



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



GELEIFICAÇÃO A FRIO DE ISOLADOS PROTÉICOS DE SOJA

ADRIANA CECÍLIA PINTO DINIZ

M.Sc. em Ciência de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de **Doutor** em Alimentos e Nutrição.

Prof^a Dr^a. Flavia Maria Netto

ORIENTADORA

Campinas
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D615g Diniz, Adriana Cecília Pinto
Geleificação a frio de isolados protéicos de soja / Adriana
Cecília Pinto Diniz. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Flavia Maria Netto
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos
1. Viscosidade. 2. Proteínas de soja. 3. Agregação. 4.
Desnaturação térmica. 5. Propriedades funcionais. I. Netto,
Flavia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Soy protein isolate cold-set gels

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Palavras-chave em inglês (Keywords): Viscosity, Soy protein, Thermal denaturation,
Functional propertie

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Flavia Maria Netto

Rosiane Lopes da Cunha

Jaime Amaya-Farfán

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Rosemary Aparecida de Carvalho

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

ADRIANA CECÍLIA PINTO DINIZ

Bióloga

**GELEIFICAÇÃO A FRIO DE ISOLADOS
PROTÉICOS DE SOJA**

Profª Drª. Flavia Maria Netto

ORIENTADORA

Campinas
2007

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flavia Maria Netto
(ORIENTADORA) – DEPAN/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
(MEMBRO) – DEPAN/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(MEMBRO) – DEPAN/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha
(MEMBRO) – DEAN/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
(MEMBRO) – ITAL

Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho
(MEMBRO) – USP

A Ciência pode ser encarada sob dois aspectos diferentes. Ou se olha para ela tal como vem exposta nos livros de ensino, como coisa criada, e o aspecto é o de um todo harmonioso, onde os capítulos se encadeiam em ordem, sem contradições. Ou se procura acompanhá-la no seu desenvolvimento progressivo, assistir à maneira como foi sendo elaborada, e o aspecto é totalmente diferente - descobrem-se hesitações, dúvidas, contradições, que só um longo trabalho de reflexão e apuramento consegue eliminar, para que surjam outras hesitações, outras dúvidas, outras contradições. Descobre-se ainda qualquer coisa mais importante e mais interessante: - no primeiro aspecto, a Ciência parece bastar-se a si própria, a formação dos conceitos e das teorias parece obedecer só a necessidades interiores; no segundo, pelo contrário, vê-se toda a influência que o ambiente da vida social exerce sobre a criação da Ciência. A Ciência, encarada assim, aparece-nos como um organismo vivo, impregnado de condição humana, com as suas forças e suas fraquezas e subordinado às grandes necessidades do homem na sua luta pelo entendimento e pela libertação; aparece-nos, enfim, como grande capítulo da vida humana social (Bento de Jesus Caraça, 1975, p. XIII).

*À minha florzinha Nina, que a vida me presenteou,
ao meu companheiro Paulo e a toda minha família
linda, pela amizade, apoio e amor incondicional,
durante a minha caminhada até aqui,
a Eles dedico.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, símbolo de amor e fonte inesgotável de força, onde busco sempre a luz do discernimento e a paciência para seguir confiante.

A todos vocês que compartilharam comigo os momentos de alegrias e também as dificuldades durante a realização deste trabalho, a minha profunda gratidão e respeito.

À *Profa. Dra. Flavia Maria Netto* pela orientação e dedicação com o trabalho, experiência, discussões técnicas, enfim, pelo aprendizado.

À *Profa. Dra. Maria Cristina Añón* pela oportunidade de aprender com sua experiência, interesse com o trabalho e, em especial, pela sua generosidade e carinho durante a minha permanência no CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo em Criotecnología – UNLP) - La Plata /AR.

À *todos os membros da banca* pela atenção e valiosa contribuição nas correções.

À *BUNGE Alimentos* pelo fornecimento da farinha de soja e amostras comerciais de isolado protéico de soja.

Ao *Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas/Biológicas e Agrícolas* em especial ao pesquisador Adilson Fatoratto pela gentileza e colaboração na análise densitométrica dos géis de eletroforese.

A *Profª Eneida de Paula do Instituto de Biologia* pela gentileza em disponibilizar o espectrofotofluorômetro para as medidas de fluorescência.

À *amiga Sara Molina* pela amizade, solidariedade e pelo companheirismo incondicional em La Plata (AR). Por suas poesias, sensibilidade e inesquecíveis encontros.

Às *minhas tias Dinda e Neli* pela valiosa e imprescindível ajuda e carinho com a Nina, para que fosse possível finalizar este trabalho, pelo amor e dedicação comigo durante toda a minha vida.

Ao *Cosme* da secretaria da pós-graduação, pela competência e gentileza sempre que o solicitei.

Aos funcionários da Biblioteca da FEA em especial, a Cláudia, Geraldo e Kreuzza pela atenção e simpatia.

À Cidinha e Sônia da secretaria do DEPAN, pela atenção e simpatia.

Aos funcionários do DEPAN pela atenção, colaboração e disponibilidade.
Francisco (Chico), Edma M. de Araújo
e Carla De Marco

À funcionária Eliana Motta (Li) pela valiosa ajuda técnica, discussões científicas, e especialmente, pelo carinho, amizade e atenção em toda a minha permanência no Laboratório de Bioquímica Nutricional.

À funcionária Elizabete (Bete) pelo carinho, incentivo e solidariedade em todos os momentos no Laboratório de Bioquímica Nutricional.

A Nice do Lab. de Análise Sensorial pelos seus abraços e palavras de incentivo.

À amiga Su (Suziley) minha querida amiga, a quem tenho que agradecer sempre pelas horas de carinho, cuidados, confiança, incentivo e de família, compartilhados no nosso “quintal”, enfim, por ter tornado mais feliz as minhas tantas voltas à Campinas e por me emocionar simplesmente pela sua amizade e pelos “mimos” da sua querida mãezinha D. Cecília.

À amiga Lu (Lucia) e querida companheira de Lab e de luta, a quem não tenho palavras para agradecer sua valiosa análise crítica durante todo o desenvolvimento do trabalho, atenção, disponibilidade e ajuda sempre que precisei, pela sua energia e constante incentivo.

À amiga Soninha e querida companheira de Lab e luta, amiga generosa e de sorriso encantador, pelo constante incentivo e ajuda.

À amiga Nono (Hulda Noemi) por sua sensibilidade, fé e entusiasmo com a vida, pelos momentos felizes de reflexão e companheirismo.

À amiga Ja (Janai) amiga guerreira, companheira, pela confiança e por todos os momentos especiais vividos juntas.

À amiga Fer (Fernanda) minha primeira amiga na FEA, minha irmã mais nova, também minha “família” em Campinas, tantas coisas vividas juntas, amiga amorosa e dedicada.

À amiga Neiva pelos muitos aprendizados, mulher admirável e que tenho muitas saudades.

À amiga Valéria (Val) pelo carinho que me acolheu em sua casa num momento delicado e difícil do doutorado mas também pelos momentos agradáveis que passamos juntas e com a Clara.

À amiga Renata Torrezan pelo carinho, atenção e momentos de alegria.

À amiga Carol pela sua alegria, carinho e amizade durante o tempo que passamos juntas.

Aos amigos do DEPAN Karina Sampaio, Dora, Selma, Bete, Andréa, Mariza, Patrícia Trevizam, Maria Inês, Cláudia, Fábio, Luciano, Márcio, Lílian, Liz.

As amigas da FEA Ângela (DEA) pela atenção e troca de conhecimentos e a Carol (DTA) pela amizade e carinho.

Aos meus pais Wilma e Diniz, minhas irmãs Wi e Cris e tios queridos pelo amor, cuidados, valiosas palavras de incentivo e apoio em todos os meus passos, pela ajuda e amor incondicional a Nina, meu eterno agradecimento. Amo vocês!

Ao meu companheiro Paulo Henrique pelo tempo compartilhado, paciência e dedicação, principalmente nos últimos dias de tese.

A meus sogros Diana e Hélio pela amizade e carinho, pelo apoio e cuidados comigo e com a Nina.

A minha flor Nina e meus sobrinhos lindos Alceu e Noel fontes inesgotáveis de amor, força, delicadeza, alegria e esperança.

Aos amigos do DEPAN porque todos foram sempre generosos comigo.

Aos amigos do CIDCA/UNLP-AR “Gracias” pelos momentos especiais durante a minha passagem pelo CIDCA e apoio.

