interações atrativas entre as moléculas de água e de carragena. Além disso, baixas temperaturas também enfraquecem as interações repulsivas eletrostáticas, mas favorecem a formação de complexos eletrostáticos devido à diminuição da força de origem entrópica que decresce a energia livre de Gibbs do sistema (DICKINSON, 1994; BRYANT & McCLEMENTS, 1998; WALSTRA, 2003).

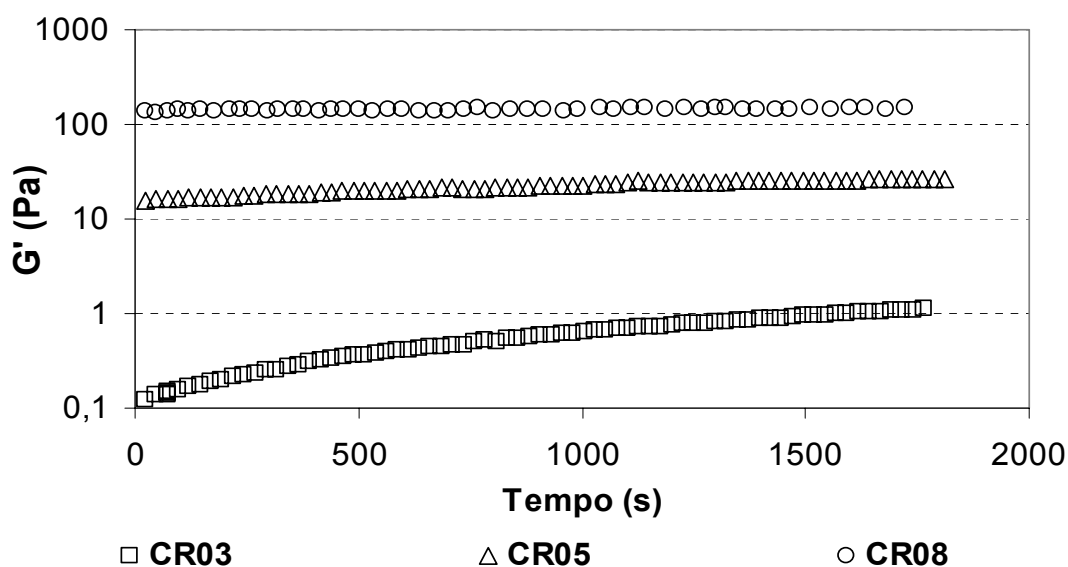


Figura 4.11. Comportamento do módulo elástico (G') de géis puros de κ -carragena (0,3, 0,5 e 0,8% p/p) durante a varredura isotérmica a 5°C, sob cisalhamento oscilatório.

3.2.2. Estabilidade de géis de κ -carragena adicionados de sacarose

Os géis contendo 0,3 e 0,5% de carragena não alcançaram o equilíbrio inclusive após 30 min de ensaio, não permitindo a avaliação do seu espectro mecânico (Figura 4.12). Já os géis contendo 0,8% (p/p) de carragena e sacarose (5 a 30% p/p) apresentaram forte efeito de escorregamento e não foram apresentados, visto que isto dificultou a repetibilidade dos resultados.

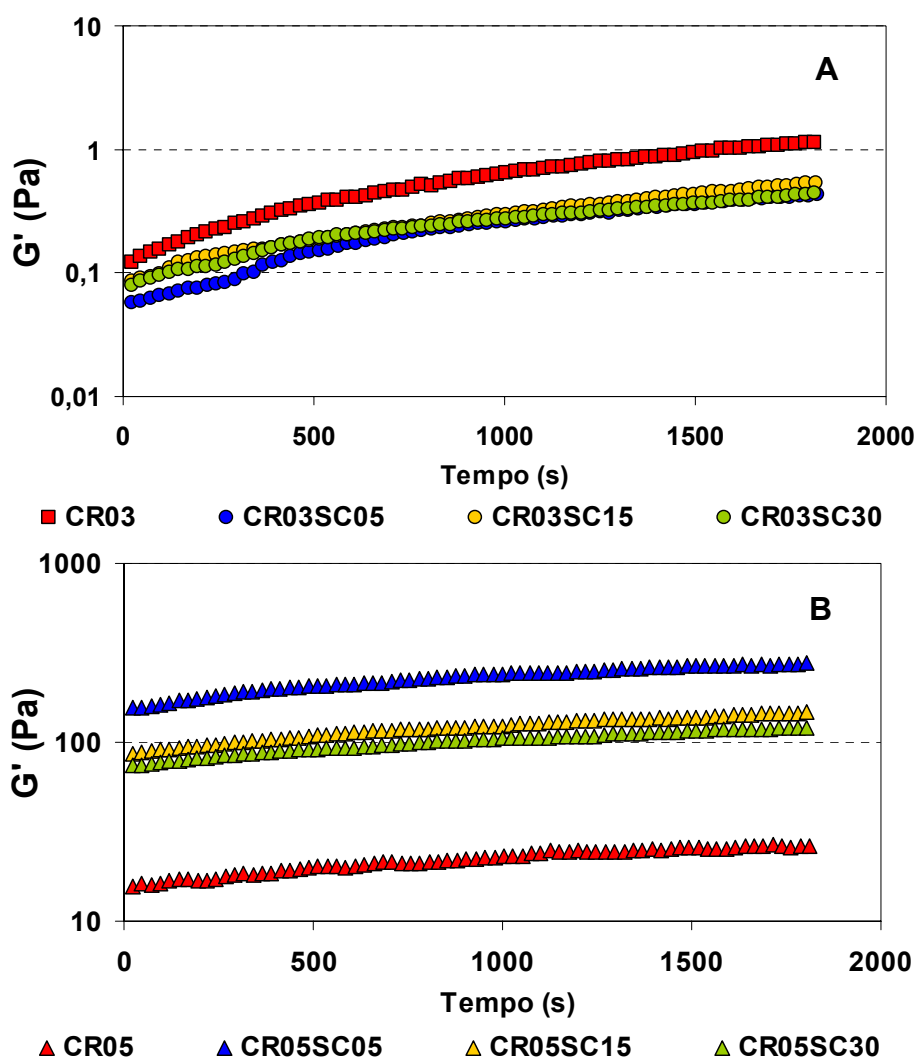


Figura 4.12. Comportamento do módulo elástico (G') durante a varredura isotérmica a 5°C , sob cisalhamento oscilatório de géis de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3 e (B) 0,5% (p/p) e adicionados de sacarose (SC) em concentração de 5, 15 e 30% p/p).

O efeito da sacarose no processo de gelificação e estabilização da rede do gel está associada à formação de ligações de hidrogênio com a água, promovendo a estabilização da estrutura das zonas de junção da carragena, mas o excesso da adição de sacarose pode reduzir a quantidade de água livre necessária para a formação das zonas de junção (NISHINARI et al., 1990) e aumentar as interações macromoleculares. Os resultados mostram que os géis adicionados de sacarose não apresentaram estabilização da rede do gel ainda após a varredura de temperatura em resfriamento e isotérmica a 5°C, provavelmente devido ao caráter dinâmico da formação e reorganização das ligações de hidrogênio entre a sacarose-água e polissacarídeo-água para alcançarem a melhor conformação termodinâmica de interações dos componentes macromoleculares.

3.2.3. Estabilidade de géis mistos de κ -carragena e isolado protéico de soro

A avaliação da estabilidade dos géis mistos carragena-IPS só foi possível nas menores concentrações de polissacarídeo (0,3 e 0,5% p/p) e de proteína, devido a um efeito de escorregamento ou encolhimento dos géis. Assim, os géis CR03IPS7, CR05IPS5, CR05IPS7, CR08IPS05, CR08IPS3, CR08IPS5 e CR08IPS7 ou os que apresentavam mais elevada concentração de macromoléculas não foram apresentados na Figura 4.13. Em relação aos sistemas que puderam ser avaliados, nota-se que com o aumento da concentração dos biopolímeros, o gel ficou mais forte e não se evidenciou incompatibilidade termodinâmica.

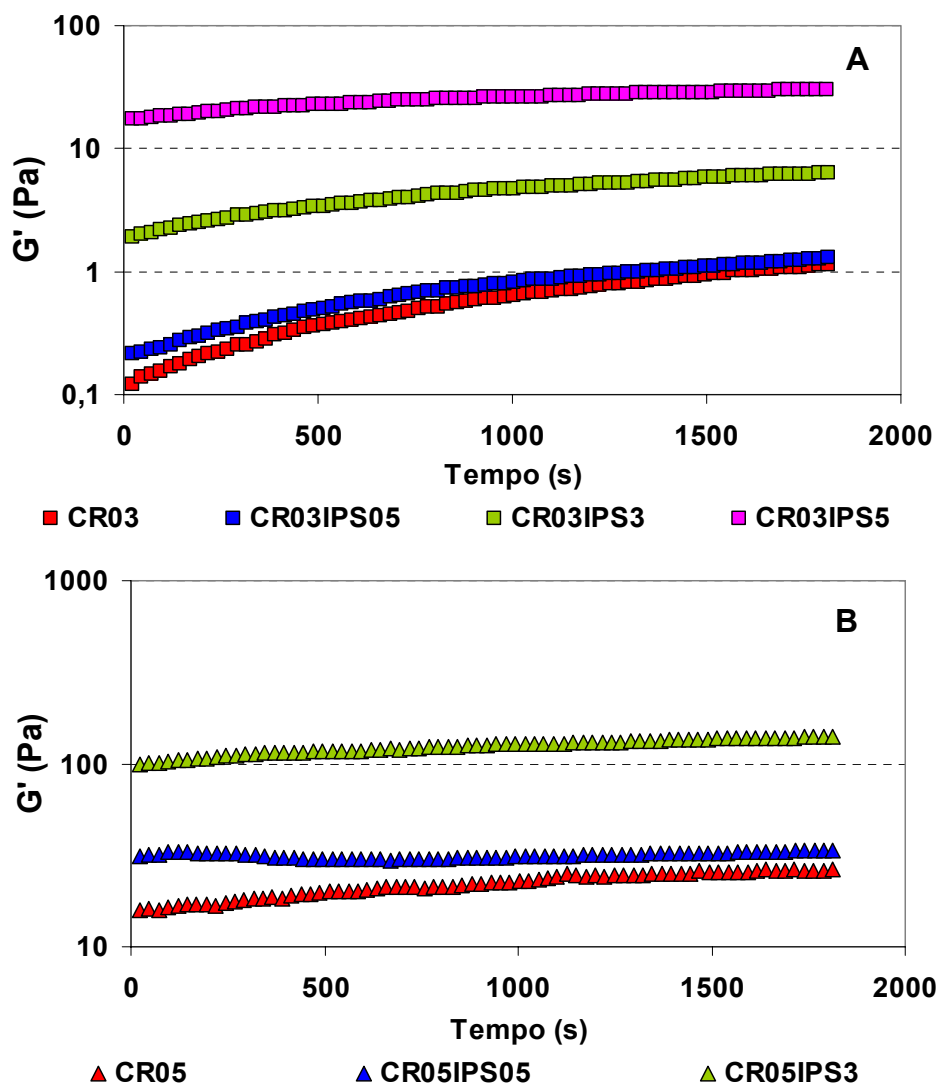


Figura 4.13. Comportamento do módulo elástico (G') durante a varredura isotérmica a 5°C , sob cisalhamento oscilatório de géis de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3 e (B) 0,5% (p/p) e adicionados de isolado protéico de soro (IPS) em concentração de 0,5, 3 e 5% (p/p).

3.2.4. Estabilidade de géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio

A estabilidade dos géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio, após o resfriamento foram observadas apenas para as seguintes formulações: CR03CS5, CR03CS8 (a partir de 5% de caseinato combinado com a menor concentração de carragena), CR05CS2, CR05CS5, CR05CS8 (a partir de 2% de caseinato com 0,5% de carragena), CR08 e CR08CS2 (menor concentração de caseinato com a maior concentração de carragena) (Figura 4.14). Estes resultados indicam que o aumento da concentração macromolecular favoreceu a rápida estabilização da rede até certo ponto e depois parece haver uma prevalescente incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros. Isto é comprovado pelo fato que o aumento da concentração de caseinato de sódio favoreceu o fortalecimento do caráter elástico até a concentração de 5% (p/p) e um incremento para 8% provocou uma drástica redução de G' , efeito que ficou mais evidente em altas concentrações do polissacarídeo. O decréscimo de G' com o tempo para algumas formulações pode ser atribuído ao efeito de escorregamento ou encolhimento do gel a elevadas concentrações de macromoléculas.

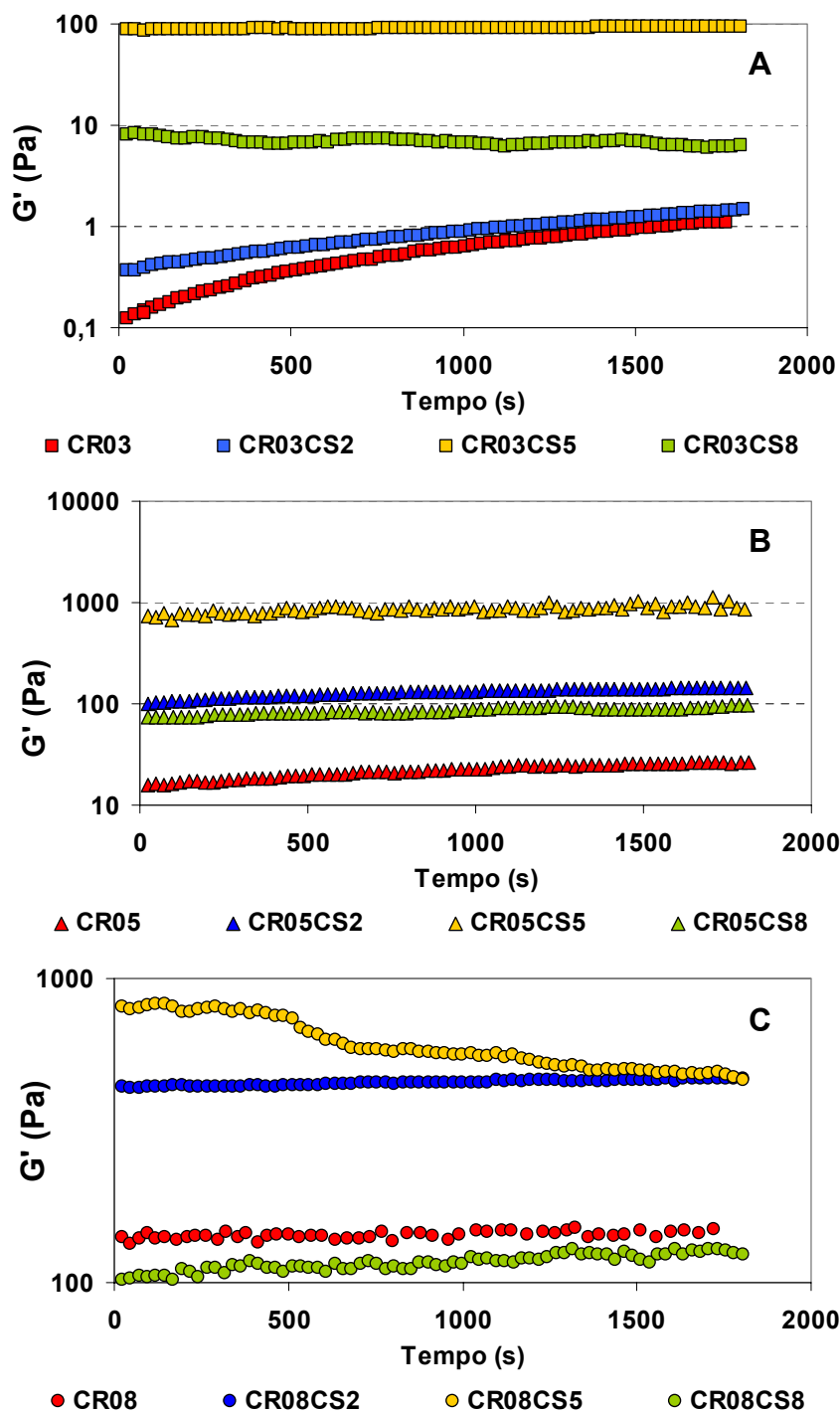


Figura 4.14. Comportamento do módulo elástico (G') durante a varredura isotérmica a 5°C , sob cisalhamento oscilatório de géis de κ -carragena (CR) em concentração de (A) 0,3, (B) 0,5 e (C) 0,8% (p/p) e adicionados de caseinato de sódio (CS) em concentração de 2, 5 e 8% (p/p).