Ao CNPq e a CAPES por terem contribuído com suas bolsas para a minha formação científica.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	XXIII
ÍNDICE DE TABELAS	XXXV
LISTA DE ABREVIACÕES	XXXVII
RESUMO	XLI
ABSTRACT	XLV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Proteínas de soja	5
3.1.1 Caracterização das proteínas de soja	5
3.1.2 Efeito do tratamento térmico nas proteínas da soja	8
3.1.3 Isolado protéico de soja (IPS)	11
3.2 Propriedades funcionais das proteínas	12
3.2.1 Propriedades funcionais de hidratação	14
3.2.2 Geleificação de proteínas globulares	18
3.2.2.1 Fatores intrínsecos e extrínsecos	21
3.2.2.2 Géis protéicos induzidos termicamente	23
3.2.2.3 Géis protéicos induzidos em condições a frio	26

4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Material	32
4.2 Obtenção do isolado protéico de soja (IPS)	32
4.3 Caracterização dos isolados protéicos de soja (IPS)	34
4.3.1 Composição centesimal dos isolados de soja (IPSs)	34
4.3.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	34
4.3.3 Fluorescência intrínseca	35
4.3.4 Turbidez	35
4.3.5 Solubilidade dos IPSs	36
4.3.6 Perfil eletroforético das proteínas totais e solúveis	36
4.3.7 Grupo sulfidril livre (SH)	37
4.3.8 Perfil de hidrofobicidade superficial	38
4.3.9 Perfil de hidrofobicidade e hidrofiliicidade	39
4.3.10 Perfil de distribuição de massa molecular aparente	39
4.3.11 Determinação da capacidade de absorção de água (CAA)	40
4.3.12 Comportamento reológico	40
4.4 Obtenção e caracterização dos géis protéicos de soja obtidos a frio	
4.4.1 Obtenção do gel a frio de isolados de soja	41
4.4.2 Caracterização reológica dos géis	42
4.4.2.1 Perfil de textura (TPA)	42
4.4.2.2 Viscoelasticidade	42
4.4.3 Solubilidade dos géis	43
4.4.4 Perfil eletroforético das frações protéicas solúveis nas diferentes soluções aquosas	43
4.4.5 Capacidade de retenção de água	44
4.4.6 Microscopia	44
4.5 Análise estatística	45

5. RESULTADOS e DISCUSÃO	46
5.1 Caracterização estrutural dos isolados protéicos de soja (IPS)	46
5.1.1 Composição centesimal dos isolados de soja (IPSs)	46
5.1.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	47
5.1.3 Fluorescência intrínseca	49
5.1.4 Turbidez	51
5.1.5 Solubilidade dos IPSs	52
5.1.6 Perfil eletroforético das proteínas totais e solúveis	54
5.1.7 Grupo sulfidril livre (SH)	59
5.1.8 Perfil de hidrofobicidade superficial	61
5.1.9 Perfil de hidrofobicidade e hidrofiliidade	63
5.1.10 Perfil de distribuição de massa molecular aparente	65
5.1.11 Determinação da capacidade de absorção de água (CAA)	67
5.1.12 Comportamento reológico	71
5.2 Geleificação a frio de isolados protéicos de soja	76
5.2.1 Avaliação visual dos géis	76
5.2.2 Caracterização reológica	81
5.2.2.1 Análise do perfil de textura (TPA)	81
5.2.2.2 Viscoelasticidade	84
5.2.3 Solubilidade dos géis	90
5.2.4 Perfil eletroforético das frações protéicas solúveis nas diferentes soluções aquosas	93
5.2.5 Capacidade de retenção de água	98
5.2.6 Microscopia	100
5.3 Discussão geral	104
6. CONCLUSÃO	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo estrutural das partículas de formação de gel. Esquema proposto por Marangoni et al. (2000). 20
- Figura 2.** Esquema da geleificação de proteínas globulares induzida pelo calor (TOTOSAUS et al, 2002). T = temperatura e T_D = temperatura de desnaturação .. 24
- Figura 3.** Conversão da proteína globular nativa em rede protéica de acordo com o procedimento de geleificação induzida pelo calor e a frio. 27
- Figura 4.** Fluxograma de obtenção do isolado protéico de soja. 33
- Figura 5.** Espectro de fluorescência dos isolados de soja sem tratamento térmico (T0), comercial (MP) e isolados tratados termicamente: **a** - T0, T2, T3 e MP; **b** - T0, T4, T5 e MP; **c** - T0, T1 e MP. 50
- Figura 6.** Solubilidade dos isolados protéicos de soja T0 (nativo) e MP (comercial) e dos isolados tratados termicamente: T1; T2; T3; T4 e T5. Letras minúsculas diferentes em cada meio de extração e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente ($p<0,05$).
..... 53
- Figura 7.** Eletroforese SDS-PAGE, em condições não redutoras, das proteínas totais do isolado de soja sem tratamento térmico (T0) (**2**) e dos isolados tratados termicamente: T4 (**3**); T5 (**4**); T1 (**5**); T2 (**6**); T3 (**7**) e IPS MP (**8**). Padrão de baixa massa molecular (**1**). O gráfico à direita mostra a porcentagem da área das subunidades α' , α e β da fração 7S e dos polipeptídeos ácido e básico da fração 11S em relação à área total, obtida por análise de densitometria.
..... 55

Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE das frações solúveis em **a)** AG, **b)** TRIS/GLI e **c)**T/U-SDS e **d)** T/U-SDS/DTT, ambiente não redutor, do isolado de soja sem tratamento térmico (T0) **(2)** e tratados termicamente. Os isolados tratados termicamente correspondem aos (proteína, temperatura, tempo): T4 **(3)**; T5 **(4)**; T1 **(5)**; T2 **(6)**; T3 **(7)** e IPS MP (comercial) **(8)**. Padrão de baixa massa molecular **(1)**. Os gráficos à direita mostram a porcentagem da área das subunidades α' , α e β da fração 7S e dos polipeptídeos ácido e básico da fração 11S em relação à área total, obtidas por densitometria. 56

Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE das frações solúveis em TRIS/GLI **(a)** e T/U-SDS **(b)** e T/U-SDS/DTT **(c)** do isolado de soja sem tratamento térmico (T0) **(2)** e tratados termicamente: T4 **(3)**; T5 **(4)**; T1 **(5)**; T2 **(6)**; T3 **(7)** e IPS MP **(8)**. Padrão de baixa massa molecular **(1)**. 58

Figura 10. Hidrofobicidade superficial determinada com ANS das amostras de isolado de soja sem tratamento térmico (T0) e comercial (MP) e dos isolados tratados termicamente: T1; T2; T3; T4 e T5. 61

Figura 11. Cromatogramas CLAE-FR dos isolados protéicos de soja: sem tratamento térmico T0 (controle); tratados termicamente T1, T2, T3, T4, T5 e comercial (MP). 64

Figura 12. Cromatogramas CLAE-EM dos isolados protéicos de soja: T0 (sem tratamento térmico); tratados termicamente T1, T2, T3, T4, T5 e MP (comercial). 66

Figura 13. Capacidade de absorção de água (CAA) dos isolados de soja: T0 (sem tratamento); tratados termicamente: T1, T2, T3, T4, T5 e MP (comercial). Letras diferentes em cada amostra de isolado indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$). 67

Figura 14. Cinética de absorção espontânea de água (CAA) dos isolados de soja captada por grama de proteína em pó em função do tempo (min). As amostras de IPSs são: T0 (sem tratamento); tratados termicamente T1, T2, T3, T4, T5 e MP (comercial).

..... 69

Figura 15. Capacidade de absorção de água (CAA) das dispersões protéicas dos isolados de soja T0 (sem tratamento); tratados termicamente T1, T2, T3, T4, T5 e MP (comercial). As dispersões foram liofilizadas após adição de CaCl_2 (0, 2,8, 4, 7,1, 7,7, 12 e 20 mg de Ca^{2+} /g de proteína).

70

Figura 16. Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação das dispersões de isolado de soja (8% p/p) sem e com presença de CaCl_2 (10 mM) do isolado de soja sem tratamento térmico (T0); tratados termicamente T1, T2, T3, T4, T5 e MP (comercial).

73

Figura 17. Índice de consistência (k) calculado para as dispersões de isolado protéico de soja nativo (T0) e modificados termicamente T1; T2; T3; T4; T5 e comercial (MP), preparadas sem presença de cálcio.

74

Figura 18. Viscosidade aparente de dispersões protéicas de soja a 8% (p/p) preparadas sem e com adição de CaCl_2 (10 mM) dos isolados tratados termicamente T1; T2; T3; T4; T5 e MP (isolado comercial). Estes valores de viscosidade foram tomados da curva de tensão de cisalhamento versus taxa de deformação (de ida) em um determinado ponto da taxa de deformação (72 s^{-1}). Sobrescritos diferentes para cada isolado, na mesma concentração de CaCl_2 (sem ou 10 mM CaCl_2), indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

75

Figura 19. Avaliação da formação de gel dos isolados de soja, tratados termicamente, em diferentes condições de concentração protéica (%) e CaCl_2 (mM). Os isolados correspondem aos: T2; T3; T4; T5 e IPS MP (comercial).....

77

Figura 20. Géis protéicos de soja (12% p/p), sem (a) e com presença de CaCl ₂ 5 mM (b) ou 15 mM (c), obtidos dos isolados de soja tratados termicamente. Os isolados correspondentes aos: T2; T3; T4 e T5.	79
Figura 21. Géis protéicos de soja (12% p/p), sem e com presença de CaCl ₂ (5 ou 15 mM), obtidos do isolados de soja comercial (MP).	80
Figura 22. Géis protéicos de soja (14% p/p) preparados sem e com adição de CaCl ₂ , obtidos dos isolados de soja T3 e T5.....	81
Figura 23. Dureza, coesividade e adesividade dos géis protéicos de soja (12%– a, c, e e 14% de proteína (p/p) – b, d, f) formados a frio nas concentrações de CaCl ₂ 0, 5 e 15 mM. Os isolados correspondem aos seguintes tratamentos (prot.%, temperatura, tempo): T2; T3; T4; T5 e IPS MP (comercial).	82
Figura 24. G' e G'' em função da concentração de CaCl ₂ dos isolados. Os isolados correspondem aos: T2; T3; T4 e T5. As linhas contínuas referem-se à variação do módulo G' e as linhas pontilhadas à variação do G''.	86
Figura 25. Variação de G' e G'' em função da concentração de CaCl ₂ do IPS MP (comercial). As linhas inteiras referem-se à variação do módulo G', enquanto as linhas pontilhadas à variação do G''.	87
Figura 26. Variação da tan δ em função da concentração de CaCl ₂ , determinada em 0,1 Hz de frequência, para cada amostra de isolado de soja representada pelos isolados tratados termicamente: T2; T3; T4; T5 e IPS MP (comercial).....	88

Figura 27. Variação de η^* em função da frequência oscilatória dos géis obtidos na ausência e na presença de CaCl_2 (5 e 15 mM). Os géis dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T2; T3; T4; T5 e IPS MP (comercial). 89

Figura 28. Solubilidade dos géis protéicos de soja (12% p/p), induzidos a frio sem a presença de CaCl_2 , em: água destilada (AG); solução tampão Tris-HCl/Glicina/ Na_2EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI) e solução tampão HCl/Glicina/ Na_2EDTA , contendo 6 M uréia e 0,5% SDS (T/U-SDS). Os géis dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T2; T3; T4; T5 e IPS MP (comercial). Letras minúsculas diferentes em cada meio de extração e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$). 91

Figura 29. Solubilidade dos géis protéicos de soja (12% p/p), induzidos a frio com a presença de CaCl_2 (15 mM), em: água destilada (AG); solução tampão Tris-HCl/Glicina/ Na_2EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI) e solução tampão HCl/Glicina/ Na_2EDTA , contendo 6 M uréia e 0,5% SDS (T/U-SDS) e solução de 15 mM CaCl_2 . Os géis dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T2; T3; T4; T5 e IPS MP (comercial). Letras minúsculas diferentes em cada meio de extração e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$). 92

Figura 30. Eletroforese SDS-PAGE, em ambiente não redutor, das frações solúveis em AG, TRIS/GLI e T/U-SDS dos géis protéicos de soja (12% p/p) formados a frio sem adição do CaCl_2 . Os géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T2 (2); T3 (3); T4 (4); T5 (5) e IPS MP (comercial) (6). Padrão de baixa massa molecular (1). 95

Figura 31. Eletroforese SDS-PAGE, em ambiente não redutor, das frações solúveis em AG, TRIS/GLI e T/U-SDS dos géis protéicos de soja (12% p/p) formados a frio com adição de CaCl₂ (15 mM CaCl₂). Os géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T2 (2); T3 (3); T4 (4); T5 (5) e IPS MP (comercial) (6). Padrão de baixa massa molecular (1). 96

Figura 32. Eletroforese SDS-PAGE das frações solúveis em AG (a, d), TRIS/GLI (b, e) e T/U-SDS (c, f) dos géis protéicos de soja (12% p/p) formados a frio sem (a, b, c) e com adição de 15 mM CaCl₂ (d, e, f). Os géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T2 (2); T3 (3); T4 (4); T5 (5) e IPS MP (comercial) (6). Padrão de baixa massa molecular (1). 97

Figura 33. Capacidade de retenção de água dos géis protéicos de soja (12% p/p), tratados termicamente, preparados sem a presença de CaCl₂ e com adição de CaCl₂ (5 e 15 mM). Os isolados tratados termicamente correspondem aos: T2; T3; T4 e T5. Letras minúsculas diferentes em cada concentração de CaCl₂ e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente (p<0,05). 99

Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura (MEV), com aumento de 300x, de géis protéicos de soja induzidos a frio sem (a, d, g) e com presença de 15 mM CaCl₂ (b, e, h) e com aumento de 2300x, de géis protéicos de soja com 15 mM CaCl₂ (c, f, i). Os isolados tratados termicamente (prot.%, temperatura, tempo) correspondem aos: T3 (3%,80°C,30') – a, b, c; T5 (5%,80°C,30') – d, e, f; e o isolado comercial (MP) – g, h, i. 101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Frações protéicas da soja.	06
Tabela 2. Isolados protéicos de soja produzidos a partir de dispersões com diferentes concentrações de proteína e diferentes tratamentos térmicos (temperatura e tempo)	34
Tabela 3. Composição centesimal dos isolados protéicos de soja (IPs) sem tratamento térmico (T0), tratados termicamente (T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30')) e comercial (MP).....	46
Tabela 4. Valores médios de entalpia de transição (ΔH) e temperatura de desnaturação (T_d) dos isolados de soja (14%) sem presença de solução salina e após adição de CaCl_2 (12,5 mM), medidas por DSC. Os isolados de soja correspondem aos: T0 (sem tratamento), tratados termicamente (T1; T2; T3; T4; T5) e MP (comercial).....	47
Tabela 5. Transmitância (%) das dispersões dos isolados protéicos de soja nativo (T0) e tratados termicamente. Os isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T1; T2; T3; T4 e T5.	52
Tabela 6. Teor de grupos SH livres ($\mu\text{mol SH/g}$ de proteína) do isolado nativo (T0), dos isolados de soja que receberam tratamento térmico (T1, T2, T3, T4 e T5) e do comercial (MP). Os isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T1; T2; T3; T4 e T5	60

LISTA DE ABREVIACÕES

λ_{\max}	Emissão máxima
ΔH	Entalpia de desnaturação
η_{app}	Viscosidade aparente
η^*	Viscosidade dinâmica
ANS	cido 8-anilino naftaleno-sulfônico
CAA	Capacidade de absorção de gua
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CDV	Calorimetria diferencial de varredura
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular
CRA	Capacidade de retenção de gua
DTT	Ditiotreitolo
EDTA	<i>(Ethylenediamine-tetraacetic acid)</i> cido etilindiamino tetra-acético
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
IPS	Isolado protéico de soja
K	ndice de Consistência
kDa	Kilo Dalton
MP	Isolado protéico de soja comercial
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
SDS	<i>(sodium dodecyl sulfate)</i> dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>(Polyacrylamide gel electrophoresis)</i> eletroforese em gel de poliacrilamida
SH	Sulfidrila livre
T0	Isolado protéico de soja sem tratamento térmico
T1	Isolado protéico de soja tratado termicamente com 5 % de proteína, a 60°C por 15 min

T2	Isolado protéico de soja tratado termicamente com 3 % de proteína, a 80°C por 15 min
T3	Isolado protéico de soja tratado termicamente com 3 % de proteína, a 80°C por 30 min.
T4	Isolado protéico de soja tratado termicamente com 5 % de proteína, a 80°C por 15 min.
T5	Isolado protéico de soja tratado termicamente com 5 % de proteína, a 80°C por 30 min.
Td	Temperatura de desnaturação
TFA	Ácido trifluoroacético
Trp	Triptofano
UV-VIS	Ultravioleta

RESUMO

Em algumas aplicações em alimentos, a indução da geleificação a temperaturas altas pode ser indesejável. Alguns produtos de soja quando submetidos ao tratamento térmico, mesmo que moderado, desenvolvem sabores e aromas não desejáveis, limitando sua aplicação. A produção de géis a frio envolve essencialmente duas etapas: a formação de uma dispersão estável de agregados de proteína obtida após o aquecimento da solução protéica e a indução da geleificação por redução do pH ou adição de sal. Ao contrário da geleificação induzida pelo calor, no processo de geleificação a frio a etapa de ativação da proteína, a desnaturação térmica, não ocorre simultaneamente às etapas de agregação e geleificação, permitindo determinar as propriedades dos agregados após o aquecimento e as propriedades finais do gel. Embora géis termicamente formados de proteínas de soja tenham sido extensivamente estudados, pouco se conhece sobre a capacidade das proteínas de soja de formarem gel a frio. O presente estudo investigou o efeito do tratamento térmico na fase de produção do isolado protéico de soja (IPS) e o efeito da adição de CaCl_2 na formação a frio de estrutura tipo gel de IPS. IPS foi obtido a partir de farinha desengordurada de soja comercial, e, após a etapa de neutralização, tratado a 60 ou 80°C por 15 ou 30 min., variando-se a concentração protéica (3 e 5%), para obtenção de isolados com agregados de diferentes propriedades físico-químicas. Géis foram obtidos a frio a partir de dispersões com 12 e 14% de proteína (p/p), com e sem a adição de CaCl_2 (5 e 15 mM). A desnaturação protéica e agregação foram avaliadas por análises de calorimetria diferencial de varredura (CDV), turbidez, solubilidade em água, sulfidril livre, hidrofobicidade superficial e cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular. Os resultados indicaram desnaturação parcial, maior grau de agregação e aumento da massa molar dos agregados com o incremento da concentração da proteína no tratamento prévio dos IPSs. Os isolados não tratado termicamente e o tratado a 60°C não formaram gel em nenhuma das condições experimentais utilizadas, enquanto para os IPSs tratados a 80°C, os valores de G' , G'' e $\tan \delta$ foram característicos de um sólido viscoelástico, sugerindo a formação de uma matriz tridimensional estável, independente da adição de CaCl_2 .

Os géis protéicos de soja induzidos a frio sem a presença de sal foram mais translúcidos, de estrutura menos porosa e maior capacidade de retenção de água (91,9 – 82,5%) do que os obtidos com 15 mM de CaCl₂. Os géis formados pela adição de 5 e 15 mM de CaCl₂ foram mais opacos e consistentes do que os géis sem adição de sal. Porém, os géis formados pela adição de 15 mM CaCl₂ foram mais esbranquiçados, indicando a formação de grandes agregados e com menor capacidade de retenção de água (51,2 – 76,1%). Os resultados mostraram que os géis formados a frio dos IPSs tratados termicamente apresentaram características macroscópicas diferentes, atribuídas ao tipo de agregado formado na etapa de aquecimento e à quantidade de CaCl₂ adicionada posteriormente. Por sua vez, o tipo de agregado formado na etapa de aquecimento teve influência principalmente da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento. A adição de CaCl₂ não foi determinante para a formação do gel, mas teve um importante papel em sua estruturação. Concluiu-se que a manipulação das condições térmicas pode conduzir à formação de agregados e géis de proteínas de soja com propriedades físico-químicas desejáveis.