3.2.5. Comportamento cinético dos géis mistos

A avaliação da variação de G' em função do tempo durante a varredura isotérmica a 5°C permitiu verificar que esta seguiu uma cinética de primeira ordem (Equação 2). Os parâmetros de ajuste desta equação (A , k e G_0), juntamente com o G'_{inicial} (módulo elástico no início da varredura isotérmica) e a diferença entre G_0 e G'_{inicial} (aumento do módulo elástico durante a varredura isotérmica) estão mostrados na Tabela 4.5. Também pode-se observar o módulo elástico dos sistemas que se estabilizaram durante a varredura de temperatura em resfriamento e os géis que apresentaram escorregamento, cujos parâmetros reológicos no equilíbrio não puderam ser analisados.

Os géis puros de carragena mostraram claramente o efeito do aumento da concentração em aumentar o módulo elástico no equilíbrio (G_0), ΔG e k , ou seja, uma maior densidade molecular diminui a mobilidade das moléculas e aumenta a frequência de choques e ligações para formar o gel.

Tabela 4.5. Parâmetros de ajuste da equação 2 aos dados de G' (Pa) em função do tempo. A diferença entre os módulos elásticos no equilíbrio (G_0) e inicial ($G'_{inicial}$) está representada por $\Delta G = G_0 - G'_{inicial}$. A observação refere-se ao comportamento reológico após o resfriamento.

Sistemas	G_0 (Pa)	A	k (10^{-6} Pa.s ⁻¹)	r^2	$G'_{inicial}$ (Pa)	ΔG (Pa)	Observação
CR03	32,57	32,48	18,03	1,00	0,12	32,45	não equilíbrio
CR05	101,68	85,27	76,79	1,00	15,71	86,27	não equilíbrio
CR08	143,13	-	-	-	-	-	equilíbrio
CR03SC05	59,61	59,56	3,44	1,00	0,06	59,55	não equilíbrio
CR03SC15	59,62	59,56	4,12	0,99	0,08	59,48	não equilíbrio
CR03SC30	59,63	59,55	3,24	1,00	0,08	59,55	não equilíbrio
CR05SC05	318,43	165,01	746,01	1,00	154,91	163,52	não equilíbrio
CR05SC15	330,47	241,29	154,61	0,99	85,82	244,65	não equilíbrio
CR05SC30	345,66	268,91	104,62	0,99	73,66	272,00	não equilíbrio
CR08SC05	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR08SC15	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR08SC30	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR03IPS05	6,04	5,87	1,27	1,00	0,21	5,83	não equilíbrio
CR03IPS3	11,33	9,46	355,97	1,00	1,90	9,43	não equilíbrio
CR03IPS5	34,53	17,34	759,67	1,00	17,32	17,21	não equilíbrio
CR03IPS7	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR05IPS05	42,19	15,35	311,30	1,00	29,75	12,44	não equilíbrio
CR05IPS3	157,85	57,30	640,61	0,99	44,41	113,44	não equilíbrio
CR05IPS5	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR05IPS7	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR08IPS05	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR08IPS3	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR08IPS5	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR08IPS7	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR03CS2	57,87	57,55	10,56	1,00	0,37	57,51	não equilíbrio
CR03CS5	90,91	-	-	-	-	-	equilíbrio
CR03CS8	6,90	-	-	-	-	-	equilíbrio
CR05CS2	150,48	50,21	1091,69	1,00	99,89	50,59	não equilíbrio
CR05CS5	859,61	-	-	-	-	-	equilíbrio
CR05CS8	85,26	-	-	-	-	-	equilíbrio
CR08CS2	484,38	-	-	-	-	-	equilíbrio
CR08CS5	-	-	-	-	-	-	escorregamento
CR08CS8	116,27	-	-	-	-	-	equilíbrio

A adição de sacarose pareceu afetar pouco a rede do gel para a concentração de 0,3% (p/p) de carragena, onde o valor de G_0 ficou em torno de 60 Pa, valor maior que para o gel puro (32,57 Pa). Já o aumento da concentração de carragena para 0,5% mostrou que o aumento da concentração de sacarose de 5 para 30% (p/p) promoveu um leve aumento de G_0 (de 318,43 para 345,66 Pa) e ΔG (163,52 para 272 Pa). No entanto, o aumento da concentração de sacarose levou a uma grande diminuição do valor da taxa de gelificação (k) de 746,01 a $104,62 \times 10^{-6} \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$, provavelmente devido ao aumento da viscosidade do solvente, dificultando as interações entre as macromoléculas de carragena, além da competição pela moléculas de água.

A adição de pequena quantidade de isolado protéico de soro enfraqueceu a rede em relação aos géis puros, mas a adição de 3 e 5% dessa proteína em concentrações de 0,5 e 0,3% de carragena, respectivamente, levou a valores maiores de G_0 , ΔG e k . Já um maior aumento de biopolímeros no sistema provocou o escorregamento da amostra com a geometria de medida e não puderam ser avaliados. Vale ressaltar que a adição de isolado protéico de soro não levou a géis tão fortes como com a adição de sacarose.

A adição de caseinato de sódio em géis contendo 0,3% de carragena mostrou uma diminuição do valor de G_0 . No entanto, a adição de caseinato de sódio em géis contendo 0,5% de carragena, mostrou um efeito interessante, ou seja, o aumento da concentração de proteína até 5% (p/p) levou a um aumento dos valores de G_0 , com valores sempre maiores que os do gel puro, mas a adição de 8% dessa proteína promoveu uma grande diminuição de G_0 , para valores

menores que o do gel puro. Esse efeito do caseinato em favorecer a formação da rede do gel até uma certa concentração pareceu estar relacionada à sua interação eletrostática com a carragena, mas um excesso dessa proteína levou ao efeito dominante da incompatibilidade entre estes biopolímeros. Além disso, os géis contendo caseinato apresentaram estabilização da rede do gel durante a varredura de temperatura em resfriamento, o que está relacionado à rápida formação do gel, que parece ser em boa parte devido à interação carragena-caseinato.

3.2.6. Espectro mecânico

As propriedades viscoelásticas de géis mistos e puros de biopolímeros diferiram consideravelmente entre si por causa das interações intermoleculares entre os diferentes componentes da mistura e possível formação de uma rede tridimensional interpenetrante. No entanto, alguns sistemas mostraram uma variação das propriedades reológicas ainda depois da varredura isotérmica, mostrando que as interações e rearranjos da rede ainda estavam ocorrendo, não permitindo a realização de varreduras de frequências. Os espectros mecânicos dos géis que se estabilizaram após a varredura isotérmica estão apresentados na Figura 4.15. É interessante observar que os únicos géis que alcançaram o equilíbrio tinham adição de caseinato, mostrando novamente que o gel foi formado predominantemente por interações caseinato-carragena, além da agregação helicoidal da carragena.

Os dados obtidos a partir de varreduras de frequência podem ser usados para caracterizar ou classificar uma dispersão. As quatro classificações mais comuns são: solução diluída, sistemas de redes entrelaçadas (solução concentrada), gel fraco e gel forte. Uma solução diluída apresenta G'' (módulo viscoso ou de dissipação) sempre maior que G' (módulo elástico ou de armazenamento) em todo intervalo de frequência, com aproximação dos módulos em frequências mais altas, enquanto que soluções concentradas existe o cruzamento das curvas de G' e de G'' . Esses tipos de sistemas não foram observados nas concentrações estudadas. Géis fracos ou físicos são dependentes da frequência, mas não apresentam o cruzamento de G' e G'' . Além disso, G' é sempre maior que G'' e a razão G'/G'' é menor que 10. Esse tipo de gel predominou nas condições desse estudo, conforme mostrado na Figura 4.15 para os géis mistos CR03CS5, CR03CS8, CR05CS8, CR08 e CR08CS8. Além disso, observou-se que a rede do gel tornou-se mais fraca ou menos elástica com o aumento da concentração de caseinato de sódio, em uma mesma concentração de carragena. Estes resultados reforçam a hipótese de que o excesso de proteína não ligada às macromoléculas do polissacarídeo passa a afetar negativamente a elasticidade, principalmente devido ao efeito de incompatibilidade termodinâmica. Em géis fortes ou covalentes, os módulos dinâmicos são independentes da frequência e a razão G'/G'' é superior a 10 (CHAMBERLAIN & RAO, 2000; STEFFE, 1996). Esse tipo de gel foi observado apenas para os géis mistos CR05CS5 e CR08CS2, provavelmente devido ao balanço ótimo das interações eletrostáticas entre os biopolímeros, se sobrepondo ao efeito de incompatibilidade termodinâmica.

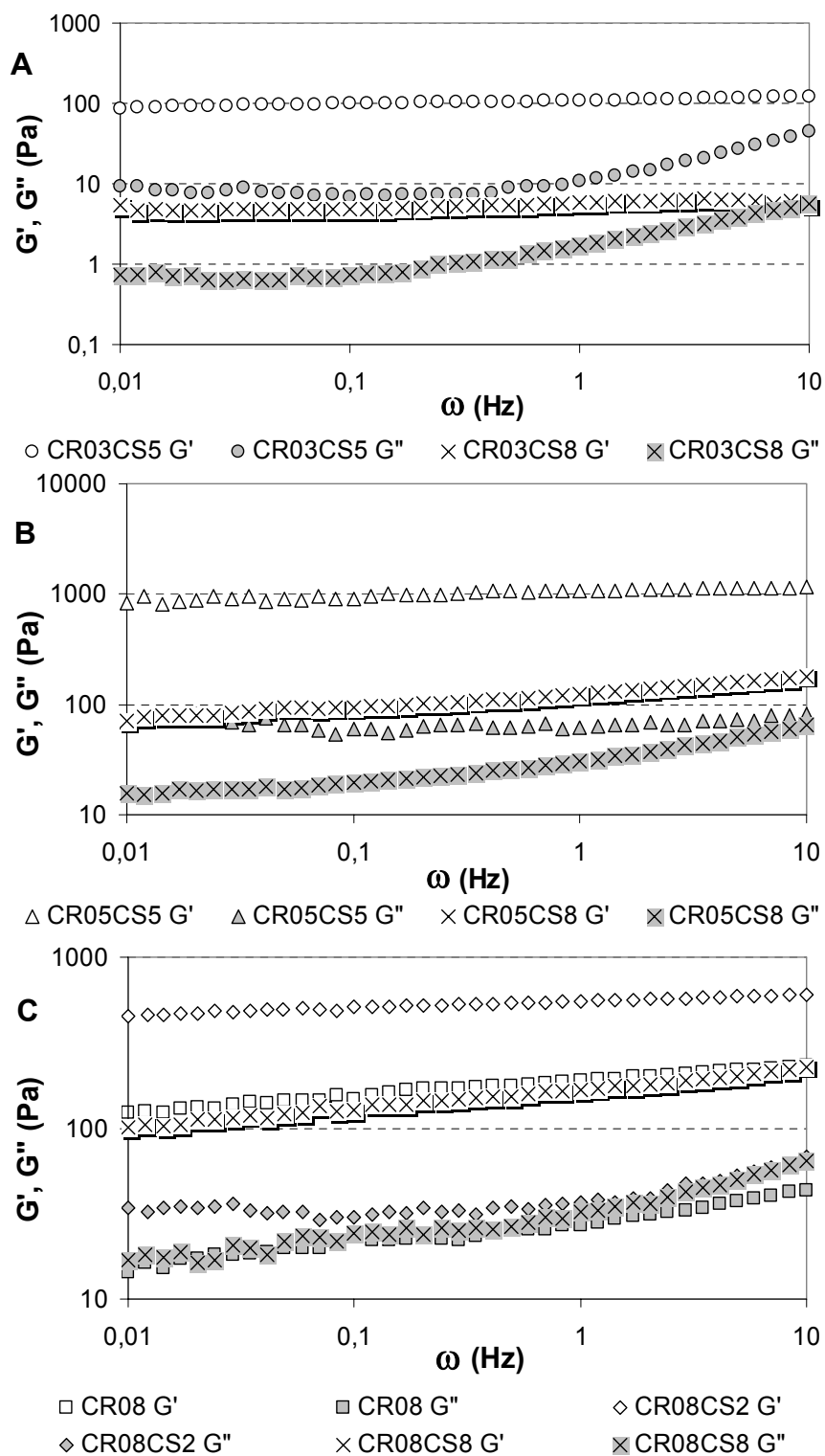


Figura 4.15. Espectros mecânicos dos géis mistos contendo: (A) 0,3 e (B) 0,5% de κ -carragena e caseinato de sódio (5 e 8% p/p) e (C) géis contendo 0,8% de κ -carragena, puro ou com 2 e 8% de caseinato de sódio.

4. Conclusão

O processo de gelificação de κ -carragena foi influenciado pela concentração deste polissacarídeo e pelas concentrações dos demais componentes adicionados para a composição dos géis mistos. O efeito da sacarose provavelmente está relacionado ao favorecimento e estabilização das zonas de junção das hélices de carragena em baixas concentrações. Entretanto, em altas concentrações de sacarose ocorreu uma competição pelas moléculas de água, alterando as propriedades desta como solvente, atrasando o início da formação da rede do gel, cujo fortalecimento foi causado por um aumento das interações macromoleculares. Em relação às proteínas do leite, o aumento da concentração destas traz intrinsecamente um aumento da concentração de íons que favorecem o fortalecimento da rede do gel misto, mas o que se observou foi uma queda na elasticidade da rede do gel a partir de determinada concentração de biopolímeros. Esse efeito provavelmente está associado ao balanço do efeito dos íons, interações entre as proteínas e carragena e o efeito da incompatibilidade termodinâmica que levou a uma repulsão entre esses biopolímeros, prejudicando a continuidade e homogeneidade da rede de carragena. As propriedades finais do gel dependem dos efeitos dominantes no processo de interação entre estes componentes e seu impacto na continuidade da rede.

CAPÍTULO V

PROPRIEDADES MECÂNICAS E MICROESTRUTURA DE GÉIS MISTOS DE CASEINATO DE SÓDIO/PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE/SACAROSE E κ -CARRAGENA

Propriedades mecânicas e microestrutura de géis mistos de caseinato de sódio/proteínas do soro de leite/sacarose e κ -carragena

Resumo

As propriedades mecânicas e de microestrutura de géis mistos compostos por κ -carragena (0,3 a 0,8% p/p) e caseinato de sódio (2 a 8% p/p), isolado protéico de soro (0,5 a 7% p/p) ou sacarose (5 a 30% p/p) foram avaliados por medidas em compressão uniaxial (testes de ruptura) e microscopia confocal de varredura à laser (CSLM). De maneira geral, as interações entre os biopolímeros em pH 6,7 mostraram que a adição de caseinato de sódio, em concentrações de até 5% (p/p) mostrou efeito sinérgico, aumentando a força do gel, porém o aumento do teor de proteína (8% p/p) levou a uma micro-separação de fases, que promoveu um enfraquecimento da rede. No entanto, com o aumento da concentração de carragena houve a formação de géis mais rígidos, firmes e deformáveis. Além disso, a presença de isolado protéico de soro (IPS) provocou uma diminuição da força da rede do gel até 3% de proteína. Entretanto, uma maior quantidade desta proteína reforçou a rede, mas em valores similares ao do gel puro, ou seja, em altas concentrações de IPS pareceu se formar uma combinação de redes mistas independentes dos biopolímeros, sem demonstrar sinergismo. A adição de sacarose pareceu não afetar as propriedades mecânicas dos géis de carragena, pois apenas promoveu uma leve diminuição da força e firmeza da rede com a sua adição, independente da concentração. Os resultados de CSLM mostraram que, em concentração fixa de carragena, o aumento da concentração de proteínas promoveu um aumento da particulação ou heterogeneidade da rede do gel. Esse balanço de intensidade de interações repulsivas e atrativas entre os biopolímeros, afetou de forma interessante as propriedades mecânicas dos géis, pois dependendo das concentrações ocorreu sinergia ou antagonismo entre as macromoléculas.