Palavras chave: proteínas de soja, agregação, desnaturação térmica, propriedades funcionais.

ABSTRACT

The induction of gelation by high temperatures can be undesirable in some food applications. When submitted to the thermal treatment, that even moderate, some products of soy may develop not desirable flavors and aromas, limiting its application. The preparation of protein gels using cold-gelation consists of two steps: a stable dispersion of protein aggregation is obtained after heating of a solution of native proteins and gelation induced by lowering the pH or by adding salt. In contrast with the heat-induced gelation, the stage of activation of the protein in the cold-gelation process is previous to the stages of aggregation and gelation, what it allows to determine the properties of aggregates after heating and thereby control final gels properties. Although heat-induced gelation of soy protein has been extensively studied, little is known about the capacity of soy protein to form cold-set gel. The present study has investigated the effects that heat-treatment during soy protein isolates preparations (SPI) in the cold-set gelation by the addition of CaCl_2 . SPI was obtained from soy defatted flour and heated at 60 or 80°C after the neutralization step, followed of freeze-dried. Protein concentrations of 3 and 5% and heating times of 15 and 30 min were used in order to obtain aggregates with different physical properties. Cold-set gels were obtained from 12 and 14 % (w/w) of protein dispersions, with or without CaCl_2 addition (5 and 15 mM). Denaturation followed by aggregation was verified by differential scanning calorimetry (DSC), turbidity, water solubility, free sulfhydryl groups (SH), superficial hydrophobicity and size exclusion-high performance liquid chromatography (SE-HPLC). The results indicated higher aggregation degree and increased molar mass of aggregates when the protein concentration was enhanced to 5% in the pre-heating of the SPIs. The isolates without heat-treatment and the isolates heated at 60°C did not form gels in any of the experimental conditions utilized, while for the IPSs heated at 80°C, the values of G' , G'' and $\tan \delta$ were characteristic of a viscous-elastic solid, suggesting the formation of a stable three-dimensional matrix, independent of CaCl_2 addition. The cold-induced soy protein gels without the presence of salt were more translucent and with lower porous structure and higher water retention capacity (91.9 - 82.5%), than those obtained with 15 mM of CaCl_2 . The gels obtained by 5 and 15 mM of CaCl_2 addition were opaque and

more consistent than gels without the presence of salt. However, gels obtained by 15 mM of CaCl_2 were whitened, indicating the formation of large aggregates with lower water retention capacity (51.2 - 76.1%). The results showed that the cold-set gels formed from heat treated SPIs exhibited different macroscopic characteristics, attributable to the type of aggregate formed in the heating step and to the quantity of posterior addition of CaCl_2 . At the same time, the type of aggregate formed in the heating step was mainly influenced by protein concentration and denaturation degree. The CaCl_2 addition was not determining for gel formation but has an important role on its structure. It was concluded that manipulation of thermal conditions can lead to aggregates and soy protein isolate cold-set gels formation with desirable physical-chemical properties.

Keywords: soy proteins, aggregation, thermal denaturation, functional properties.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glicine max* (L.) Merrill tem um papel cada vez mais importante na alimentação humana. Os principais componentes da soja e os responsáveis por esta importância e também por seu alto valor econômico são a proteína e o óleo. A sua importância nutricional foi relacionada exclusivamente ao elevado teor de proteína mas, atualmente, outros componentes da soja como isoflavonas, saponinas, ácidos graxos essenciais e vitamina E tem despertado interesse na comunidade científica (FERRARI; DEMIATTI, 2001). O aumento do consumo de soja pode ser justificado pelo alto conteúdo protéico, elevado valor nutricional, alta produtividade e baixo custo de produção, mas o principal interesse industrial de sua utilização está associado às notáveis propriedades funcionais de suas proteínas (KINSELLA, 1979).

Propriedades funcionais tecnológicas podem ser entendidas como o comportamento das variáveis físico-químicas das proteínas durante o preparo, processamento e armazenamento dos alimentos (DAMODARAN, 1997). A compreensão e o controle destes processos, que podem ser relacionados tanto à composição, estrutura e conformação das proteínas quanto às suas interações com outros componentes naturalmente presentes no alimento, são importantes para a obtenção de algumas características desejáveis no produto final. Entre as propriedades funcionais das proteínas de soja estão: solubilidade, absorção e retenção de água, viscosidade, geleificação, emulsificação, formação de espuma, absorção de gorduras, formação de filmes e retenção de aromas (LIU, 1997). Toda esta gama de propriedades tem estimulado consideravelmente as pesquisas sobre o uso das proteínas de soja, principalmente como componente controlador das propriedades de textura de muitos produtos alimentares.

A propriedade geleificante, entre as propriedades funcionais das proteínas, é uma das mais exploradas pela indústria de alimentos para criar novos produtos que apresentam melhores ou diferentes texturas (MOLINA; DEFAYE; LEDWARD, 2002). O controle da textura dos alimentos é um desafio constante para indústria por ser considerada uma das características mais importantes no teste de aceitação pelo consumidor. A preferência do consumidor por alimentos com melhores atributos

nutricionais também tem forçado a indústria a reduzir ou substituir ingredientes conhecidos para a manipulação da textura, tais como a gordura, carboidratos e aditivos (BRYANT; McCLEMENTS, 1998). Esta tendência tem motivado o desenvolvimento de ingredientes protéicos (proteínas do soro de leite, albumina do ovo e proteínas de soja) para melhorar as propriedades funcionais de produtos alimentares, o que requer o conhecimento da funcionalidade da proteína em base molecular.

A geleificação é o resultado da desnaturação da proteína e das interações proteína-proteína. Muitas ações que conduzem a alterações na conformação nativa da proteína têm o potencial de induzir a geleificação, incluindo tratamento térmico, oxidação química, tratamentos enzimáticos, adição de cálcio, ácido e uréia entre outros agentes desnaturantes (JU et al., 1996). O tratamento térmico, na maioria dos casos, é um passo prévio necessário à formação do gel, pois a ação do calor promove a desnaturação da proteína e conseqüente abertura das cadeias com a exposição de grupos hidrofóbicos que se atraem mutuamente. Novas interações entre as moléculas de proteína ainda pode-se formar, promovendo uma estrutura tridimensional capaz de aprisionar água e proporcionar a imobilização do sistema, dando origem ao chamado estado de gel (McCLEMENTS; KEOGH, 1995).

Muitas proteínas globulares (albumina, proteínas do soro de leite e proteínas de soja) podem formar géis induzidos termicamente. O aquecimento das dispersões de proteína causa o desdobramento molecular, que leva a agregação parcial das proteínas e a geleificação. As características físico-químicas dos géis, como as propriedades mecânicas, opacidade e retenção de água, podem ser controladas pela modificação da temperatura, pH, tipo e concentração de sal no processo de geleificação (LAKEMOND et al., 2003).

O tratamento térmico não é a única forma direta para induzir a geleificação protéica. A geleificação em temperaturas baixa ou ambiente é uma alternativa para reduzir as perdas de qualidade do produto final devido ao tratamento térmico (KNORR, 1999). Em algumas aplicações em alimentos é impossível, ou pelo menos indesejável, aquecer o produto a temperaturas altas o suficiente para induzir a geleificação. Alguns produtos de soja quando submetidos ao tratamento térmico, mesmo que moderado, desenvolvem sabores e aromas não desejáveis no processamento, limitando sua

aplicação em muitos produtos (MOLINA; DEFAYE; LEDWARD, 2002). Muitos pesquisadores têm concentrado a atenção no desenvolvimento de ingredientes que gelificam a frio, particularmente a proteína de soro de leite, pela sua importância na indústria de alimentos. Produtos modificados de soro de leite têm sido desenvolvidos com a capacidade de formarem gel apenas pela adição de sal, sem uma etapa de indução térmica. Estes produtos têm sido utilizados para preparação de géis com diferentes textura, aparência e capacidade de retenção de água (ELOFSSOM et al., 1997). Estes trabalhos buscam o esclarecimento da estrutura e dos mecanismos de formação do gel, da influência da concentração e do tipo de sais na textura do gel, bem como do efeito do pré-aquecimento nas propriedades dos géis (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; JU; KILARA, 1998; FAMELART et al., 1998; VARDHANABHUTI et al., 2001; FOEGEDING et al., 2002; ALTING, 2003).

Assim como acontece com os géis induzidos pelo calor, a formação da estrutura envolve mecanismos que dependem das interações proteína-solvente e proteína-proteína. A estrutura da rede pode ser formada por pontes de hidrogênio, associações hidrofóbicas, interações iônicas, interações eletrostáticas e também através de pontes dissulfídicas (DAMODARAN, 1988; PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994; NAKAMURA; UTSUMI; MORI, 1985; CHRONAKIS, 1996; BRYANT; McCLEMENTS, 2000). A aparência, capacidade de retenção de água e reologia desses géis dependem da organização estrutural das moléculas de proteína e da magnitude das forças entre elas (BRYANT e McCLEMENTS, 2000; FOEGDING et al., 2002).