Palavras-chave: caseinato de sódio, isolado protéico de soro, sacarose, κ -carragena, gel, propriedades mecânicas, microestrutura.

1. Introdução

Os atributos de textura e estabilidade dos alimentos são importantes fatores para a qualidade e aceitabilidade por parte dos consumidores e podem ser determinados, em nível molecular, pelas interações entre os componentes que formam a matriz alimentícia (AGUILERA & STANLEY, 1999). Diferentes tipos de estrutura podem ser criados usando misturas de biopolímeros através da variação da natureza das macromoléculas envolvidas, da composição da solução e das condições do meio, o que poderia levar a redes interpenetrantes simples ou compactas (ZIEGLER & FOEGEDING, 1990). Cada um desses tipos de microestrutura promovem diferentes propriedades reológicas e físico-químicas como força do gel, capacidade de retenção de água e turbidez. Assim, a compreensão dos processos e fenômenos envolvidos é fundamental no desenvolvimento de alimentos com novas ou otimizadas propriedades físico-químicas e sensoriais. Em particular, sistemas mistos biopoliméricos parecem ser um efetivo modo de criar produtos com baixo teor de lipídeos, com propriedades similares aos alimentos tradicionais tais como: sobremesas, iogurtes, molhos e cremes. Dentre os diferentes segmentos da indústria de alimentos, as fabricantes de produtos lácteos são as que mais investem em novas formulações com reduzido teor de gordura.

Vários produtos lácteos contêm polissacarídeos para melhorar as características estruturais e de textura, sendo a carragena, um polissacarídeo aniônico sulfatado, muito utilizada em função de uma possível sinergia com as

proteínas do leite (LANGENDORFF et al., 1997; MLEKO, 1997; AUGUSTIN et al., 1999; TZIBOULA & HORNE, 1999a; TZIBOULA & HORNE, 1999b; HEMAR et al., 2002; THAIUDOM & GOFF, 2003; SPAGNUOLO et al., 2005; MARTIN et al., 2006; ALEXANDER & DALGLEISH, 2007). Em especial, a κ -carragena, que tem sido extensivamente usada para inibir a separação de fases e estabilizar produtos lácteos fluidos e géis mistos lácteos.

A separação de fases em misturas de proteínas do leite e polissacarídeos é geralmente provocada pela incompatibilidade termodinâmica e depleção por floculação (TOLSTOGUZOV, 1991; GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; SYRBE et al., 1998; DOUBLIER et al., 2000). Em valores de pH acima do pI da proteína, ambos biopolímeros apresentam cargas líquidas negativas similares distribuídas ao longo de suas cadeias. A complexação é inibida e a incompatibilidade termodinâmica é promovida (TOLSTOGUZOV, 1991).

No entanto, para polissacarídeos sulfatados, é possível ocorrer a formação de complexos solúveis proteína-polissacarídeo em valores de pH acima do pI das proteínas, proveniente da atração local dos resíduos (NH_3^+) da proteína com os resíduos (OSO_3^-) do polissacarídeo. Tal atração é muito forte e igualmente possível quando ambas proteínas e polissacarídeos sulfatados estão negativamente carregados (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; SYRBE et al., 1998). Além disso, em sistemas mistos de carragena com proteínas do leite parece que a rede do gel consiste basicamente de moléculas de carragena ligadas com agregados de proteínas dominados pela caseína, cuja estabilidade à microseparação de fases está associada a gelificação da carragena no estado helicoidal

(SPAGNUOLO et al., 2005). Assim, estudos sobre as interações entre a κ -carragena e proteínas do leite, bem como a adição de outros co-solutos são importantes para a compreensão da funcionalidade deste polissacarídeo em derivados lácteos.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar as interações entre a κ -carragena e caseinato de sódio, isolado protéico de soro ou sacarose sobre a rede do gel formado através da análise das propriedades mecânicas e de microestrutura por microscopia confocal de varredura a laser.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Caseína, isolado protéico de soro, sacarose e carragena como descritos no item 2.1 do Capítulo 4.

2.2. Métodos de preparação das soluções

Idem aos itens 2.2 e 2.3 do Capítulo 4.

2.3. Propriedades mecânicas dos géis

Após o tratamento térmico das soluções e posterior resfriamento, estas foram acondicionadas em cilindros plásticos (altura e diâmetro de 30 mm) para a formação dos géis a $10\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Para a análise das propriedades mecânicas, os géis foram retirados cuidadosamente dos cilindros plásticos e os

testes de compressão foram realizados rapidamente para minimizar a alteração da temperatura dos géis.

As propriedades mecânicas das formulações foram determinadas por ensaios em compressão uniaxial realizados em um texturômetro TA-XT2i Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Godalming, Inglaterra). As medidas foram feitas utilizando uma geometria do tipo placa cilíndrica de acrílico com 35 mm de diâmetro, que foi lubrificada com óleo de silicone de baixa viscosidade de forma a diminuir o atrito com a amostra (RAO, 1992; LAU et al., 2000). Estes ensaios foram realizados usando velocidade de compressão de 1 mm/s até 80% de deformação da altura inicial dos géis mantendo-se a temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$. As medidas de força e altura foram convertidas em tensão e deformação de Hencky de acordo com as equações 1 a 3. As propriedades tensão e deformação na ruptura, que estão associadas à dureza e deformabilidade, respectivamente, foram obtidas a partir do ponto máximo da curva tensão em função da deformação de Hencky. Um outro parâmetro característico do material e de grande importância na caracterização da textura, pois está associado à firmeza, é o módulo de elasticidade (E), que foi determinado a partir da tangente da região linear inicial da curva de tensão-deformação de acordo com a Equação 4 (STEFFE, 1996).

$$\sigma_H = \frac{F(t)}{A(t)} \quad (1)$$

Sendo:

$$A(t) = \frac{A_0 H_0}{H(t)} \quad (2)$$

$$\varepsilon_H = -\ln \left[\frac{H(t)}{H_0} \right] \quad (3)$$

$$E = \left. \frac{d\sigma_H}{d\varepsilon_H} \right|_{\varepsilon \approx 0} \quad (4)$$

Onde:

σ_H = Tensão de Hencky (kPa)

ε_H = Deformação de Hencky (adimensional)

$F(t)$ = força (N);

A_0 = área inicial da amostra (m²);

$A(t)$ = área da amostra no tempo t (m²).

H_0 = altura inicial da amostra (m);

$H(t)$ = altura da amostra no tempo t (m).

2.4. Microscopia confocal de varredura a laser

As microestruturas dos géis foram avaliadas através de microscopia confocal de varredura a laser utilizando-se um sistema confocal (MRC 1024 UV, Biorad, EUA) montado sobre um microscópio invertido (Axiovert 100 Zeiss, Alemanha), equipado com o laser de Ar-Kr que emite uma luz polarizada com comprimento de onda de 568 nm para excitação do corante fluorescente ligado à proteína. O corante Rodamina B foi adicionado às soluções biopoliméricas após o tratamento térmico, as quais foram rapidamente acondicionadas em lâminas de vidro, cobertas com uma lamínula e seladas com esmalte para promover um ambiente hermético. As amostras, protegidas contra o ressecamento, foram mantidas a $\pm 10^\circ\text{C}$ para a manutenção do sistema gelificado até o momento da análise.

As imagens foram capturadas usando uma objetiva de 40 X em imersão em água. Para obter uma estrutura representativa de cada amostra foram obtidas 7 micrografias.

3. Resultados e Discussão

As propriedades mecânicas e microestruturais dos géis foram avaliados após a manutenção destes a 10°C por 24 h. Dessa forma, a rede do gel já se encontrava em equilíbrio e as interações entre os biopolímeros ou com a sacarose já se encontravam estabelecidas. As análises realizadas com estes géis permitiram avaliar as características das redes formadas para cada tipo de combinação de κ -carragena com as proteínas do leite ou com a sacarose.

3.1. Propriedades mecânicas dos géis

3.1.1. Géis de κ -carragena adicionados de sacarose.

A Figura 5.1 A-C mostra o comportamento das propriedades mecânicas (tensão e deformação na ruptura e módulo de elasticidade) dos géis puros de κ -carragena, nas concentrações de 0,5 e 0,8% (p/p) e com adição de sacarose, nas concentrações de 5, 15 e 30% (p/p). Os géis contendo 0,3% de κ -carragena, puros ou contendo sacarose, não apresentaram estrutura auto-sustentável, não permitindo a análise de compressão uniaxial.

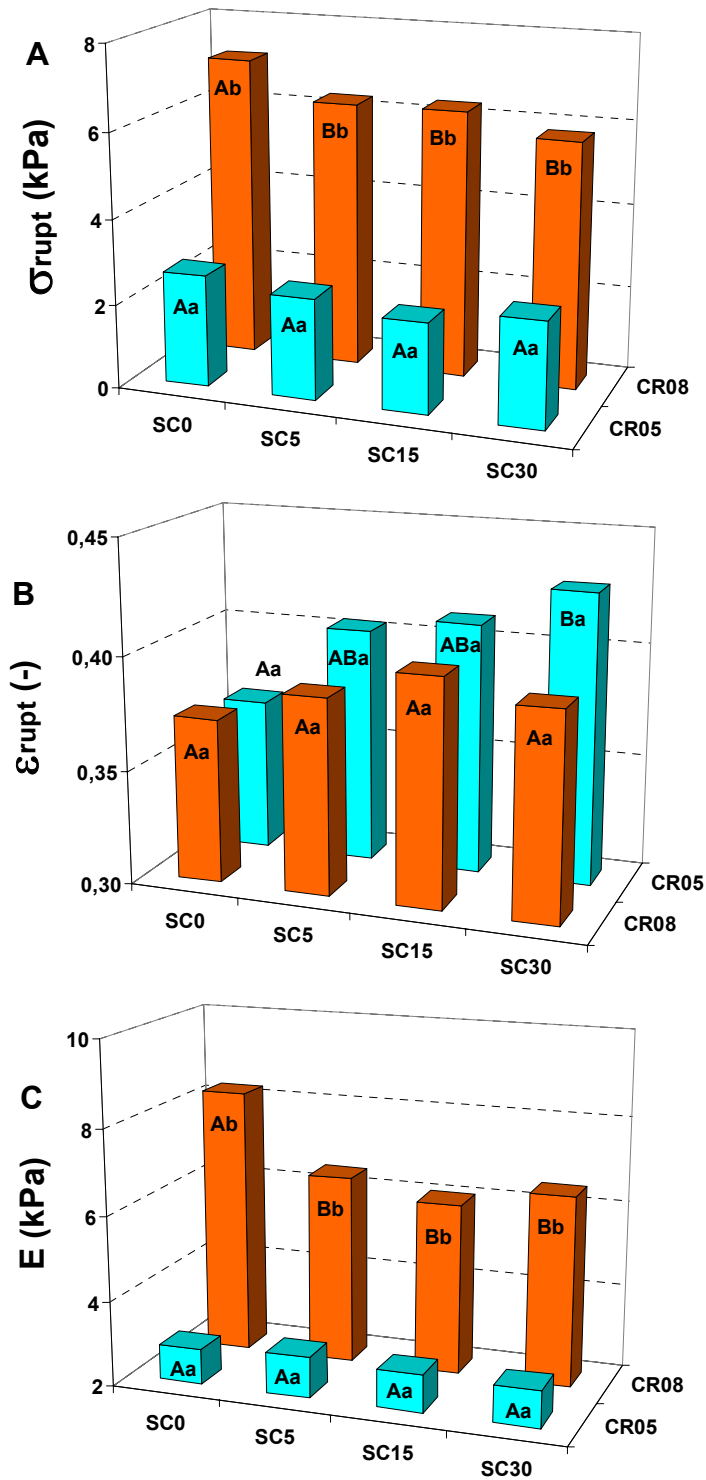


Figura 5.1. (A) Tensão, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade de géis puros de κ -carragena - CR (0,5 e 0,8 % p/p) e contendo sacarose - SC (5 a 30% p/p). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de sacarose.

O aumento da concentração de carragena exerceu um efeito positivo muito pronunciado ($p < 0,05$) na rigidez e firmeza da rede do gel (Figura 5.1 A). Os géis contendo 0,5% de carragena não apresentaram alteração da rigidez da rede quando adicionados de até 30% (p/p) de sacarose ($p < 0,05$) e os valores da tensão na ruptura foram em torno de 2,5 kPa. Já para os géis contendo 0,8% de carragena, a adição de 5 a 30% de sacarose, promoveu uma pequena diminuição da rigidez da rede de 7,14 (gel puro) para aproximadamente 6 kPa (com sacarose).

Para a firmeza da rede do gel, os valores do módulo elástico para os géis com 0,5% de carragena adicionados de sacarose não foram dependentes da concentração desse co-soluto ($p < 0,05$) e os valores de E foram em torno de 2,9 kPa. Para géis contendo 0,8% de carragena, a adição de sacarose levou a uma diminuição acentuada da firmeza da rede, de cerca de 8,3 (gel puro) para 6,5 kPa. A tendência do módulo de elasticidade foi a mesma que para a tensão na ruptura, porém a medida a baixas deformações mostrou mais claramente o efeito da sacarose.

Já a deformabilidade da rede dos géis não apresentou dependência com a concentração de carragena (Figura 5.1 B), ou seja, o aumento da concentração do polissacarídeo não levou a uma maior flexibilidade da rede em suportar altas deformações até a ruptura. Para géis com 0,5% de carragena, a adição de sacarose até 15% (p/p) não mostrou variação da deformabilidade do gel ($p < 0,05$), mas o gel contendo 30% de sacarose ($\epsilon_{rupt} = 0,43$) foi mais deformável que o gel

puro ($\epsilon_{rupt} = 0,37$). Já os géis com 0,8% de carragena não apresentaram alteração de ϵ_{rupt} com a adição de sacarose e mostraram um valor médio de 0,39.

O fato mais marcante nestes resultados é que os valores de deformabilidade da rede não apresentaram diferenças em relação à concentração de carragena (Figura 5.1 B), como observado para a rigidez (Figura 5.1 A) e firmeza (Figura 5.1 C).

Papageorgiou et al. (1994) estudaram as propriedades reológicas de géis de gelana (0,5% p/p) com adição de sacarose (0-60% p/p) usando técnicas oscilatórias e observaram que um aumento da sacarose promoveu um aumento da elasticidade da rede do gel (aumento de G'). Esses autores relataram que este efeito estabilizante da sacarose poderia ser atribuído ao fato de que as moléculas de sacarose alteraram a estrutura das moléculas de água, reorganizando as ligações de hidrogênio na cadeia do polissacarídeo e aumentando as interações polímero-polímero. A adição de açúcar também aumenta o número de zonas de junção (MIYOSHI et al., 1998). No entanto, os resultados deste trabalho indicaram que a sacarose influenciou pouco as propriedades mecânicas analisadas, promovendo apenas uma pequena redução do módulo de elasticidade com a adição de 5 a 30% (p/p) para os géis contendo 0,8% de carragena ($p < 0,05$) e um leve aumento da deformabilidade com a adição de 30% de sacarose em géis contendo 0,5% de carragena ($p < 0,05$), ambos em relação ao gel puro.

Whittaker et al. (1997) também observaram que a adição de baixas concentrações de sacarose (0 a 30%) aos géis de gelana (0,5%) também fortaleciam o gel, porém em maiores concentrações (40-60%) houve

enfraquecimento da rede. Provavelmente, a forte redução da quantidade de água devido à preferencial ligação de hidrogênio entre a sacarose e as moléculas de água desestabilizou as hélices agregadas rígidas do polissacarídeo. Neste estudo, a faixa de concentração de sacarose utilizada (5 a 30% p/p) pareceu ter afetado pouco as propriedades mecânicas dos géis analisados, independente da concentração de κ -carragena, porém alguns resultados apontam uma tendência da carragena estar se comportando como a gelana em concentrações de sacarose de 40 a 60%, ou seja, em uma menor concentração de sacarose, esta foi capaz de desestabilizar a rede de carragena, diminuindo sua força e rigidez.

3.1.2. Géis de κ -carragena e isolado protéico de soro.

Na Figura 5.2 A-C podem ser visualizados o efeito da adição de isolado protéico de soro no comportamento das propriedades mecânicas de géis de κ -carragena: tensão (Figura 5.2 A); deformação (Figura 5.2 B) na ruptura e módulo de elasticidade (Figura 5.2 C). Os géis puros de κ -carragena contendo 0,3% (p/p) e os mistos contendo até 3% de isolado protéico de soro não formaram uma estrutura auto-sustentável (NG), dessa forma não puderam ser analisados através de testes de ruptura.

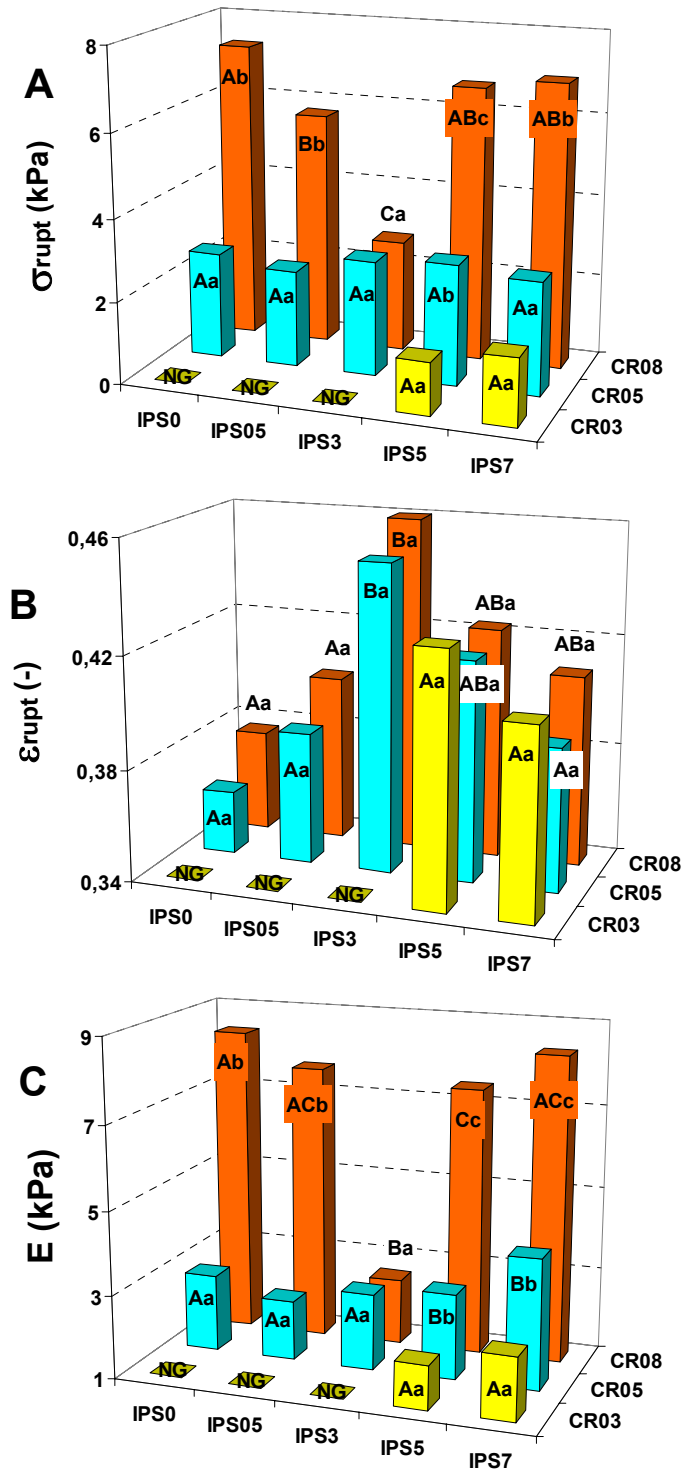


Figura 5.2. (A) Tensão, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade de géis puros de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8 % p/p) e contendo isolado protéico de soro - IPS (0,5 a 7% p/p). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de isolado protéico de soro. NG = gel não auto-sustentável.

Os géis mistos de κ -carragena com concentração de 0,3%, adicionados de 5 e 7% de isolado protéico de soro apresentaram estrutura sustentável com rigidez (valores de tensão na ruptura) similar aos géis contendo 0,5% de κ -carragena e nas mesmas concentrações de IPS (Figura 5.2 A). No entanto, a avaliação do módulo de elasticidade permitiu verificar um claro aumento da força do gel com o aumento da concentração de carragena e de IPS a partir de 5% (p/p) (Figura 5.2 C). Entretanto, a deformação na ruptura dos géis com concentrações intermediárias de carragena (0,5% p/p) mostraram um valor máximo em concentrações intermediárias de IPS (3 e 5% p/p) e um decréscimo com a adição de mais proteína. Este comportamento foi corroborado pelo gel contendo 0,8% de carragena, que também mostrou um comportamento diferenciado dos parâmetros de rigidez e firmeza da rede do gel, como apresentados nas Figuras 5.2 A e C. Como uma tendência geral, a adição de baixas concentrações de IPS provocou uma gradual diminuição desses parâmetros até a concentração de 3% de IPS. Entretanto, o aumento das concentrações de IPS para 5 e 7% levou a um aumento da rigidez (Figura 5.2 A) e firmeza (Figura 5.2 C) dos géis.

Este comportamento diferenciado provavelmente está relacionado ao fato de que em baixas concentrações de IPS (até 3% p/p) predominam os efeitos de incompatibilidade termodinâmica e separação de fases entre os biopolímeros em relação à gelificação, com o IPS enfraquecendo a rede do gel de carragena (Figuras 5.2 A e C). Isto difere do sinergismo observado para o caseinato (Figura 5.3), pois provavelmente não ocorrem interações eletrostáticas entre a carragena e as proteínas do soro, como entre a carragena e o caseinato. Este efeito é mais

claro somente a 0,8% de carragena, pois os efeitos de incompatibilidade termodinâmica são mais evidentes com o aumento da concentração dos biopolímeros. Já em maiores concentrações de IPS, o mesmo efeito termodinâmico promove uma “concentração virtual” dos biopolímeros, que além de promover um aumento da elasticidade da rede do gel, predominantemente formada por carragena, também favorece a formação de uma provável rede mista ou interpenetrante de agregados de isolado protéico, cujas moléculas já se encontravam desnaturadas e reativas (OULD ELEYA & TURGEON, 2000a; OULD ELEYA & TURGEON, 2000b; OULD ELEYA et al., 2006). Estes dois processos parecem reverter o efeito deletério da incompatibilidade entre estes biopolímeros pelo favorecimento da formação de uma rede mista.

3.1.3. Géis de caseinato de sódio e κ -carragena.

Os géis puros de κ -carragena com concentração de 0,3% (p/p) não foram auto-sustentáveis, porém a adição de pequena concentração de caseinato de sódio modificou este comportamento. Como uma tendência geral, aumentando a concentração de κ -carragena ocorreu um aumento da rigidez (Figura 5.3 A), deformabilidade (Figura 5.3 B) e firmeza (Figura 5.3 C) da rede dos géis ($p > 0,05$), devido à forte contribuição do polissacarídeo gelificado. Já a contribuição do caseinato de sódio foi mais complexa, visto que o aumento da concentração desta proteína favoreceu a rigidez da rede até a concentração de 5% (p/p), porém houve uma diminuição da tensão na ruptura em maior concentração (8% p/p), como pode ser observado na Figura 5.3 A.

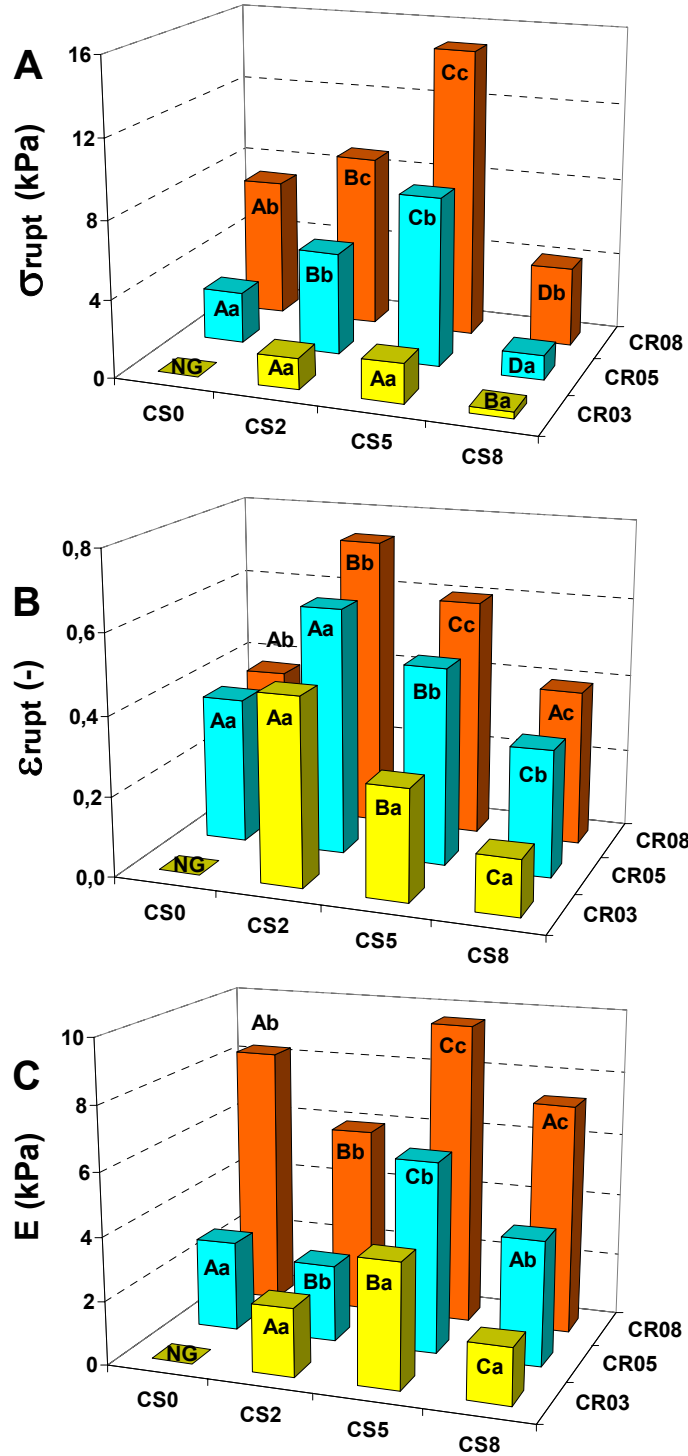


Figura 5.3. (A) Tensão, (B) deformação na ruptura e (C) módulo de elasticidade de géis puros de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8 % p/p) e géis mistos contendo caseinato de sódio - CS (2 a 8% p/p). Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre as médias no mesmo eixo ($p < 0,05$). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de caseinato de sódio. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de carragena. NG = gel não auto-sustentável.

A adição de 2% de caseinato promoveu um aumento da rigidez da rede do gel (σ_{rupt} de 5,27 kPa) em relação ao gel puro (σ_{rupt} de 2,65 kPa) para a concentração de 0,5% de carragena. Já a adição de 8% de caseinato na solução de 0,5% de carragena promoveu uma diminuição da tensão na ruptura para 1,24 kPa, menor que o valor do gel puro. O gel contendo 0,8% de carragena apresentou comportamento similar. Dessa forma, uma pequena concentração de proteína favoreceu a resistência da rede do gel à ruptura, mas altas concentrações causaram o enfraquecimento desta.

É interessante observar a provável interação entre o caseinato de sódio e carragena através destes resultados, uma vez que géis mais fortes foram obtidos em concentração de 2% de caseinato e 0,3% de carragena (Figura 5.3 A), enquanto que foi necessária a adição de 5% de isolado protéico de soro para que o gel fosse auto-sustentável (Figura 5.2 A). Estes resultados apontam para um provável sinergismo entre a κ -carragena e o caseinato em baixas concentrações desta proteína, o que poderia ser atribuído ao fenômeno de incompatibilidade termodinâmica, pois em pH 6,7, acima do pI da proteína, a carga líquida da proteína é negativa (TOLSTOGUZOV, 1997; SYRBE et al., 1998). Como resultado, poderia ocorrer uma interação eletrostática específica e atrativa entre a carragena negativamente carregada e a região carregada positivamente entre os resíduos dos aminoácidos 97 e 112 da κ -caseína (SNOEREN et al., 1975) ou, o mais provável, uma repulsão entre as proteínas carregadas negativamente e os grupos sulfatos da κ -carragena, promovendo o efeito de exclusão de volume. Este efeito promove a concentração mútua de ambos biopolímeros em microrregiões

separadas e favorece a gelificação da κ -carragena, devido à sua “concentração virtual” no sistema, podendo aumentar a rigidez do gel (BAEZA et al., 2002). Neste caso, a rede principal que é formada por carragena aprisiona as submicelas de caseinato de sódio e alguns prováveis complexos são formados por carragena-caseinato (TZIBOULA & HORNE, 1999a; JI et al., 2008).

Ribeiro et al. (2004) também observaram valores máximos de tensão e deformação na ruptura para géis acidificados (pH=4,6) de κ -carragena e caseinato de sódio em concentrações em torno de 6% (p/p) de proteína, mas em altas concentrações (0,8% p/p) de polissacarídeo para a tensão e menores concentrações (0,4% p/p) para a deformação. Este resultado foi um pouco diferente do observado nesse estudo devido à acidificação do sistema, que diminui a repulsão eletrostática e incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros.

O máximo ponto de sinergismo entre os biopolímeros desse estudo para a deformação na ruptura (ϵ_{rupt}) do gel foi verificado para a concentração de 2% de caseinato de sódio, para todas as concentrações de carragena (Figura 5.3 B). O aumento da concentração de caseinato promoveu uma diminuição da deformabilidade do gel até valores próximos aos obtidos para o gel puro na concentração de 8% desta proteína. A presença de caseinato de sódio em baixas concentrações aumentou a extensibilidade ou rigidez do gel, mas o excesso dessa proteína levou à interferência na continuidade da rede. Este parâmetro representa a deformabilidade da rede do gel até o ponto de ruptura, que está relacionado à variação da altura do gel durante a compressão uniaxial.

O aumento da concentração de carragena promoveu um aumento do módulo elástico (E) para todas as concentrações de caseinato analisadas ($p < 0,05$). Como uma tendência geral, os géis com maior firmeza da rede foram observados em concentrações de caseinato de 5% (p/p), mas um aumento da concentração para 8% levou a uma queda desse parâmetro, de maneira similar ao ocorrido com a tensão na ruptura. Em géis contendo 0,3% de carragena, a adição de caseinato também promoveu um aumento de E em relação ao gel puro, mas para géis contendo 0,5 e 0,8% desse polissacarídeo, a presença de 2% de caseinato levou a uma diminuição da firmeza da rede e géis mistos com 8% de proteínas apresentaram valores similares ao do gel puro.

O módulo de elasticidade (E) está relacionado à firmeza da rede do gel em deformações muito pequenas dentro do intervalo de linearidade ou de deformações reversíveis dos géis, sendo assim mais sensível para avaliar as interações entre os componentes. Neste caso é possível concluir que o módulo de elasticidade consegue perceber algumas interações em menores concentrações que as propriedades na ruptura.

O resultado final das propriedades da rede do gel é um balanço delicado entre a intensidade das interações eletrostáticas repulsivas entre as macromoléculas, devido às cargas negativas de ambas e as interações eletrostáticas atrativas entre os grupos sulfato negativos da carragena e sítios específicos positivamente carregados das proteínas (SNOEREN et al., 1975; ARLTOFT et al., 2007; JI et al., 2008). Esse balanço é alterado devido a adição de altas concentrações de caseinato de sódio no sistema, promovendo uma separação de fases em nível microscópico, quando há um excesso de proteína e

as interações de atração e repulsão se saturam (ARLTOFT et al., 2007). Assim, ocorre uma concentração dos biopolímeros em microrregiões separadas, levando a uma descontinuidade/heterogeneidade da rede (THAIUDOM & GOFF, 2003), impactando as propriedades mecânicas com uma diminuição da rigidez, deformabilidade e firmeza dos géis.