Embora muitos trabalhos tenham sido realizados sobre os géis protéicos de soja induzidos termicamente, muito pouco se conhece sobre a capacidade de geleificação a frio das proteínas de soja (MALTAIS et al. 2005). Neste contexto insere-se o objetivo geral deste trabalho, que é o de estudar os efeitos de fatores físico-químicos (concentração de proteína, temperatura, tempo de aquecimento e concentração de cloreto de cálcio) no desenvolvimento de agregados solúveis capazes de induzir a geleificação a frio das proteínas de soja, avaliando micro e macroscopicamente (perfil de textura, viscoelasticidade, solubilidade dos géis, retenção de água e microscopia) as propriedades do gel formado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar os efeitos de fatores físico-químicos (concentração de proteína, temperatura, tempo de aquecimento e concentração de cálcio) no desenvolvimento de agregados capazes de induzir a geleificação a frio das proteínas de soja, avaliando as características físico-químicas e as propriedades do gel formado.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar isolados protéicos de soja (IPS) com diferentes graus de desnaturação e agregação protéica;
- Investigar o efeito de diferentes condições de tratamento térmico de isolados protéicos de soja nas propriedades físico-químicas de géis produzidos a frio por indução com íons cálcio.
- Analisar a estrutura da rede formada através das características microscópicas e macroscópicas do gel;
- Avaliar o comportamento reológico das soluções de isolados de soja e propriedades reológicas do gel induzido a frio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Proteínas da soja

O componente presente em maior quantidade no grão da soja é a proteína, correspondendo em média a 40% do total de matéria seca. A proteína da soja, dentre as proteínas de origem vegetal, possui um dos melhores padrões de aminoácidos essenciais, com exceção dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), que são limitantes na proteína (LIU, 1997).

Os produtos protéicos da soja despertam grande interesse na indústria de alimentos por sua funcionalidade e valor nutricional. No processamento do grão de soja são eliminadas ou reduzidas algumas substâncias indesejáveis responsáveis por “flavors” como fosfolipídios, ácidos graxos poliinsaturados, lipoxigenase, além de proteínas de baixo peso molecular com atividade inibidora de tripsina, rafinose e outros oligossacarídeos. Obtém-se, deste modo, proteínas de baixa alergenicidade e alto valor nutricional, apropriadas para a alimentação humana (VISSER; THOMAS, 1987). A extração de componentes não protéicos e a remoção de fatores antinutricionais que diminuem a digestibilidade das proteínas, remoção e/ou inativação de odores e sabores não desejáveis têm conduzido ao desenvolvimento de produtos, tais como: farinha de soja desengordurada, concentrados (70%, base seca) e isolados protéicos de soja (90%, base seca), hidrolisado e produtos de soja texturizados (LIU, 1997).

No oriente, o grão de soja é utilizado para a elaboração de numerosos alimentos fermentados e não fermentados, como: “miso”, “tempeh”, “tofu”, extrato de soja e “kinako”, dentre outros (FUKUSHIMA, 1994).

3.1.1 Caracterização das proteínas de soja

As proteínas da soja constituem aproximadamente 40 % da semente, deste total, 90% podem ser extraídos com água ou soluções salinas. Estas proteínas foram inicialmente classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação ($S_{20,w}$) em quatro frações: 2S, 7S, 11S e 15S. A fração 2S corresponde a 22% das proteínas extraídas em água e é composta principalmente por inibidores de tripsina. A fração 7S

corresponde a 37% das proteínas extraídas em água e contém hemaglutininas, lipoxigenases, β -amilase e globulinas 7S. A fração 11S corresponde a 31% das proteínas extraídas em água e é composta pela globulina 11S. A fração 15S corresponde a 11% das proteínas extraídas em água (LIU, 1997), apresenta-se como dímero de glicinina estável a força iônica superior a 0,5 M (WOLF; NELSEN, 1996). A β -conglucina (globulina 7S) e a glicinina (globulina 11S) são as principais proteínas de reserva da soja (RENKEMA et al., 2000). A **Tabela 1** apresenta os componentes das proteínas majoritárias do grão de soja.

A fração 11S da soja é constituída unicamente pela globulina 11S, também conhecida como glicinina. Entretanto, as globulinas 7S constituem mais da metade da fração 7S e podem ser classificadas em três tipos diferentes, de acordo com o seu coeficiente de sedimentação em tampão fosfato pH 7,6 e força iônica 0,1 M (FUKUSHIMA, 1994). A globulina tipo I é chamada de β -conglucina (B_1 a B_6) e se apresenta como dímero (9S). A tipo II, também chamada de β -conglucina (B_0), se encontra como um agregado insolúvel. A globulina 7S tipo III, chamada de γ -conglucina, permanece na forma 7S (HERMANSSON, 1985).

Tabela 1. Frações protéicas da soja.

Fração	Proteína total (%)	Componentes	Massa molecular (kDa)
2S (α -conglucina)	22	Inibidores de tripsina citocromo C	8-21,5 12
7S (β e γ -conglucina)	37	Hemaglutininas Lipoxigenases β -amilase Globulina 7S	110 102 61,7 180-210
11S (glicinina)	31	globulina 11S	350
15S	11		600

Fonte: WOLF, 1970

As globulinas da soja possuem estruturas quaternárias complexas que facilmente sofrem reações de associação-dissociação, dependendo das condições do meio, principalmente, pH, força iônica e solvente (RENKEMA; GRUPPEN; VLIET, 2002). A β -conglucina é uma glicoproteína de massa molecular 140-170 kDa e estrutura quaternária trimérica. Foi separada por cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 em seis componentes distintos que apresentam proporções e combinações diferentes das subunidades α (57-68 kDa), α' (57-72 kDa) e β (42-52 kDa) (RENKEMA, GRUPPEN e VLIET, 2002). Estes componentes são isômeros da β -conglucina e foram denominados de B₁ a B₆-conglucina. Estas subunidades são mantidas por ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. As proteínas α e α' , com maior conteúdo de carboidratos que a subunidade β , são de natureza hidrofílica e se dissociam em baixas forças iônicas. No entanto, a subunidade β se caracteriza por ser mais hidrofóbica e não se dissociar em baixa força iônica ($\mu = 0,1$) (HERMANSSON, 1985). A β -conglucina possui baixo conteúdo de sulfidril e não apresenta ligações dissulfeto intermoleculares entre as subunidades (RENKEMA et al., 2000). As subunidades α , α' e β apresentam os seguintes pontos isoelétricos: 4,9, 5,2 e 5,7-6,0, respectivamente (RODRIGUEZ, 1991).

Algumas variedades de soja apresentam uma subunidade denominada de β' . Apesar da estrutura primária da subunidade β' ser pouco conhecida, acredita-se que seja rica em aminoácidos sulfurados, característica importante tanto do ponto de vista nutricional da proteína da soja como nas suas propriedades físico-químicas. Outro importante aspecto está relacionado à polimerização desta subunidade através de pontes dissulfeto (LIU, 1997).

A glicina (11S) é formada por seis subunidades (forma hexamérica) e massa molecular de aproximadamente (300 a 400 kDa). Cada subunidade é composta por dois polipeptídeos, um com pI ácido e massa molecular aproximada 38 kDa e outro com pI básico e massa molecular aproximada 20 kDa (RENKEMA; GRUPPEN; VLIET, 2002). Ambos os polipeptídeos, simbolizados como A_n e B_n, são unidos entre si por pontes dissulfeto intermoleculares formando seis subunidades intermediárias (A_n-S-S-B_n) ou simplesmente AB (PETRUCCELLI; AÑÓN, 1995). As subunidades e polipeptídeos podem ser separadas utilizando uréia ou agentes redutores como o β -mercaptoetanol (LIU, 1997).

Badley et al. (1975) propuseram para a glicinina um modelo de estrutura formado por anéis hexagonais superpostos formando um cilindro oco com três pares de subunidades AB por hexágono. Entre os pares A e B, dentro do hexágono, a interação é de natureza hidrofóbica, porém os hexágonos unem-se por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio.

Argos et al.(1985) sugeriram um modelo para a estrutura secundária da glicinina e da β -conglucina a partir do seqüenciamento de aminoácidos. As duas globulinas têm características estruturais comuns e são compostas por três domínios: o amino terminal (domínio I), o domínio central (domínio II) e a carboxila terminal (domínio III). O domínio III corresponde a mais da metade de cada molécula e tem caráter hidrofóbico. O domínio II apresenta estrutura secundária em α -hélice e β -"sheet". O domínio I é formado pelos primeiros 100-150 aminoácidos, dependendo da subunidade, e apresenta maior conteúdo de estrutura α -hélice, comparado aos outros domínios, sugerindo que está localizado no exterior da molécula. Há uma diferença entre as globulinas 11S e 7S, que consiste das subunidades da globulina 11S conter uma região rica em aminoácidos ácidos, glutâmico e aspártico, localizados entre os domínios II e III.

Devido às diferenças na composição e estrutura, as principais proteínas globulares da soja, a β -conglucina (7S) e a glicinina (11S) apresentam diferentes propriedades nutricionais e funcionais como capacidade de formação de gel, estabilidade térmica e capacidade emulsificante (YAMAUCHI et al.,1981)

3.1.2 Efeito do tratamento térmico nas proteínas da soja

A desnaturação das proteínas da soja pelo calor é bem conhecida e tem sido utilizada há muito tempo para eliminar fatores antinutricionais no alimento, razão pela qual se converte em um tratamento necessário (WILSON, 1995). As alterações conformacionais das proteínas e das suas propriedades funcionais provocadas pelo aquecimento têm sido amplamente estudadas (LUSAS; RHEE, 1995; WILSON, 1995).