3.2. Microestrutura dos géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio ou isolado protéico de soro

A análise da microestrutura por microscopia confocal de varredura a laser foi realizada apenas para os sistemas mistos contendo proteínas, pois o corante Rodamina B usado como agente fluorescente possui interação específica com as proteínas. Dessa forma, a análise das micrografias mostra regiões escuras e claras, sendo as claras correspondentes a regiões de maior intensidade de fluorescência, ou seja, com maior concentração do corante rodamina B que estava ligado à proteína. Logo, regiões claras representam regiões ricas em proteínas e as regiões escuras mostram os demais componentes da mistura que não são componentes protéicos (polissacarídeo e água).

3.2.1. Géis mistos de κ -carragena e isolado protéico de soro

Os géis mistos contendo 0,3 a 0,8% (p/p) de carragena com adição de 3% de isolado protéico não apresentaram fortes alterações da microestrutura entre si. Observa-se apenas que com o aumento da concentração de carragena, a rede do gel pareceu ficar mais particulada, ou seja, apresentou uma maior heterogeneidade entre regiões claras (ricas em isolado protéico de soro) e escuras (ricas em carragena) formando uma rede mista, sem uma visível separação de fases microscópica (Figura 5.4 A, C e E). No entanto, fica claro que a fase contínua passa a ser de carragena e começa a haver uma tendência de formação de maiores agregados de proteínas do soro desnaturadas.

O comportamento da rede mista do gel formado por 0,3 e 0,5% de carragena contendo 7% de isolado protéico de soro foi semelhante ao gel misto contendo 3% de isolado protéico de soro. Entretanto, na maior concentração de proteína, uma rede do gel mais particulada foi observada, provavelmente pelo efeito da exclusão de volume e maior interação eletrostática repulsiva (Figuras 5.4 B e C). Este efeito foi confirmado com o aumento da concentração de carragena de 0,5% para 0,8% (p/p) na maior concentração de isolado protéico de soro (7% p/p), pois houve a formação de aglomerados de proteínas que foram excluídos da rede (Figura 5.4 F).

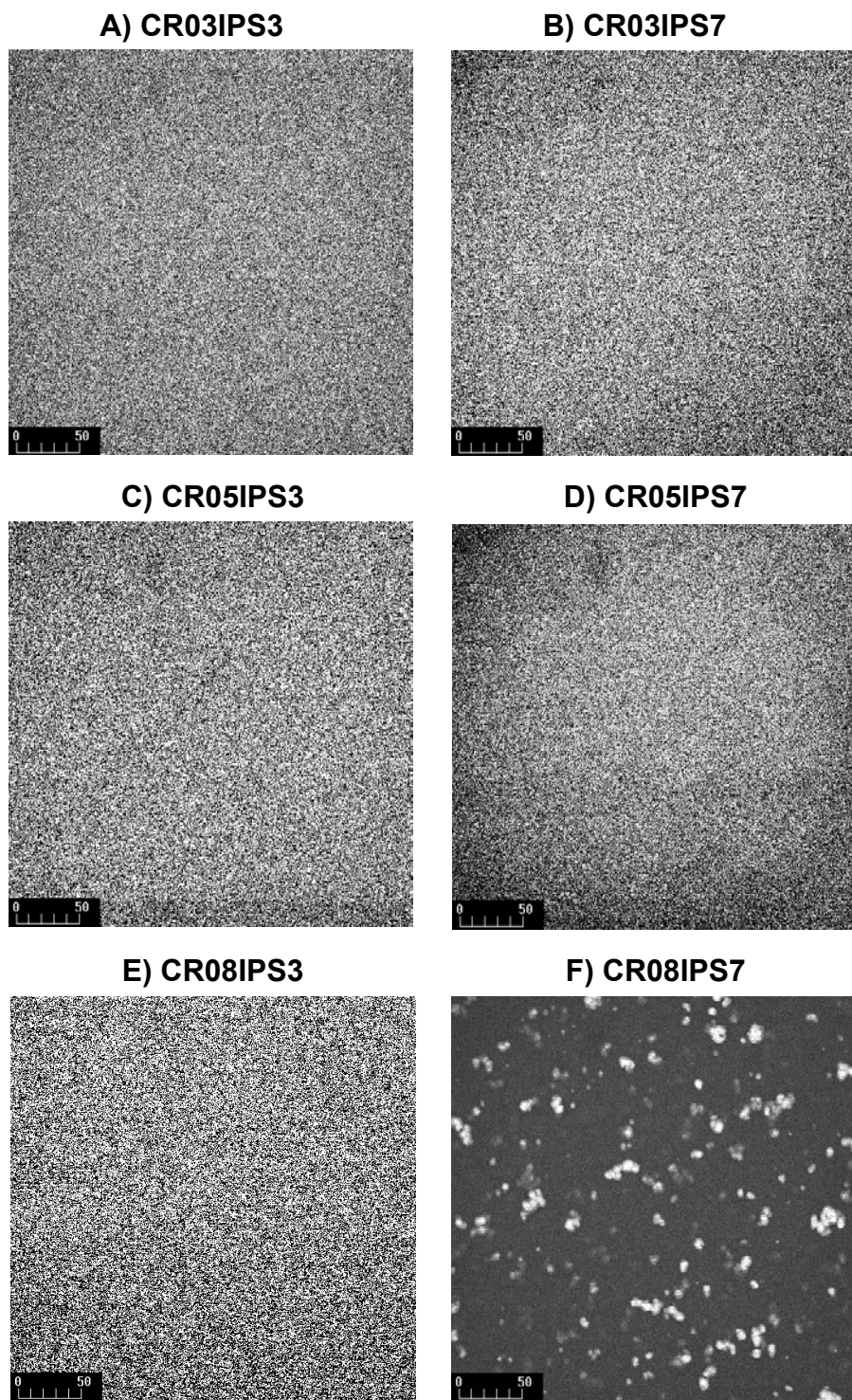


Figura 5.4. Micrografias obtidas a partir de microscopia confocal de varredura a laser (40 X) para os géis mistos de κ -carragena - CR (0,3 a 0,8% p/p) e isolado protéico de soro - IPS (3 e 7% p/p). A barra indica uma dimensão de 50 μm .

Apesar da presença dos agregados de isolado protéico de soro na rede do gel, esta se mostrou mais homogênea que nas demais condições, visto que a agregação do IPS levou a uma maior predominância de regiões escuras, ricas em carragena (Figura 5.4 F). Dessa forma, os géis apresentaram elevada elasticidade, dureza e firmeza, principalmente relacionado à rede contínua de carragena. Hemar et al. (2002) também observaram que misturas de isolado protéico de soro e κ -carragena mostraram poucos aglomerados de proteínas, os quais foram formados pelo mecanismo de depleção-floculação, de modo similar ao que ocorre em sistemas concentrados de proteínas do leite.

3.2.2. Microestrutura de géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio

Nas Figuras 5.5 A e C, observa-se uma grande alteração da microestrutura dos géis mistos contendo 0,3% (p/p) de κ -carragena com o aumento da concentração de 2 para 8% (p/p) de caseinato de sódio. Em baixas concentrações de caseinato de sódio nota-se uma rede contínua, com regiões claras e escuras homogeneamente distribuídas ao longo do gel (Figura 5.5 A). Já com a adição de 8% de caseinato de sódio (Figura 5.5 C) observa-se a clara separação de fases, sendo que ocorreu um predomínio de regiões claras visto a alta concentração de proteínas frente à pequena concentração de carragena. Assim, formaram-se microrregiões ricas em carragena (gotas) rodeada de uma fase contínua rica em caseinato de sódio.

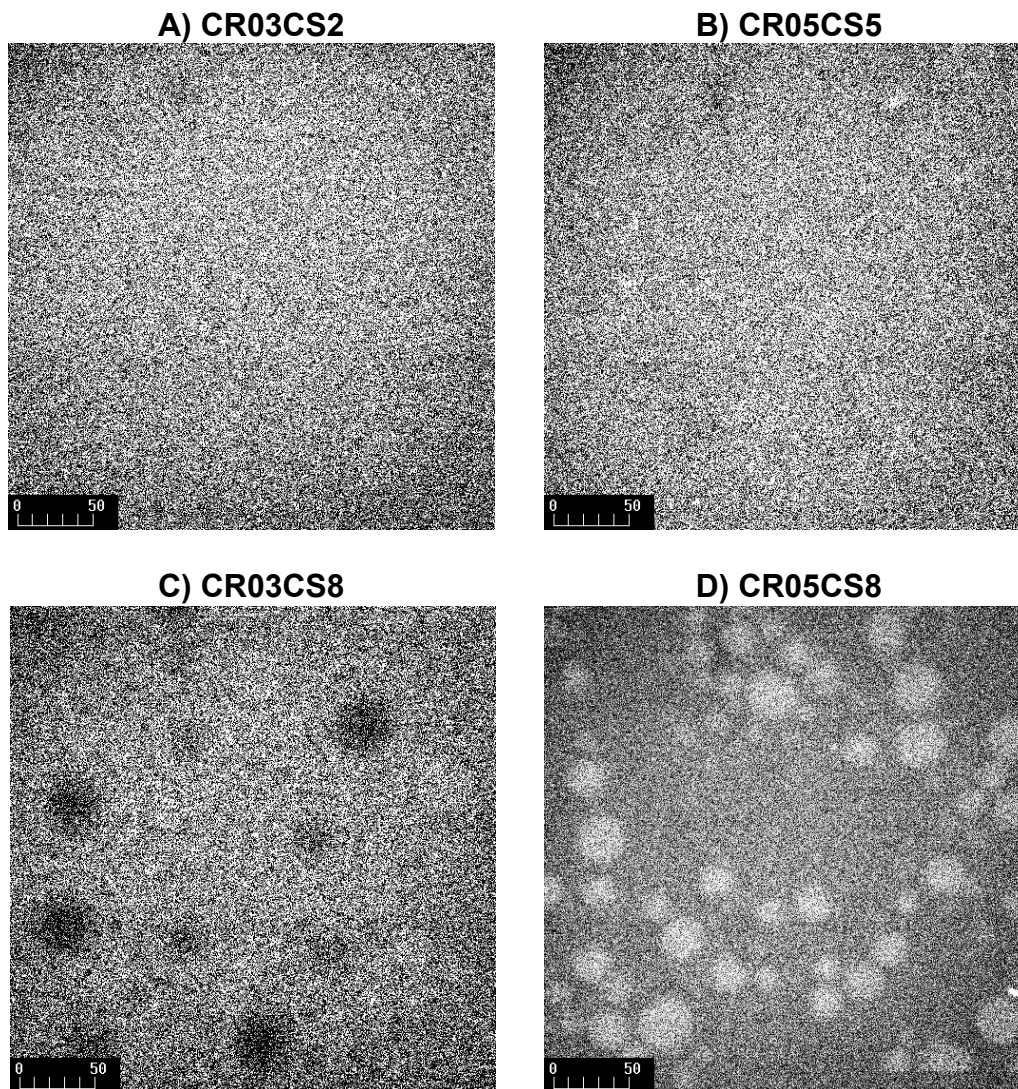


Figura 5.5. Micrografias obtidas a partir de microscopia confocal de varredura (40 X) a laser para os géis mistos de κ -carragena (CR) em concentração de 0,3% (A e C) e 0,5% p/p (B e D) e caseinato de sódio (CS) em concentração de 2 (A), 5 (B) e 8% p/p (C e D). A barra indica uma dimensão de 50 μm .

Esses resultados confirmam a tendência observada para as análises em cisalhamento oscilatório (Capítulo 4) e testes de ruptura, visto que um pequeno aumento de caseinato aumenta as características elásticas, provavelmente relacionado às interações específicas da κ -carragena com as caseínas. Ambos biopolímeros apresentam carga líquida negativa em pH 6,7 e baixa força iônica, que são condições que não promovem as interações eletrostáticas entre estes biopolímeros, mas sim um efeito de incompatibilidade termodinâmica. De maneira semelhante aos sistemas contendo micelas de caseína, a κ -caseína presente no caseinato de sódio, também poderia se associar com a κ -carragena (OAKENFULL et al., 1999).

Além disso, a adição de baixas concentrações de caseinato de sódio favorece a formação de uma rede mais forte de carragena devido ao aumento da “concentração virtual” deste biopolímero pelo efeito de exclusão de volume, apesar de não ter sido observada a separação de fases em misturas de caseinato de sódio e κ -carragena (OAKENFULL et al., 1999), pois o caseinato de sódio em solução aquosa forma agregados de cerca de 50 nm de diâmetro (LUCEY et al., 2000), mas moléculas individuais de caseínas também estão presentes.

Assim as interações de repulsão entre essas macromoléculas que levam à incompatibilidade termodinâmica e separação de fases, assim como a partição de água entre o caseinato de sódio e κ -carragena poderiam ser a razão para o aumento da viscosidade e força da rede do gel dessas misturas (HEMAR et al., 2002). No entanto, um excesso de caseinato de sódio, observado nesse estudo com a concentração de 8% (p/p), dificultou as interações entre as moléculas de

carragena e destas com o caseinato. Dessa forma, ocorre uma grande heterogeneidade de formação da rede do gel, levando à separação de fases como pode ser visto na Figura 5.5 C, afetando na formação de uma rede contínua, o que refletiu em menores valores de dureza e firmeza da rede do gel.

O gel misto com concentração de κ -carragena de 0,5% (p/p) e 5% de caseinato de sódio (Figura 5.5 B) mostrou uma rede mais particulada quando comparada com o gel contendo 0,3% de carragena e 2% de caseinato (Figura 5.5 A), provavelmente devido à maior concentração dos biopolímeros em solução. No entanto, uma adição de maior concentração de caseinato de sódio (8% p/p) promoveu uma clara separação de fases do sistema (Figura 5.5 D), mas com comportamento diferente do gel contendo 0,3% de carragena e 8% de caseinato de sódio (Figura 5.5 C), provavelmente devido a uma maior concentração de carragena. Nesse caso observou-se uma fase contínua de polissacarídeo e microrregiões esféricas claras, ricas em proteínas. Assim, apesar da alta concentração de caseinato de sódio promover a quebra da continuidade da rede do gel, microrregiões ricas em caseinato são envolvidas por uma rede mista de carragena e caseinato de sódio, cuja rede foi mais elástica, dura e firme que dos géis mistos com fase protéica contínua (0,3% de carragena e 8% de caseinato).

O comportamento de micro-separação de fases dos géis mistos contendo carragena e isolado protéico de soro (Figura 5.4 F) foi diferente do observado para o caseinato de sódio (Figuras 5.5 C e D), provavelmente devido ao processo de agregação das proteínas do soro com o tratamento térmico e a sua não interação com a carragena.

Assim, é possível afirmar que ocorre um contínuo processo de separação de fases, que é desfavorecido pela transição conformacional da carragena, a baixas temperaturas, que promove a gelificação do sistema. Hemar et al. (2002) também observaram a separação de fases em misturas caseinato de sódio e κ -carragena, porém estas foram menos homogêneas que as obtidas nesse trabalho, especialmente em altas concentrações de carragena (2 % p/p). As micrografias de CSLM mostraram que estas misturas apresentaram regiões ricas em caseinato de sódio separadas das regiões ricas em carragena, apesar de usarem uma concentração de proteína menor que a usada neste trabalho.

Spagnuolo et al. (2005) avaliaram a microestrutura de sistemas mistos de carragena e proteínas do leite e relataram que a sua estrutura consistiu de uma rede composta basicamente por ligações entre as moléculas de carragena associadas com aglomerados de proteínas dominados pela caseína. As micrografias sugerem que a estabilidade do sistema depende da associação entre as microrregiões ricas em proteínas rodeadas por hélices de carragena, formando a rede do gel. No entanto, a tendência de auto-associação da carragena provavelmente exerce alguma influência nas interações entre a carragena e caseína, modificando o balanço entre a gelificação e incompatibilidade da mistura (SCHORSCH et al., 2000). Além disso, a participação dos micro-aglomerados esféricos de proteínas na composição da estrutura da rede do gel é importante para o preenchimento dos espaços, formando uma estrutura mais homogênea em carragena, porém mais frágil (SEDLMEYER & KULOZIK, 2006; SELDMeyer & KULOZIK, 2007).

4. Conclusão

Os géis mistos de κ -carragena e caseinato de sódio, isolado protéico de soro ou sacarose apresentaram diferenças na estrutura e no comportamento reológico em relação aos géis puros de κ -carragena. Além disso, o impacto de cada componente em separado também foi diferente.

Os géis de κ -carragena contendo sacarose não apresentaram dependência das propriedades mecânicas com a concentração deste dissacarídeo, mas sim com a do polissacarídeo. Interessantemente, altas concentrações de carragena (8% p/p) levaram a géis mais rígidos e menos firmes, ou seja, o intervalo linear é pequeno, mas suportam altas tensões antes de romper-se.

As interações entre a carragena e o caseinato de sódio promoveram um aumento da rigidez, deformabilidade e firmeza do gel até certa concentração de proteína, visto que o excesso levou a um enfraquecimento da rede. A observação de ambos efeitos sinérgicos e antagônicos relacionados à variação da concentração do caseinato, provavelmente está relacionado ao balanço das interações atrativas e repulsivas, principalmente relacionados à incompatibilidade termodinâmica destes biopolímeros em pH 6,7 (acima do pI da proteína) e o processo de gelificação comandado pela carragena.

As interações entre a κ -carragena e isolado protéico de soro influenciaram a rigidez, deformabilidade e firmeza da rede do gel, principalmente para altas concentrações de carragena, mostrando que a adição de isolado protéico de soro promoveu a descontinuidade da rede do gel até uma concentração de 3% (p/p) desta proteína. No entanto, um aumento da concentração de carragena

provavelmente favoreceu a formação de uma rede mista ou a micro-separação de fases que diminui a heterogeneidade do gel.

As micrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser mostraram claramente a formação de redes particuladas em baixas concentrações de carragena e a micro-separação de fases em sistemas com alta concentração de proteínas e polissacarídeos. Esses resultados reforçaram os efeitos observados nos testes de ruptura.

Interessantemente, em baixas concentrações de carragena e altas concentrações de caseinato de sódio observou-se a formação de separação de fases com microrregiões ricas em carragena, o inverso nas concentrações de biopolímeros levou à formação de microrregiões ricas em caseinato. As interações entre carragena e isolado protéico de soro, com o aumento das concentrações de ambos biopolímeros, promoveu uma progressiva heterogeneidade, culminando com alta repulsão entre estes biopolímeros com predomínio da ação gelificante da carragena e isolamento de agregados de isolado protéico de soro, provavelmente agindo como partículas preenchedoras da rede do gel.

Esse balanço de intensidade de interações repulsivas entre os biopolímeros e a formação da rede, dominado pela carragena, afetou de forma complexa as propriedades mecânicas e microestrutura dos géis formados.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES FINAIS

Conclusões Finais

O balanço de intensidade entre interações repulsivas e atrativas entre as proteínas ou biopolímeros e as condições de formação da rede do gel, seja por indução ácida ou promovido pela transição conformacional da carragena, afetou de forma complexa as propriedades reológicas, sinerese e microestrutura dos géis, dependendo das condições de processo e composição utilizadas. A gelificação ácida do caseinato de sódio induzida por glucona- δ -lactona (GDL) foi afetada pela concentração, temperatura de incubação e taxa de acidificação. Elevadas temperaturas de incubação promoveram altas taxas de acidificação e de formação do gel, porém menores valores de pH final, menor dureza da rede do gel e pronunciada sinerese, devido à formação de uma rede com poros maiores. Os géis mais rígidos e com maior rearranjo da rede do gel foram observados em valores de pH final próximo ao pI das caseínas, o que foi possível de se alcançar com menores taxas de acidificação. Os géis formados a 10°C mostraram a maior rigidez da rede e menores valores de sinerese, em uma mesma concentração de proteína, devido a um balanço otimizado entre forças repulsivas e atrativas causado pelo elevado tempo de rearranjo próximo ao pI.

O processo de gelificação induzido pela κ -carragena em pH 6,7 foi avaliado em sistemas puros e mistos contendo proteínas do leite, caseinato de sódio e isolado protéico de soro, ou sacarose. A concentração de sacarose (5 a 30%) utilizada nesse estudo pareceu não afetar as propriedades reológicas dos géis no equilíbrio, mas mostrou uma pequena influência na temperatura de transição conformacional da carragena, durante o processo de gelificação. A presença de

proteínas do leite em baixas concentrações levou ao fortalecimento da rede do gel misto, mas em altas concentrações diminuiu a elasticidade da rede.

As interações entre as proteínas e carragena em condições de pH neutro dependeram do balanço entre o processo de gelificação e o efeito da incompatibilidade termodinâmica. As interações entre κ -carragena e isolado protéico de soro exerceram forte influência na temperatura de início da formação do gel (T_s), elasticidade da rede, rigidez, deformabilidade e firmeza da rede do gel, principalmente para altas concentrações de polissacarídeo. O efeito da concentração de isolado protéico de soro na temperatura de início da formação do gel foi muito maior que o da sacarose e tão pronunciado como o da carragena. O aumento das concentrações de carragena e isolado protéico de soro, favoreceu a formação de uma rede mista e/ou a micro-separação de fases e promoveu uma progressiva heterogeneidade, culminando com alta repulsão entre estes biopolímeros com predomínio da ação gelificante da carragena e isolamento de agregados de isolado protéico de soro, provavelmente agindo como partículas preenchedoras da rede do gel.

As interações entre a carragena e o caseinato de sódio também promoveram um aumento da rigidez, deformabilidade e firmeza do gel até certa concentração de proteína (2-5% p/p), visto que o excesso (8% p/p) levou a um enfraquecimento da rede. O efeito sinérgico demonstrado pela interação carragena-caseinato até 2-5% (p/p) de proteína promoveu uma maior elasticidade da rede do gel mas não afetou a temperatura de início da formação do gel, não interferindo na transição conformacional da carragena, mesmo estando ligada à

macromolécula do polissacarídeo. A rede do gel tornou-se mais fraca ou menos elástica com o aumento da concentração de caseinato de sódio, em uma mesma concentração de carragena, o que reforça a hipótese de que o excesso de proteína não ligada às macromoléculas do polissacarídeo passa a afetar negativamente a elasticidade do gel. A observação de ambos efeitos sinérgicos e antagônicos relacionados à variação da concentração do caseinato, provavelmente está relacionado ao balanço das interações atrativas e repulsivas, principalmente relacionados à incompatibilidade termodinâmica destes biopolímeros em pH 6,7 (acima do pI da proteína) e o processo de gelificação comandado pela carragena. Em baixas concentrações de carragena e altas concentrações de caseinato de sódio observou-se a formação de micro-separação de fases com regiões ricas em carragena, o inverso nas concentrações de biopolímeros levou à formação de regiões ricas em caseinato.

O comportamento de micro-separação de fases e gelificação da carragena para os géis mistos contendo caseinato de sódio, mostrou que a interação entre estes biopolímeros levou a géis mais elásticos que os géis puros. Este fato indica que ocorreu uma especial interação eletrostática entre a carragena e o caseinato, o que não ocorreu com o isolado protéico de soro.

Assim, dependendo dos componentes utilizados pode-se obter diferentes estruturas e texturas em produtos lácteos. Um exemplo disto é a forte interação sinérgica entre a carragena e o caseinato de sódio, discutida na literatura e confirmada a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

Referências Bibliográficas

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (2007) Alimentos industrializados (principais produtos) - Exportações Brasileiras (US\$ 1000 FOB). Disponível em: <http://www.abia.org.br/anexos/exportadores2005.pdf> Acesso em: 15 de Out. 2007.

AGUILERA, J. M. (1992) Generation of engineered structures in gels. In: Physical Chemistry of Foods. H. G. Schwartzberg; R. W. Hartel (Eds.). Marcel Dekker Inc. New York, NY, pp. 387-421.

AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. (1999) Microstructural principles of food processing and engineering. 2nd ed., p. 185–292. Gaithersburg: Aspen Publishers.

ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D. G. (2007) The interaction of casein micelles with kappa-carrageenan studied by diffusing wave spectroscopy. Food Hydrocolloids, v. 21(1), p. 128-136.

ALTING, A. C. (2003) Cold gelation of globular proteins. Thesis Wageningen University, The Netherlands, ISBN 90-5808-850-2. Disponível em : <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3396.pdf> . Acesso em: 27 de Set. 2004.

ANEMA, S. G. (1998) Effect of milk concentration on heat-induced, pH-dependent dissociation of casein from micelles in reconstituted skim milk at temperatures between 20 and 120°C. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46 (6), p. 2299–2305.

ANEMA, S. G.; KLOSTERMEYER, H. (1997) Heat-induced, pH-dependent dissociation of casein micelles on heating reconstituted skim milk at temperatures below 100°C. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 45 (4), p. 1108–1115.

ANEMA, S. G.; LI, Y. (2000) Further studies on the heat-induced, pH dependent dissociation of casein from the micelles in reconstituted skim milk. Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie, v. 33 (5), p. 335–343.

ANTIPOVA, A. S., SEMENOVA, M. G. (1997a) Effect of natural carbohydrate structure in the set glucose/sucrose/maltodextrine/dextran on protein surface activity at air-water interface. Food Hydrocolloids, v. 11, p. 71–77.

ANTIPOVA, A. S.; SEMENOVA, M. G. (1997b) Influence of sucrose on the thermodynamic properties of the 11S globulin of Vicia faba-dextran solvent system. Food Hydrocolloids, v. 11, p. 415–421.

ANTIPOVA, A. S.; SEMENOVA, M. G.; BELYAKOVA, L. E. (1999) Effect of sucrose on the thermodynamic properties of albumin and sodium caseinate in bulk solution and at air-water interface. Colloids and Surfaces B, v. 12, p. 261-270.

AOAC. (1996) Official Methods of Analysis of AOAC International. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

APPELQVIST, I. A. M.; DEBET, M. R. M. (1997) Starch-biopolymer interactions - A review. *Food Reviews International*, v. 13 (2), p. 163-224.

ARLTTOFT, D.; IPSEN, R.; MADSEN, F.; de VRIES, J. (2007) Interactions between carrageenans milk proteins: A microstructural rheological study. *Biomacromolecules*, v. 8(2), p. 729-736.

ARSHAD, M.; PAULSSON, M.; DEJMEK, P. (1993) Rheology of buildup, breakdown and rebodding of acid casein gels. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 3310-3316.

AUGUSTIN, M. A.; PUVANENTHIRAN, A.; McKINNON, I. R. (1999) The effect of κ -carrageenan conformation on its interaction with casein micelles. *International Dairy Journal*, v. 9 (3-6), p. 413-414.

BAEZA, R. I.; CARP, D. J.; PÉREZ, O. E.; PILOSOF, A. M. R. (2002) κ -Carrageenan-protein interactions: Effects of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v. 35 (8), p. 741-747.

BAIER, S. K.; McCLEMENTS, D. J. (2005) Influence of Cosolvent Systems on the Gelation Mechanism of Globular Protein: Thermodynamic, Kinetic, and Structural Aspects of Globular Protein Gelation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 4, p. 43 – 54.

BANON, S.; HARDY, J. (1992) A colloidal approach of milk acidification by glucono- δ -lactone. *Journal of Dairy Science*, v. 75 (4), p. 935-941.

BAUSSAY, K.; DURAND, D.; NICOLAI, T. (2006) Coupling between polysaccharide gelation and micro-phase separation of globular protein clusters. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 304, p. 335–341.

BAYARRI, S.; DURÁN, L.; COSTELL, E. (2004) Influence of sweeteners on the viscoelasticity of hydrocolloids gelled systems. *Food Hydrocolloids*, v. 18 (4), p. 611-619.

BEHMER, M. L. A. *Tecnologia do leite*. 13 ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1984, 320p.

BELYAKOVA, L. E., ANTIPOVA, A. S., SEMENOVA, M. G., DICKINSON, E., MERINO, L. M.; TSAPKINA, E. N. (2003) Effect of Sucrose on Molecular and Interaction Parameters of Sodium Caseinate in Aqueous Solution: Relationship to Protein Gelation. *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces*, v. 31, p. 31-40.

BONGAERTS, K., REYNAERS, H.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S. (1999) On the molar mass of kappa-carrageenan in the course of conformational transition from the disordered to the fundamental ordered form. *Macromolecules*, v. 32 (3), p. 675-682.

BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M. T. A.; PARKINSON, D. J. (1990) Whey proteins. In: *Food Gels*. Harris, P. (Ed.). London/New York: Elsevier Applied Science, Chapter 11, p. 435-466.

BOURRIOT, S., GARNIER, C., & DOUBLIER, J. L. (1999) Micellar casein-kappa-carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers*, v. 40, p. 145-157.

BRAGA, A. L. M.; MENOSSI, M.; CUNHA, R. L. (2006) The effect of the glucono-delta-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 389-398.

BREMER, L. G. B.; BIJSTERBOSCH, B. H.; SCHRIJVERS, R.; van VLIET, T.; WALSTRA, P. (1989) On the fractal nature of the structure of acid casein gels. *Colloids and Surfaces*, v. 51, p. 159-170.

BRIGNON, G.; RIBADEAU-DUMAS, B.; MERCIER, J. C.; PELISSIER, J. P. (1977) Complete amino acid sequence of bovine α_{s2} -casein. *FEBS Letters*, v. 76, p. 274-279.

BRINGE, N. A.; KINSELLA, J. E. (1993) Calcium-chloride, temperature, preheat treatments and pH affect the rate of acid-induced aggregation of casein. *Food Hydrocolloids*, v. 7, p. 113-121.

BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D. J. (1998) Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9 (4), p. 143-151.

BRYANT, C. M.; McCLEMENTS, D. J. (2000) Influence of sucrose on NaCl-induced gelation of heat denatured whey protein solutions. *Food Research International*, v. 33, p. 649-653.

CALVO, M. M.; LEAVER, J.; BANKS, J. M. (1993) Influence of other whey proteins on the heat-induced aggregation of α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, v. 3, p. 719-727.

CAPRON, I.; NICOLAI, T.; DURAND, D. (1999a) Heat induced aggregation and gelation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 1-5.

CAPRON, I.; NICOLAI, T.; SMITH, C. (1999b) Effect of addition of κ -carrageenan on the mechanical and structural properties of β -lactoglobulin gels. *Carbohydrate Polymers*, v. 40, p. 233-238.

CARR, A. J.; MUNRO, P. A. (2004) Reversible cold gelation of sodium caseinate solutions with added salt. *Journal of Dairy Research*, v. 71, p. 126–128.

CHAMBERLAIN, E. K.; RAO, M. A. (2000) Effects of concentration on rheological properties of acid-hydrolyzed amylopectin solutions. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 163-171.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. (1993) Amino acids, peptides and proteins. In: *Food Chemistry*; Fennema, O. R., Ed.; Acribia: Zaragoza, Spain, pp. 275-414.

CHEN, W-S.; HENRY, G. A.; GAUD, S. M.; MILLER, M. S.; KAISER, J. M.; BALMADECA, E. A.; MORGAN, R. G.; BAER, C. C.; BORWANKAR, R. P.; HELLGETH, L. C.; STRANDHOLM, J. J.; HASENHEUTTL, G. L.; KERWIN, P. J.; CHEN, C. C.; KRATOCHVIL, J. F.; LLOYD, W. L. (1989) Microfragmented ionic polysaccharide/protein complex dispersions. European Patent Application 0,340,035, Kraft, Inc.

CHRIST, D.; TAKEUCHI, K. P.; CUNHA, R. L. (2005) Effect of sucrose addition and heat treatment on egg albumen protein gelation. *Journal of Food Science*, v. 70 (3), p. 230-238.

CHU, B.; ZHOU, Z.; WU, G. W.; FARRELL, H. M. (1995) Laser-light scattering of model casein solutions – Effects of high-temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 170, p. 102-112.

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (2003) Disponível em: www.cna.org.br Acesso em: 15 de Out. 2007.

CORREDIG, M., DALGLEISH, D. G. (1996) Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, v 29 (1), p.49-55.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D. G. (1999) The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 233-236.

DALGLEISH, D. G. (1990) Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38 (11), p. 1995–1999.

DALGLEISH, D. G.; LAW, A. J. R. (1988) pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research*, v. 55, p. 529–538.