A modificação estrutural das proteínas por efeito do tratamento térmico é resultado da sua resposta à ação de outros fatores em conjunto com a temperatura, como força iônica, pH, concentração protéica, etc (YAMAUCHI; YAMAUCHI;

IWABUCHI, 1991). Quando a fração 11S, em pH 7,6, força iônica 0,5 e baixa concentração de proteína, é aquecida a temperaturas inferiores a 70°C não sofre alteração conformacional. Com aquecimento a temperaturas acima de 70°C, a solução começa a apresentar turbidez devido à formação de agregados solúveis. A dissociação total da fração ocorre a 80°C e a turbidez aumenta com o aumento da temperatura até 90°C (CATSIMPOOLAS; CAMPBELL; MEYER, 1969; GERMAN; DAMODARAN; KINSELLA; 1982; YAMAUCHI; YAMAUCHI; IWABUCHI, 1991).

Yamagishi et al. (1980) relataram que após 5 min de aquecimento de soluções 0,5% de glicinina a 100°C, em força iônica 0,5 ou 0,01, houve aparecimento de monômeros e oligômeros de subunidades ácidas, ligadas por ponte dissulfeto. Em força iônica 0,01 não houve formação de precipitado, pois os agregados formados eram solúveis. Com o prolongamento do aquecimento a 100°C em força iônica 0,5, as subunidades básicas desapareceram do sobrenadante e após 60 min elas encontravam-se apenas no precipitado. O precipitado formado após 10 min era composto de um monômero de subunidades básicas (Massa molecular 23.000 Da), sete oligômeros de subunidades ácidas e básicas (Massa molecular 58.700 a 208.300 Da). Com aumento do tempo de aquecimento, houve aumento das subunidades polimerizadas. O sobrenadante consistiu principalmente de monômeros de subunidades ácidas (Massa molecular 38.600 Da) e trímeros de subunidades ácidas (Massa molecular 103.600 Da), sendo que os tetrâmeros e pentâmeros foram encontrados em porcentagens menores, diminuindo no decorrer do aquecimento. Após 30 min a 100°C e força iônica 0,5 encontrou-se quase que exclusivamente os monômeros.

A formação de pontes dissulfeto é fundamental no processo de agregação. Na presença de agentes bloqueadores de grupos sulfidrilas não se desencadeia a precipitação (DURANT; GIMEL; NICOLAI; 2002). O bloqueio de grupos sulfidrilas na presença de N-etilmaleimida impede a precipitação da globulina 11S (soluções a 0,5%) durante o seu aquecimento (YAMAGISHI et al., 1981).

As interações hidrofóbicas são particularmente importantes no processo de agregação térmica, não somente devido ao desdobramento das subunidades por efeito do calor e exposição de sítios hidrofóbicos capazes de interagir entre si, mas porque as interações hidrofóbicas se reforçam quando aumenta a temperatura. Portanto, as

principais forças que conduzem a agregação térmica da glicinina são uma combinação cooperativa entre as interações hidrofóbicas e uniões iônicas (DAMODARAN, 1997).

A β -conglucina em baixa concentração (0,5% p/v), e força iônica próxima a zero, se dissocia durante o aquecimento. Entretanto, a adição de sais, mesmo em concentrações baixas, provoca a agregação das subunidades que provavelmente se mantêm dispersas devido à repulsão eletrostática (RENKEMA; GRUPPEN; VLIET, 2002). Os produtos de dissociação da β -conglucina, os monômeros 3S e 4S, formados durante o aquecimento em água destilada (99°C, 5 min) podem ser reconvertidos em β -conglucina pela adição de sais ou por diálise contra tampão fosfato com força iônica 0,5. Cloreto de sódio (0,1M) promove a reassociação completa das subunidades, cujos agregados são de alto peso molecular, formados apenas por subunidade β , e à β -conglucina, formada apenas por subunidades α e α' . A reassociação das subunidades parece ocorrer via interações eletrostáticas e hidrofóbicas (IWABUCHI; SHIBASAKI, 1981).

Quando extratos de farinha desengordurada de soja são aquecidos, há desnaturação parcial da fração 7S a 60°C e total desnaturação a 70°C, enquanto que a fração 11S permanece inalterada mesmo a 80°C (GARCIA et al., 1997). A total desnaturação da fração 11S ocorre a 100°C. Porém, a sensibilidade das globulinas 7S e 11S ao tratamento térmico depende da força iônica do meio. A dissociação da globulina 11S, quando o aquecimento é realizado em força iônica 0,1, ocorre parcialmente a 90°C e totalmente a 100°C (GARCIA et al., 1997). A estrutura quaternária da glicinina é rompida pelo aquecimento, o qual conduz a formação de duas frações: uma cujo coeficiente é 3S e 4S, é solúvel e estável, e a outra, ao contrário, apresenta forte tendência à agregação (DAMODARAN, 1997).

De acordo com Yamagishi et al. (1983), quando a concentração das frações 7S e 11S é aumentada, o tratamento térmico (80°C/30 min) provoca precipitação das globulinas da soja. Todas as subunidades constitutivas das frações 11S e 7S se encontram presentes no precipitado enquanto no sobrenadante está ausente o polipeptídeo B-11S. As interações estabelecidas entre as subunidades B-11S e AB-11S no precipitado foram de natureza covalente (S-S).

Segundo Utsumi et al. (1984), em baixa concentração de proteína (0,5% p/v) e relação de 1:1 as globulinas, em tampão Tris-HCl (pH 8,0), 2-mercaptoetanol (0,01 M), não há formação de precipitado e sim de macro-complexos solúveis, compostos principalmente pela subunidade β -7S e o polipeptídeo básico B-11S (β -B), unidas por interações eletrostáticas. A maior parte das subunidades α e α' -7S encontrava-se como monômeros não complexados na solução aquecida, junto aos polipeptídeos ácidos da glicinina (UTSUMI et al. 1984). A afinidade da subunidade β pelas subunidades básicas é explicada por sua eletronegatividade e pela configuração do sítio de interação (UTSUMI et al. 1984; RENKEMA; GRUPPEN; VLIET, 2002).

Sabe-se que o tratamento térmico das proteínas da soja melhora suas propriedades funcionais tais como emulsificação e capacidade de formação de espuma, porém sua alta estabilidade térmica pode limitar seu uso (LIU, 1997). Concentrações crescentes de etanol diminuem a temperatura de desnaturação das proteínas da soja, sendo que 3,2 M de etanol provocam a desnaturação total das proteínas a 70°C, o que na sua ausência só ocorre a 94°C (LIU, 1997).

3.1.3 Isolado protéico de soja (IPS)

Os isolados protéicos de soja são utilizados por suas propriedades funcionais principalmente em produtos cárneos como “beef paties” e embutidos. Em produtos emulsificados, as proteínas da soja promovem a emulsificação, geleificação, retenção de água e lipídeos além de favorecerem a coesividade, conferindo ao produto a textura desejada. Os isolados também são empregados na formulação de análogos de produtos lácteos (leite, queijo, iogurte de soja e produtos combinados à base de proteínas da soja). Na elaboração de molhos e sopas, também se utiliza o isolado protéico de soja como substituto da farinha de trigo ou proteínas do leite (VISSER; THOMAS, 1987; LIU, 1997).

Os isolados de soja são tradicionalmente preparados a partir da farinha de soja desengordurada utilizando meio aquoso neutro ou alcalino (pH 7-10) para extração da proteína e carboidratos solúveis. Os resíduos insolúveis, maioria carboidratos, são removidos por centrifugação seguida pela precipitação da proteína da soja no ponto

isoelétrico (pH em torno de 4,5). A proteína precipitada é separada por decantação mecânica, lavada, e neutralizada a pH em torno de 6,8. Em seguida, realiza-se a secagem ou desidratação da proteína isolada (LIU, 1997).

Este procedimento é utilizado na maioria dos processos usados comercialmente para obtenção do isolado protéico de soja (IPS). Entretanto, pesquisas com enfoque no isolamento das proteínas da soja, purificação e avanços no processamento tecnológico têm levado ao desenvolvimento de diferentes métodos para a produção do isolado protéico. O isolado protéico de soja é um dos ingredientes mais refinados e contém aproximadamente 90% de proteína em base seca. Na forma de isolado é freqüentemente utilizada em formulações e em aplicações nutricionais (LIU, 1997).

As várias metodologias utilizadas no processo de isolamento das proteínas da soja, que envolve a extração e remoção da gordura durante a produção da farinha desengordurada de soja, provocam modificações físico-químicas na proteína. Tais mudanças afetam tanto a estrutura como a proporção das frações protéicas presentes no isolado (GARCIA et al., 1998). Os isolados protéicos de soja comerciais apresentam características diferentes das proteínas da soja nativa, atribuídas às condições de processamento. Podem ocorrer desnaturação e agregação da proteína, em diferentes graus, que irão afetar as propriedades funcionais das proteínas como solubilidade, capacidade de reter água, viscosidade e a geleificação (HERMANSSON, 1986; GARCIA et al. 1998; BRITTEN; GIROUX, 2001; DURAND; GIMEL; NICOLAI, 2002).

3.2 Propriedades funcionais das proteínas

O termo funcionalidade se aplica a qualquer propriedade, diferente das nutricionais, que condicione a utilização de um ingrediente no alimento (CHEFTEL et al., 1993; KILARA, 1996). As propriedades funcionais das proteínas são aquelas propriedades físico-químicas que contribuem para que os alimentos apresentem características desejáveis (KINSELLA, 1979; LIU, 1997).