DALGLEISH, D. G.; LAW, A. J. R. (1989) pH induced dissociation of bovine casein micelles/mineral solubilization and its relation to casein release. *Journal Dairy Research*, v. 56, p. 727-35.

DALGLEISH, D. G.; MORRIS, E. R. (1988) Interactions between carrageenans and casein micelles: Electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. *Food Hydrocolloids*, v. 2, p. 311–320.

DALGLEISH, D. G.; MOURIK, L. V.; CORREDIG, M. (1997) Heat-induced interactions of whey proteins and casein micelles with different concentrations of α -lactalbumin e β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 4806-4813.

DANNENBERG, F.; KESSLER, H. G. (1988) Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, v. 53, p. 258-263.

de KRUIF, C. G. (1997). Skim milk acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 185, p. 19-25.

de KRUIF, C. G.; S. ROEFS, S. P. F. M. (1996). Skim milk acidification at low temperatures: A model for the stability of casein micelles. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v. 50, p. 113-120.

de la FUENTE, M. A.; HEMAR, Y.; SINGH, H. (2004) Influence of κ -carrageenan on the aggregation behaviour of proteins in heated whey protein isolate solutions. *Food Chemistry*, v. 86, p. 1–9.

de WIT, J., N. (1990) Thermal stability and functionality of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 3602-36121.

DEPYPERE, F.; VERBEKEN, D.; THAS, O.; DEWETTINCK, K. (2003) Mixture design approach on the dynamic rheological and uniaxial compression behaviour of milk desserts. *Food Hydrocolloids*, v. 17, p. 311-320.

DICKINSON, E. (1994) Colloidal aspects of beverages. *Food Chemistry*, v. 51, p. 343–347.

DICKINSON, E. (1995) Emulsion stabilization by polysaccharides and protein–polysaccharide complexes. In: *Food polysaccharides and their applications*. Stephen, A. M., Editor. Marcel Dekker Inc., New York, p. 501–515.

DICKINSON, E.; MERINO, L. M. (2002) Effect of sugars on the rheological properties of acid caseinate-stabilized emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, v. 16 (4), p. 321-331.

DOUBLIER, J. L.; CUVELIER, G. (2006) Gums and hydrocolloids: functional aspects. In: *Carbohydrates in food*. Eliasson, A-C (Ed.), CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.

DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. (2000) Protein–polysaccharide interactions. *Current Opinions in Colloid and Interface Science*, v. 5, p. 202–214.

DOYLE, J.; GIANNOULI, P.; PHILIP, K.; MORRIS, E. R. (2000) Effect of K and Ca cations on gelation of k-carrageenan. In: P. A. Williams & G. O. Phillips (Eds.), Gums and stabilizers for the food industry, vol. 11, pp. 158–164. London: Royal Society of Chemistry.

DROHAN, D. D.; TZIBOULA, A.; McNULTY, D.; HORNE, D. S. (1997) Milk protein-carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*, v. 11 (1), p. 101-107.

DUAN, X. Q.; HALL, J. A.; NIKAIDO, H.; QUICHO, F. A. (2001) Crystal structure of the maltodextrin/maltose binding protein complexed with reducing oligosaccharides: flexibility of tertiary structure and ligand binding. *Journal of Molecular Biology*, v. 306, p. 1115-1126.

ELFAGM, A. A., WHEELLOCK, J. V. (1978) Heat interactions between α -lactalbumin, β -lactoglobulin and casein bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 61, p. 159-163.

EMBRAPA – Gado de Leite (2007) Produção, Industrialização e Comercialização de Leite. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/producao.php> Acesso em: 10 Out. 2007.

ETTELAIE, R. (2003) Computer simulation and modeling of food colloids. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 8, p. 415–421.

FAMELART, M., TOMAZEWSKI, J., PIOT, M., PEZENNEC, S. (2003) Comparison of rheological properties of acid gels made from heated casein combined with β -lactoglobulin or egg ovalbumin. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 123-134.

FARREL, H. M.; PESSEN, H.; BROWN, E. M.; KUMOSINSKI, T. F. (1990) Structural insights into the bovine casein micelle - small-angle X-ray - scattering studies and correlations with spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, v. 73 (12), p. 3592-3601.

FURUKI, T. (2000) Effect of stereochemistry on the anti-freeze characteristics of carbohydrates. A thermal study of aqueous monosaccharides at subzero temperatures. *Carbohydrate Research*, v. 323, 185–191.

GASTALDI, E.; LAGAUDE, A.; MARCHESSEAU, S.; de la FUENTE, B. T. (1997) Acid milk gel formation as affected by total solids content. *Journal of Food Science*, v. 62, p. 671-678.

GOFF, H. D. (1999) Dairy Science and Technology Education Series. Disponível em: <<http://www.foodsci.uoquelph.ca/dairyedu/home.html>>. Acesso em 15 de Jan. 1999.

GRINBERG, V.; TOLSTOGUZOV, V. B. (1997) Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, v. 11(2), p. 145–158.

GUSTAW, W.; MLEKO, S. (2007) The effect of polysaccharides sodium chloride on physical properties of processed cheese analogs containing whey proteins. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, v. 62(1), p. 59-62.

HAQUE, Z.; KINSELLA, J. (1988) Interaction between heated κ -casein and β -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stage of complex formation. *Journal of Dairy Research*, v. 55, p.67-80.

HEARLE, J. W. (1982) *Polymers and their properties*, vol. 1, Fundamentals of structure and mechanics, pp. 144, West Sussex: Ellis Horwood.

HEMAR, Y.; HALL, C. E.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. (2002) Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milk protein products. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 371-381.

HERMANSSON, A-M. (1995) The importance of biopolymers in structure engineering. In: *Food Colloids and Macromolecules*. Dickinson, E.; Lorient, D. (Eds.). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, p. 321-327.

HODGE, J. R.; HOFREITER, B. T. (1962) Phenol sulphuric test. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1: 1st ed., p. 380-394. New York: Academic Press.

HOLT, C.; HORNE, D. S. (1996) The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v. 50, p. 85–111.

HORNE, D. S. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 171-177.

HORNE, D. S. (2003) Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 213, p. 255–263.

HOSSAIN, K. S.; MIYANAGA, K.; MAEDA, H.; NEMOTO, N. (2001) Sol-gel transition behavior of pure ι -carrageenan in both salt-free and added salt states. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 442-449.

IBANOGLU, E. (2006) Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chemistry*, v. 90, p. 621–626.

IMESON, A. P.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R. (1977) On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 28, p. 661–668.

JANG, H. D., SWAISGOOD, H. E. (1990) Disulfide bond formation between thermally denatured β -lactoglobulin and κ -casein micelles. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 900-904.

JI, S.; CORREDIG, M.; GOFF, H. D. (2008) Aggregation of casein micelles and κ -carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 56-64.

KALAB, M.; ALLANWOJTAS, P.; PHIPPSTODD, B. E. (1983) Development of microstructure in set-style nonfat yogurt - A review. *Food Microstructure*, v. 2, p. 51-66.

KILARA, A. (1995) Interactions of Ingredients in Food Systems: An Introduction. In: *Ingredient Interactions, Effects on Food Quality*. Gaonkar, A. G., Ed. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 1-12.

KIRCHMEIER, O., EL-SHOBERY, M.; KIRCHMEIER, D. (1984) The heat-induced transition of whey proteins into the casein fraction. *Milchwissenschaft*, v. 39 (10), p.588-590.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina*, v. 37, p. 163-172.

KUDO, S. (1980) The heat stability of milk: formation of soluble proteins and protein-depleted micelles at elevated temperatures. *New Zealand Journal of Dairy Science*, v 15, p. 255-263.

KULMYRZAEV, A.; BRYANT, C.; McCLEMENTS, D. J. (2000a) Influence of sucrose on thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 1593-1597.

KULMYRZAEV, A.; CANCELLIERI, C.; McCLEMENTS, D. J. (2000b) Influence of sucrose on cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 1314-1318.

KUWAJIMA, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins*, v. 6, p.87-103.

LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685.

LAHAYE, M. (2001) Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *Journal of Applied Phycology*, v. 13:173-184.

LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B.; PARKER, A. (1997) Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids*, v. 11, p. 35-40.

LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; MICHON, C.; LAUNAY, B.; PARKER, A.; de KRUIF, C. G. (2000) Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 273-280.

LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. (2000) Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. *Food Research International*, v. 33, p. 665-671.

LAW, A. J. R.; LEAVER, J. (1998) Effects of acidification and storage of milk on dissociation of bovine casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 5008-5016.

LEDWARD, D. A. (1994) Protein-polysaccharide interactions. In: *Protein Functionality in Food Systems*. Hettiarachchy, N.; Ziegler, G. R., Eds. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994, 225–259.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. (1997) Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, v. 30 (7), p. 529-542.

LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. (1998) A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-delta-lactone. *Food Research International*, v. 31, p. 147–155.

LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. (2000) Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono-delta-lactone. *Journal of Dairy Research*, v. 67 (3), p. 415-427.

LUCEY, J. A.; TEO, C. T.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. (1997b) Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, v. 64, p. 591–600.

LUCEY, J. A.; van VLIET, T.; GROLLE, K.; GEURTS, T.; WALSTRA, P. (1997a) Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-delta-lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*, v. 7, p. 389-397.

MANGIONE, M. R.; GIACOMAZZA, D.; BULONE, D.; MARTORANA, V.; SAN BIAGIO, P. L. (2003) Thermoreversible gelation of κ -carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry*, v. 104, p. 95-105.

MARTIN, A., GOFF, H. D., SMITH, A.; DALGLEISH, D. G. (2006) Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*, v. 20 (6), p. 817-824.

MARTINS, P. C.; GUILHOTO, J. J. M. (2001) Leite e derivados e a geração de emprego, renda e ICMS no contexto da economia brasileira. In: GOMES, A. T., LEITE, J. L. B. & CARNEIRO, A. V. (Edits.). *O agronegócio do leite no Brasil*. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora-MG, p. 181-205.

MATTISON, W.; BRITAIN, I. J.; DUBIN, P. L. (1995) Protein-polyelectrolyte phase boundaries, *Biotechnology Progress*, v. 11 (6), p. 632–637.

MCSWINEY, M.; SINGH, H.; CAMPANELLA, O. H. (1994). Thermal aggregation and gelation of bovine β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, v. 8, p. 441-453.

MEUNIER, V.; NICOLAI, T.; DURAN, D. (2000) Structure and kinetics of aggregating κ -Carrageenan studied by light scattering. *Macromolecules*, v. 33, p. 2497–2504.

MEUNIER, V.; NICOLAI, T.; DURAN, D. (2001) Structure of aggregating κ -Carrageenan fractions studied by light scattering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 28, p. 157–165.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. (1998) Gel–sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts. *Food Hydrocolloids*, v. 8 (6), p. 505–527.

MLEKO, S. (1997) Rheological properties of milk and whey protein desserts. *Milchwissenschaft*, v. 52 (5), p. 262-266.

MORA-GUTIERREZ, A.; FARRELL Jr., H. M. (2000) Sugar-Casein interaction in deuterated solutions of bovine and caprine casein as determined by oxygen-17 and carbon-13 nuclear magnetic resonance: A case of preferential interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; v. 48 (8), p. 3245-3255.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. (1993) Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33 (6), p. 431-476.

MORRIS, E. R.; REES, D. A.; ROBINSON, G. (1980) Cation-specific aggregation of carrageenan helices. Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, v. 138, p. 349-362.

MORRIS, V. J. (1998) Gelation of polysaccharides. In: *Functional Properties of Food Macromolecules*. Hill, S. E.; Ledward, D. A.; Mitchell, J. R. (Eds.). Elsevier Applied Science, UK, p. 143-226.

MORRIS, V. J.; CHILVERS, G. R. (1983) Rheological studies of specific cation forms of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, v. 3, p. 129-41.

MULVIHILL, D. M.; DONOVAN, M. (1987) Whey protein and their thermal denaturation – A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, v 11, p. 43-75.

NEISER, S., DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. (2000) Gel formation in heat-treated bovine serum albumin– κ -carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 95–110.

NISHINARI, K., WATASE, M., MIYOSHI, E., TAKAYA, T.; OAKENFULL, D. (1995) Effects of sugar on the gel–sol transition of agarose and κ -carrageenan. *Food Technology*, p. 90–96.

NISHINARI, K.; WATASE, M.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. (1990) κ -Carrageenan gels: effect of sucrose, glucose, urea and guanidine hydrochloride on the rheological and thermal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 1188–1193.

OAKENFULL, D.; MIYOSHI, E., NISHINARI, K.; SCOTT, A. (1999) Rheological and thermal properties of milk gels formed with κ -carrageenan. I. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 525–533.

OLDFIELD, D. J., SINGH, H., TAYLOR, M. W., PEARCE, K. N. (2000) Heat-induced interactions of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk. *International Dairy Journal*, v 10, p. 509-518.

OLDFIELD, D. J.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W. (1998b) Association of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin with the casein micelles in skim milk heated in an ultra-high temperature plant. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 765-770.

OLDFIELD, D. J.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W.; PEARCE, K. N. (1998a) Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot plant. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 311-318.

OLSSON, C.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A-M. (2002) Microstructures of β -lactoglobulin/amylopectin gels on different length scales and their significance for rheological properties. *Food Hydrocolloids*, v. 16, p. 111-126.

OULD ELEYA, M. M.; LENG, X. J.; TURGEON, S. L. (2006) Shear effects on the rheology of β -lactoglobulin/ β -carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, v. 20, p. 946-951.

OULD ELEYA, M. M.; TURGEON, S. L. (2000a) The effects of pH on the rheology of beta-lactoglobulin/kappa-carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, v. 14 (3), p. 245-251.

OULD ELEYA, M. M.; TURGEON, S. L. (2000b) Rheology of kappa-carrageenan and beta-lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, v. 14 (1), p. 29-40.

PAPAGEORGIU, M.; GOTHARD, M. G.; WILLOUGHBY, L. E.; KASAPIS, S.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. (1994) Rheology and structure of gellan–alginate co-gels. In: *Gums and stabilisers for the food industry* Vol. 7, Phillips, G. O.; Williams, P. A.; Wedlock, D. J. (Eds.) Oxford, IRL Press, pp. 345–356.

PELLETIER, E.; VIEBKE, C.; MEADOWS, J.; WILLIAMS, P. A. (2001) Solution rheology of κ -carrageenan in the ordered and disordered conformations. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 946-951.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. E. (1994) Structure-Function Properties of Food Proteins; San Diego, Academic Press, p. 179-204.

PICULELL, L. (1995) Gelling Carrageenans. In: Food Polysaccharides and their Applications. Stephens, A. M. (Ed.). Marcel Dekker: New York.

PICULELL, L.; BORGSTROM, J.; CHRONAKIS, I. S.; QUIST, P.-O.; VIEBKE, C. (1997) Organization and association of κ -carrageenan helices under different salt conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 21, p. 141-153.

PICULELL, L.; LINDMAN, B. (1992) Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences, *Advances in Colloid Interface Science*, v. 41, p. 149–178.

PUGNALONI, L. A.; MATIA-MERINO, L.; DICKINSON, E. (2005) Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: Quantification from confocal microscopy and image analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 42, p. 211–217.

RAO, M. A. (1992) Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid food. In: *Viscoelastic properties of food*. Rao, M. A.; Steffe, J. F. (Eds.) London, Elsevier, p. 3-47.

RIBEIRO, K. O.; RODRIGUES, M. I.; SABADINI, E.; CUNHA, R. L. (2004) Mechanical properties of acid sodium caseinate- κ -carrageenan gels: effect of co-solute addition. *Food Hydrocolloids*, v. 18(1), p. 71-79.

ROCHAS, C.; RINAUDO, W. B. (1980) Activity coefficients of counterions and conformation in κ -carrageenan systems. *Biopolymers*, v. 19, p. 1675–1687.

RODRIGUEZ PATINO, J. M.; RODRIGUEZ NINO, M. R.; SANCHEZ C. C. (2002) Dynamic properties of beta-casein-monoglyceride mixed films at the air-water interface. *Langmuir*, v. 18, p. 8455-8463.

ROEFS, S. P. F. M. (1986) The structure of acid casein gels. A study of gels formed after acidification in the cold. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

ROEFS, S. P. F. M., WALSTRA, P., DALGLEISH, D. G., HORNE, D. S. (1985) Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v. 39, p. 119-127.

ROEFS, S. P. F. M.; GROOT-MOSTERT, A. E. A.; van VLIET, T. (1990) Structure of acid casein gels. 1. Formation and model network. *Colloids and Surfaces*, v. 50, p. 141-159.

SABADINI, E., HUBINGER, M. D.; CUNHA, R. L. (2006) The effects of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins-kappa-carrageenan gels. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 23(1), p. 55-65.

SALAÜN, F.; MIETTON, B.; GAUCHERON, F. (2005) Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 95-109.

SALAZAR-MONTOYA, J. A., RAMOS-RAMÍREZ, E. G.; DELGADO-REYES, V. A. (2002) Changes of the dynamic properties of tamarind (*Tamarindus indica*) gel with different saccharose and polysaccharide concentrations. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 387–391.

SAMANT, S. K.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R.; REGE, D. V. (1993) Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations - Review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 28, p. 547–562.

SANCHEZ, C.; PAQUIN, P. (1997) Protein and protein-polysaccharide microparticles. In: *Food Proteins and Their Applications*. Damodaran, S.; Paraf, A. (Eds.). New York: Marcel Dekker Inc., p. 503-528.

SANCHEZ, C.; SCHMITT, C.; BABAK, V. G.; HARDY, J. (1997) Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. *Nahrung*, v. 41 (6), p. 336–343.

SAVOIE, V. J.; ARNTFIELD, S. D. (1996) Effect of pH and cations on the thermally induced gelation of ovalbumin. *Journal of Texture Studies*, v. 27 (3), p. 287-306.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. (1998) Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38 (8), p. 689 - 753.

SCHORSCH, C.; JONES, M. G.; NORTON, I. T. (1999) Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 89-99.

SCHORSCH, C.; JONES, M. G.; NORTON, I. T. (2000) Phase behavior of pure micellar casein/ κ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 347-358.

SEDLMEYER, F.; DAIMER, K.; RADEMACHER, B.; KULOZIK, U. (2003) Influence of the composition of milk-protein $\kappa/1$ -hybrid-carrageenan gels on product properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 31, p. 13-20.

SEDLMEYER, F.; KULOZIK, U. (2006) Impact of process conditions on the rheological detectable structure of UHT treated milk protein-carrageenan systems. *Journal of Food Engineering*, v. 77 (4), p. 943-950.

SEDLMEYER, F.; KULOZIK, U. (2007) Impact of processing conditions and protein concentration on the assembly of carrageenan milk protein weak gels. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 756–764.

SEMENOVA, M. G.; ANTIPOVA A. S.; BELYAKOVA, L. E. (2002) Food protein interactions with sugar solutions. *Current Opinion in Colloid Interfaces*, v. 7 (5–6), p. 438–444.

SGARBIERI, V. C. (1998) Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. *Boletim da SBCTA*, v. 32 (1), p.105-126.

SGARBIERI, V.C. (1996) Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações. São Paulo: Varela, 517 p.

SINGH H.; FOX, P. F. (1985) Heat stability of milk: pH-dependent dissociation of micellar κ -casein on heating milk at ultra high temperatures. *Journal of Dairy Research*, v. 52 (4), p. 529–538.

SINGH, H., CREAMER, L. K. (1992). Heat stability of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry - I. Proteins*. P. F. Fox. (Ed.). Elsevier, London, p. 621-656.

SINGH, H.; FOX, P. F. (1987) Heat stability of milk: Role of β -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar κ -casein. *Journal of Dairy Research*, v. 54 (4), p. 509–521.

SINGH, H.; MCCARTHY, O. J.; LUCEY, J. A. (1997) Physicochemical properties of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3, Lactose, Water, Salts and Vitamins*, 2nd ed. P. F. Fox (Ed.). Chapman and Hall, London, pp. 469-518.

SINGH, H.; ROBERTS, M. S.; MUNRO, P. A.; TEO, C. T. (1996) Acid-induced dissociation of casein micelles milk: effects of heat treatment. *Journal of Dairy Science*, v.79, p.1340-1346.

SMITH, D. M. (1994) Protein interactions in gels: protein-protein interactions. In: *Protein Functionality in Food Systems*. N. S., Ziegler, G.R. (Eds.). Marcel Dekker, New York, p. 209-223.

SMITS, P.; VAN BROUWERSHAVEN, J. H. (1980) Heat-induced association of β -lactoglobulin and casein micelles. *Journal of Dairy Research*, v. 47 (3), p. 313–325.

SNOEREN, T. H. M.; KLOCK, H. J.; VAN HOOYDONK; DAMMAM, A. J. (1984) The voluminosity of casein micelles. *Milchwissenschaft*, v. 39, p. 461-463.

SNOEREN, T. H. M.; PAYENS, A. J.; JEUNINK, J.; BOTH, P. (1975) Electrostatic interaction between κ -carrageenan and κ -casein. *Milchwissenschaft*, v. 30 (7), p. 393-396.

SPAGNUOLO, P. A.; DALGLEISH, D. G.; GOFF, H. D.; MORRIS, E. R. (2005) Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 371–377.

STAINSBY, G. (1980) Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chemistry*, v. 6, p. 3–14.

STANDING, M.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A-M (1993) Microstructure and rheological behaviour of particulate β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, v. 7, p. 195-212.

STATSOFT INC. (2000) STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK, StatSoft Inc.

STEFFE, J. F. (1996) Rheological methods in food process engineering. Freeman Press, East Lansing, p. 1-93.

STEVENTON, A. J.; GLADDEN, L. F.; FRYER, P. J. (1991) A percolation analysis of the concentration dependence of the gelation of whey protein concentrates. *Journal of Texture Studies*, v. 22, p. 201-218.

SWAISGOOD, H. E. (1982) Proteins. In *Developments in Dairy Chemistry*. P. F. Fox (Ed.), pp. 1 - 59. Applied Science Publisher, London.

SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. (1998) Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 179–193.

TAKEUCHI, K. P. (2003) Análises reológicas e calorimétricas de sistemas-modelo de proteínas do leite adicionados de carragena e sacarose. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

TARODO de la FUENTE, B.; ALAIS, C. (1974) Solvation of casein of casein in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 58, p. 293-300.

THAIUDOM, S.; GOFF, H. D. (2003) Effect of κ -carrageenan on milk protein polysaccharides mixtures. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 763-771.

THOMAS, W. R. (1992) Carrageenan. In: *Thickening and gelling agents for food*. Imeson, A. (Ed.). Glasgow, Blackie Academic and Professional, p. 25-39.

TIMASHEFF, S. N. (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 22, p. 67–97.

TOLSTOGUZOV, V. B. (1991) Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction – Review. *Food Hydrocolloids*, v. 4 (6), p. 429–468.

TOLSTOGUZOV, V. B. (1993) Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. In: *Food Proteins, Structure and Functionality*. Schwenke, K. D.; Mothes, R. (Eds.). Weinheim: VCH, p. 203–209.

TOLSTOGUZOV, V. B. (1996) Structure-property relationships in foods. In: *Macromolecular Interactions in Food Technology*. Parris, N., Kato, A., Creamer, L. K., and Pearce, J. (Eds.). Washington, DC: ACS Symposium Series 650, p. 2–14.

TOLSTOGUZOV, V. B. (1997) Protein-polysaccharide interactions. In: *Food proteins and their applications*. S. Damodaran; A. Paraf (Eds.), p. 171–198. New York: Marcel Dekker.

TOLSTOGUZOV, V. B. (1998) Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: *Functional properties of food macromolecules*, 2nd Ed. Hill, .E.; Mitchell, J. R.; Ledward, D. A. (Ed.). Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, p. 642-667.

TORCHINSKY, Y. M. (1981) *Sulfur in proteins*. Pergamon Press: Oxford, U. K.

TOTOSAUS, .A; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. (2002) A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 589–601.

TZIBOULA, A.; HORNE, D. S. (1999a) Influence of milk proteins on κ -carrageenan gelation. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 359-364.

TZIBOULA, A.; HORNE, D. S. (1999b) Influence of whey protein denaturation on κ -carrageenan gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 12, p. 299–308.

van den BERG, L.; van VLIET, T.; van der LINDEN, E.; van BOEKEL, M.; van der VELDE, F. (2007) Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. *Food Hydrocolloids*, 21 (5-6), p. 961-976.

van VLIET, T.; LUCEY, J. A.; GROLLE, K.; WALSTRA, P. (1997) Rearrangements in acid-induced casein gels during and after gel formation. In *Food Colloids; Proteins, Lipids and Polysaccharides*. E. Dickinson; B. Bergenstlhl (Eds.), pp. 335 - 345. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

van VLIET, T.; van DIJK, H. J. M.; ZOON, P.; WALSTRA, P. (1991) Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid and Polymer Science*, v. 269, p. 620-627.

VASBINDER, A. J., ALTING, A. C.; de KRUIF, C. G. (2003) Quantification of the heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, v. 31 (1/4), p. 115–123.

VERBEKEN, D., BAEL, K.; THAS, O.; DEWETTINCK, K. (2006) Interactions between kappa-carrageenan, milk proteins modified starch in sterilized dairy desserts. *International Dairy Journal*, v. 16 (5), p. 482-488

VERHEUL, M.; ROEFS, S. P. F. M. (1998) Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, v. 12, p. 17-24.

VÉTIER, N.; DESOBRY-BANON, S.; OULD ELEYA, M. M.; HARDY, J. (1997) Effect of temperature and acidification rate on the fractal dimension of acidified casein aggregates. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 3161-3166.

VIEBKE, C.; BORGSTROM, J.; CARLSSON, I.; PICULELL, L.; WILLIAMS, P. A. (1998) A differential scanning calorimetry study of κ -carrageenan in the NaCl/NaI/CsI/CsCl systems and analysis by Poisson–Boltzmann calculations. *Macromolecules*, v. 31, p. 1833-1842.

WALKENSTRÖM, P.; KIDMAN, S.; HERMANSSON, A–M; RASMUSSEN, P. B.; HOEGH, L. (2003) Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, v 17 (5), p. 593-603.

WALSTRA, P. (1990) On the fractal nature of the structure of acid casein gels. *Colloids and Surfaces*, v. 51, p. 159-170.

WALSTRA, P. (1999) Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, v. 9, p. 189-192.

WALSTRA, P. (2003) *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. (1984) *Dairy Chemistry and Physics*. New York: John Wiley and Sons.

WHITTAKER, L. E.; AL-RUQAIE, I. M.; KASAPIS, S.; RICHARDSON, R. K. (1997) Development of composite structures in the gellan polysaccharide/sugar system.

WONG, D. W. S; CAMIRAND, W. M.; PAVLATH, A. E. (1996) Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v 36 (8), p. 807-844.

XIA, J.; DUBIN, P. L. (1994) Protein-polyelectrolyte complexes. In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Dubin, P. L., Bock, J., Davis, R., Schulz, D. N., and Thies, C. (Eds.). Berlin: Springer-Verlag, p. 247-271.

XIONG, Y. L.; KINSELLA, J. E. (1990) Mechanism of urea-induced whey protein gelation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 38, p. 1887–1891.

YE, A. (2007) Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 42 (12), p. 1-10.

YUGUCHI, Y.; THUY, T. T. T.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K. (2002) Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*, v. 16 (6), p. 515-522.

ZASYPKIN, D., BRAUDO, E.; TOLSTOGUZOV, V. B. (1997) Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, v. 11, p. 159–170.

ZEMAN, L.; PATTERSON, D. (1972) Effects of the solvent on polymer incompatibility in solution. *Macromolecules*, v. 5, p. 513-521.

ZIEGLER, G. R.; FOEGEDING, E. A. (1990) The gelation of proteins. *Advanced Food and Nutrition Research*, v. 34, p. 203–298.

ZOON, P.; van VLIET, T.; WALSTRA, P. (1988) Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 2. The effect of temperature. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v. 42, p. 249-269.

Anexo

Súmula curricular referente ao período de Doutorado (2003 a 2007)

Artigos completos publicados em periódicos

1. TAKEUCHI, K. P., SABADINI, E., CUNHA, R. L. Análise das propriedades mecânicas de cereais matinais durante o processo de absorção de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p. 78 - 85, 2005.
2. CHRIST, D., TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Effect of sucrose addition and heat treatment on egg albumen protein gelation. **Journal of Food Science**, v.70, p. E230 - E238, 2005.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (completo)

1. PICONE, C. S. F., TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Effect of pH and heat treatment on the mechanical properties and water-holding capacity of milk proteins gels In: V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA, 2005, Puerto Vallarta - México. **Anales del V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA**, 2005. v. III. p. III 74-1 – III 74-5
2. TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Mechanical properties of mixed gels of kappa-carrageenan and sodium caseinate In: V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA., 2005, Puerto Vallarta - México. **Anales del V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA**, 2005. v. III. p. III 78-1 – III 78-4
3. TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Rheological properties of mixed gels of kappa-carrageenan and sodium caseinate In: V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA, 2005, Puerto Vallarta - México. **Anales del V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA**, 2005. v. III. p. III 77-1 – III 77-5
4. TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Avaliação do processo de gelificação de sistemas mistos de proteínas do leite e k-carragena contendo sacarose. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife - PB. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2004.
5. TAKEUCHI, K. P., COSTA-NETTO, A. P., MENOSSI, M., CUNHA, R. L. Effects of protein interactions in the water binding behavior for gels of milk proteins-sucrose-carrageenan In: IX International Congress on Engineering and Food - ICEF, 2004, Montpellier. **Proceedings of IX International Congress on Engineering and Food**, 2004.
6. CHRIST, D., TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Influence of sucrose on the thermal denaturation and gelation of egg albumen In: IX International Congress on Engineering and Food - ICEF, 2004, Montpellier. **Proceedings of IX International Congress on Engineering and Food**, 2004.
7. PICONE, C. S. F., TAKEUCHI, K. P., CHRIST, D., SATO, A. C. K., CUNHA, R. L. Influência do tratamento térmico e acidificação na textura de géis de proteínas do leite (CBCTA) In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife - PB. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2004. p. 1002 - 1002

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. PICONE, C. S. F., TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Influência do pH e adição de caseinato de sódio na microestrutura e capacidade de retenção de água de géis de proteínas do soro de leite. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006.

2. MONTEIRO, M. G., TAKEUCHI, K. P., CAVALLIERI, A. L. F., PICONE, C. S. F., CUNHA, R. L. Influência do pH e concentração de k-carragena nas propriedades mecânicas e microestrutura de géis de isolado protéico de soja. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba. **Anais de XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006.

3. VALIM, M. D., TAKEUCHI, K. P., CAVALLIERI, A. L. F., CUNHA, R. L. Influência do pH sobre as interações entre proteínas do soro de leite e goma arábica (T0791). In: XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2006, Campinas. **CD-ROM Anais do XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, 2006.

4. MONTEIRO, M. G., TAKEUCHI, K. P., CAVALLIERI, A. L. F., CUNHA, R. L. Propriedades reológicas e microestrutura de géis de isolado protéico de soja e k-carragena (T0792). In: XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2006, Campinas. **CD-ROM Anais do XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, 2006.

5. CAVALLIERI, A. L. F., TAKEUCHI, K. P., MENOSSI, M., CUNHA, R. L. Interactions in cold set whey protein gels In: VI Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA., 2005, Campinas-SP. **CD dos Resumos do VI Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2005.

6. VALIM, M. D., CAVALLIERI, A. L. F., TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Mechanical properties and microstructure of acidified whey protein and arabic gum gels In: VI Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA, 2005, Campinas-SP. **CD de Resumos do VI Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2005.

7. PICONE, C. S. F., TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Influência do tratamento térmico e acidificação na textura de géis de proteínas do leite (Congresso Interno de IC) In: XII Congresso Interno de Iniciação Científica, 2004, Campinas. **CD do XII Congresso Interno de Iniciação Científica**, 2004. p. T654 - T654

8. TAKEUCHI, K. P., CUNHA, R. L. Rheological properties of milk proteins-k-carrageenan-sucrose systems - A study of the interactions in the formed gel In: IV Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 2003, Valparaíso - Chile. **Programa y Libro de Resúmenes del IV Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos**, 2003. v.01. p. 207 – 208.