As propriedades funcionais das proteínas podem ser agrupadas em três grandes categorias: propriedades de hidratação, propriedades relacionadas com as interações proteína-proteína e as propriedades de superfície. As propriedades de hidratação

dependem principalmente da interação proteína-água. Dentro desta categoria estão absorção, retenção de água, inchamento, adesão, viscosidade, dispersibilidade e solubilidade. Quanto às propriedades associadas às interações entre as moléculas protéicas incluem-se a precipitação e formação de gel e outras estruturas, como massas e fibras. O grupo pertencente às propriedades de superfície está relacionado com a tensão superficial, como por exemplo, a capacidade de formar e estabilizar espumas e emulsões (CHEFTEL et al., 1993).

É importante ressaltar que a classificação das propriedades funcionais de acordo com o tipo de interação significa apenas que a mesma predomina. Para a viscosidade, tanto as interações macromolécula-solvente como as que se estabelecem entre as macromoléculas são da mesma importância para a propriedade funcional (CHEFTEL et al., 1993).

As propriedades funcionais de uma proteína fundamentalmente estão relacionadas com as suas propriedades físicas, químicas e estruturais ou conformacionais. Estas propriedades incluem tamanho, forma, composição e seqüência aminoacídica, carga e sua distribuição, relação hidrofiliicidade/hidrofobicidade, conteúdo e distribuição da estrutura secundária (α -hélice, β -"sheet", etc), organização da estrutura terciária e quaternária de segmentos polipeptídicos, ligações cruzadas inter-intra cadeias polipeptídicas (ex. pontes dissulfeto), rigidez ou flexibilidade da proteína em resposta às mudanças externas, ponto isoelétrico, suas interações com outros compostos do alimento (água, íons, carboidratos, lipídeos, proteínas e "flavors") e também as condições de pH, força iônica e temperatura (DAMODARAN, 1989; DAMODARAN, 1997; LAKEMOND et al., 2000).

As propriedades funcionais dependem, então, da estrutura tridimensional final da proteína. Esta estrutura é resultante das forças atrativas e repulsivas dentro da molécula e da interação da cadeia protéica com o meio que a rodeia. Para compreender as alterações produzidas na estrutura e nas propriedades funcionais das proteínas é necessário conhecer a natureza e magnitude das forças que contribuem para a estabilidade da proteína (PILOSOF, 2000).

As interações hidrofóbicas, entre os resíduos aminoacídicos não polares da proteína, são responsáveis, em grande parte, pela estabilização da estrutura nativa.

Estas interações têm origem na hidratação, que é termodinamicamente desfavorável dos grupos não polares, provocando um aumento no ordenamento estrutural das moléculas de água e uma diminuição da entropia do sistema. No estado nativo, grande parte dos grupos apolares está localizada no interior da molécula de proteína e os grupos polares na superfície, expostos ao meio aquoso. A contribuição das interações hidrofóbicas à estabilidade da proteína é superior a das pontes de hidrogênio. As interações hidrofóbicas dependem da temperatura, fortalecem em altas e se desestabilizam em baixas temperaturas (CHEFTEL et al., 1993).

Grande parte dos sistemas alimentícios tem como constituinte as proteínas de origem animal (ovo, leite ou carne). As proteínas vegetais também são muito utilizadas, porém ainda faltam conhecimentos sobre suas propriedades funcionais a níveis moleculares (LIU, 1997). Em muitos casos, uma única proteína ou mesmo uma combinação não possui todas as propriedades desejáveis. Modificações estruturais podem ser necessárias para obter-se características específicas para determinados tipos de aplicações (FOEGEDING et al., 2002).

3.2.1 Propriedades funcionais de hidratação

Muitas das propriedades funcionais de proteínas estão relacionadas com a sua hidratação. A absorção de água, o inchamento e a capacidade de retenção de água envolvem diferentes fenômenos tais como: absorção de água, condensação da água líquida e inchamento (partículas ou massa insolúvel inchada). Outras, como a dispersibilidade, viscosidade e solubilidade envolvem todas estas etapas (CHEFTEL et al., 1993; AÑÓN; SORGENTINI; WAGNER, 2001).

Praticamente todos os alimentos são sistemas hidratados, nos quais a água é usualmente o componente majoritário. As interações proteína-água são extremamente importantes na aplicação de proteínas em sistemas alimentares, pois afetam as características de solubilidade, critério considerado essencial para as propriedades físico-químicas das proteínas (DAMODARAN, 1997). O grau de desnaturação e/ou agregação das proteínas durante a preparação dos isolados de soja também é um fator importante que afeta as propriedades funcionais como solubilidade, absorção de água e

viscosidade (AÑÓN; SORGENTINI; WAGNER, 2001). Propriedades como viscosidade, geleificação e coagulação são propriedades hidrodinâmicas afetadas pelo tamanho, forma, flexibilidade molecular e suas interações com a água (WAGNER, 2000).

A capacidade de hidratação de uma proteína globular desnaturada é apenas cerca de 10% maior do que a da proteína nativa. Isto porque, mesmo no estado desnaturado, a proteína mantém parte de sua estrutura nativa fazendo com que a razão área de superfície e massa de proteína não altere drasticamente. Agregação da proteína desnaturada também encobre uma significativa parte da superfície da proteína (DAMODARAN, 1994).

As características do meio, como pH, força iônica e temperatura afetam a hidratação das proteínas. A capacidade de hidratação é mínima no pH isoelétrico da proteína, onde a carga líquida é zero e as interações proteína-proteína são mais intensas. O tipo e a concentração de íons presentes exercem uma considerável influência na absorção de água. Baixa concentração de sal ($< 0,2$ M) aumenta a capacidade de hidratação das proteínas, enquanto que à alta concentração de sal promoverá a interação água-sal ocasionando a desidratação da proteína (CHEFTEL et al., 1993).

O efeito do aquecimento sobre a conformação da proteína pode ser diverso: a quantidade de água retida pode diminuir ou aumentar. Se o tratamento térmico acarretar na desnaturação proteica seguida de agregação, a capacidade de interagir com a água diminuirá. Porém, se o aquecimento conduzir à dissociação de uma macromolécula complexa e à desnaturação parcial, a quantidade de água absorvida pode aumentar. A velocidade e extensão de absorção de água dependem também do tamanho da partícula e da porosidade das proteínas hidratadas (CHEFTEL et al., 1993).

A solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre a interação proteína-proteína e proteína-solvente e está relacionada ao balanço de hidrofiliidade/hidrofobicidade de sua superfície, sendo solúveis em água quando as forças eletrostáticas repulsivas são maiores que as interações hidrofóbicas atrativas. As características de solubilidade estão relacionadas à composição da superfície da proteína e termodinâmica das interações com o solvente (DAMODARAN, 1997; AÑÓN; SORGENTINI; WAGNER, 2001).

De modo geral, as características hidrofobicidade e hidrofiliicidade da superfície da proteína são os fatores mais importantes que afetam a solubilidade. Em geral, e para minimizar a energia livre, a maior parte dos resíduos hidrofóbicos orientam-se para o interior da macromolécula. A superfície de algumas proteínas globulares nativas apresenta áreas constituídas por resíduos hidrofóbicos (SCILINGO, 2000).

A solubilidade protéica em solução aquosa é dependente do pH, temperatura, força iônica, concentração de proteína e outros componentes, como solventes orgânicos. No geral, as proteínas apresentam a menor solubilidade em pH igual ao seu ponto isoelétrico. Nestas condições, a repulsão eletrostática diminui favorecendo as interações proteína-proteína. Quando o pH se afasta do seu ponto isoelétrico a solubilidade da proteína tende a aumentar, já que se promovem as interações proteína-água. Por isso, as proteínas puras apresentam o comportamento em “V” de solubilidade versus pH (HERMANSSON, 1978; DAMODARAN, 1997; WAGNER, 2000; PILOSOFF, 2000). Força iônica ou presença de solventes orgânicos também afetam o comportamento da solubilidade das proteínas frente a alterações de pH (VOJDANI, 1996).

Com o aumento da temperatura até aproximadamente 40 ou 50°C, em geral, aumenta-se a solubilidade das proteínas. Dependendo do tempo de aquecimento e sob temperaturas mais altas a proteína desnatura. Na maior parte dos casos, a desnaturação protéica seguida de agregação diminui a solubilidade. Este fenômeno não ocorre para todos os sistemas protéicos. As uniões não covalentes, que estabilizam as estruturas secundária e terciária, sofrem rupturas quando as proteínas passam por desnaturação. Diferentes proteínas requerem distintas exposições ao calor para se desnaturarem (CHEFTEL et al., 1993).

O aumento na concentração de sal (valores próximos a 0,15 M) diminui a solubilidade. Este efeito é atribuído a complexas interações tanto eletrostáticas como hidrofóbica que se estabelecem entre as subunidades 7S e 11S das globulinas (DAMODARAN; KINSELLA, 1982). A insolubilização será menor quanto maior for o efeito liotrópico do íon. A medida que a concentração salina aumenta, acima de 0,15 M, a magnitude das interações hidrofóbicas aumentará ou diminuirá de acordo com a natureza liotrópica do íon (DAMODARAN; KINSELLA, 1982; VOJDANI, 1996).

A solubilidade das proteínas também varia em função da concentração protéica. A solubilidade máxima depende da composição da solução e do tipo de proteína (VOJDANI, 1996).

A viscosidade de soluções protéicas diluídas depende da forma e tamanho da partícula, assim como da hidratação e da carga elétrica da proteína. Aumento na hidratação da molécula produz um aumento da viscosidade intrínseca. A viscosidade intrínseca é dependente do volume hidrodinâmico ocupado por unidade de massa da macromolécula, um parâmetro estrutural, interpretada em termos de conformação molecular, hidratação e flexibilidade das cadeias de polímeros em solução. O estudo da viscosidade de proteínas permite determinar a relação entre as interações entre moléculas protéicas e propriedades funcionais (HARDING, 1997).

A viscosidade de soluções macromoleculares é influenciada por uma série de fatores, tais como tamanho e conformação molecular, volume ocupado em solução, peso molecular e sua distribuição, concentração em polímero, flexibilidade da cadeia, temperatura e velocidade de cisalhamento empregada para obtenção da medida (HARDING, 1997). O aumento de pH e força iônica em proteínas com carga elétrica líquida positiva favorece a formação de estrutura mais compacta de menor viscosidade (RHA; PRADIPRASANTA, 1986).

A viscosidade é dependente da concentração de proteína da solução. Em baixas concentrações, as moléculas são independentes, porém, à medida que a concentração aumenta, aumentam as interações hidrodinâmicas entre as moléculas. Em concentrações maiores, os domínios hidrodinâmicos das moléculas protéicas entram em contato promovendo interações de grande importância que determinam um comportamento essencialmente viscoelástico (PUPPO, 1997).

As soluções protéicas são freqüentemente submetidas à deformação e temperaturas extremas. A desnaturação provocada por estes tratamentos promove alterações conformacionais que aumentam o tamanho da partícula e, como conseqüência, aumenta a viscosidade da solução. Ao submeter a dispersão protéica à deformação, agregados de grande tamanho são rompidos, diminuindo o tamanho de partícula e, por conseguinte, a viscosidade (HARDING, 1997).

As proteínas nativas não apresentam estrutura acessível para a hidratação máxima, diminuindo tanto a solubilidade como a viscosidade. Por outro lado, as proteínas tratadas termicamente aumentam seu volume hidrodinâmico, se forma uma suspensão não homogênea de distintos graus de agregação ou coagulação e a viscosidade aumenta (HARDING, 1997).

3.2.2 Geleificação de proteínas globulares

As macromoléculas ou biopolímeros, na presença da água, formam soluções ou suspensões coloidais de menor ou maior fluidez, dependendo da concentração e da natureza das macromoléculas. Estes colóides, tanto nas células vivas como nos alimentos, poderão se transformar em géis que são de grande importância para as propriedades funcionais desses sistemas (SGARBIERI, 1998). Um gel pode ser descrito como um sólido viscoelástico que, dependendo das circunstâncias, pode fluir como um líquido viscoso ou comportar-se como um sólido elástico (HORNE, 1999).

A capacidade de formação de géis, matriz que retém água ou outros ingredientes como açúcares, gordura e aromas, é uma das propriedades mais exploradas pela indústria de alimentos (GOSAL; ROSS-MURPHY, 2000). O fenômeno de geleificação de proteínas globulares é de grande importância prática e tem sido muito estudada nos últimos cinquenta anos (ALTING, 2003). As propriedades de textura e as características sensoriais de produtos alimentícios, tais como queijo, iogurte e salsicha, estão associados diretamente ao tipo de estrutura de gel formado durante o seu processamento (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1997 b).

Em geral, a fração 11S da soja tem melhor capacidade de formação de gel que a globulina 7S, enquanto a 7S apresenta melhor capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão que a globulina 11S (LIU, 1997).

De acordo Gosal e Ross-Murphy (2000), a geleificação de proteínas globulares é realizada em duas etapas: a proteína nativa é desnaturada por aquecimento e a matriz é então formada por associação de qualquer zona de união entre as moléculas. A formação de uma matriz estável requer equilíbrio entre forças atrativas e repulsivas.

Os géis de proteínas globulares podem ser formados a partir de dois mecanismos de agregação: agregação linear (tipo: *string of beads* ou filamentos) e ao acaso (*random*), que dão origem a géis translúcidos ou opacos, respectivamente (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998). Um exemplo típico de agregação linear em géis induzidos pelo calor é o da glicinina da soja (DOI, 1993). Os dois tipos diferentes de rede podem ser formados dependendo da carga líquida da proteína nativa. Quando a repulsão entre as moléculas de proteína é grande, agregados lineares são formados, se pequena, quando o pH está próximo ao pI, formam-se agregados globulares ao acaso (GOSAL; ROSS-MURPHY, 2000). Segundo Hermansson (1994), a formação de gel é um processo complexo, que envolve reações de desnaturação, dissociação, associação e agregação. A cinética destas reações determina o tipo de gel formado.

Do ponto de vista reológico, a geleificação é um fenômeno no qual uma solução viscosa de moléculas individuais se transforma em sólido viscoelástico por um processo de agregação ramificada, ou seja, ocorrem ligações cruzadas progressivas de moléculas poliméricas via interações não covalentes e/ou covalentes. Uma vez formado o gel, o entrecruzamento prossegue, aumentando sua rigidez com o tempo, até alcançar o estado de equilíbrio (CLARK; LEE-TUFFNELL, 1986; RENARD; VELDE; VISSCHERS, 2006). O estudo da geleificação protéica pode ser realizado mediante métodos reológicos, avaliando-se a viscosidade antes do “ponto de gel” e/ou a viscoelasticidade no “ponto de gel”.

O comportamento reológico dos géis é influenciado pela concentração, tamanho e morfologia da proteína e também pelas propriedades de superfície das partículas primárias de agregação, sendo que a interação entre estas partículas é que conduzirá à formação da rede de gel (CHRONAKIS, 1996). Marangoni et al. (2000) propuseram um modelo estrutural das partículas de formação de gel, cujas propriedades macroscópicas são influenciadas por uma hierarquia de fatores (**Figura 1**). As propriedades físico-químicas das moléculas de proteína e as condições do meio (pH, temperatura, força iônica, concentração de proteína, polaridade e tipo de solvente) influenciam no tipo de partículas primárias formadas (morfologia, tamanho, propriedades de superfície). A estrutura tridimensional do gel é resultante da relação entre a estrutura das partículas de gel, o mecanismo e os eventos primários decorrentes das modificações das

partículas de proteína durante o pré-tratamento, e os processos de desnaturação e agregação, que ainda não são muito claros (MARANGONI et al., 2000).

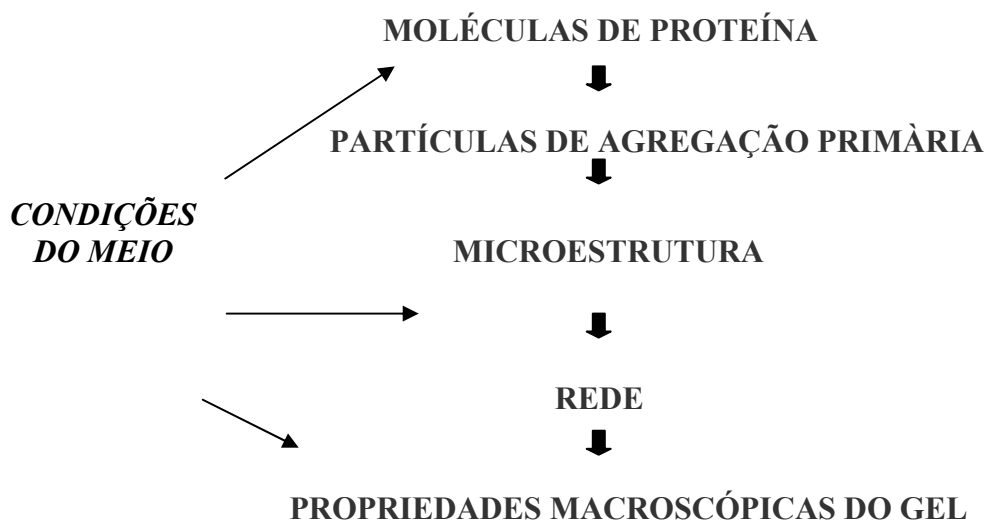


Figura 1. Modelo estrutural das partículas de formação de gel. Esquema proposto por Marangoni et al. (2000).

De acordo com Marangoni et al. (2000), muitos trabalhos que analisam as propriedades físico-químicas dos géis protéicos têm determinado a relação entre as características físico-químicas das moléculas de proteína individualmente e as propriedades macroscópicas do gel e/ou dos produtos alimentícios, considerando-as como principal ingrediente estrutural. Porém, as propriedades macroscópicas do gel são influenciadas por uma hierarquia de fatores que nem sempre estão diretamente relacionados às propriedades individuais das partículas protéicas.

Os primeiros estágios da geleificação podem ser detectados pelas alterações na viscosidade da dispersão de proteína. Estas alterações na viscosidade estão associadas ao processo de desnaturação e agregação das moléculas de proteína (PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994; DURAND; GIMEL; NICOLAI, 2002). A capacidade da proteína desnaturada em agregar-se está relacionada à estrutura, e por isso depende da extensão e natureza da desnaturação da proteína (FOEGEDING,

BOWLAND; HARDIN, 1995; RENKEMA; GRUPPEN; VLIET, 2002). Assim, as interações proteína-proteína e proteína-solvente são influenciadas pelos mesmos fatores que afetam o processo de geleificação, bem como o tipo e as propriedades dos géis (TOTOSAUS et al., 2002). Estes fatores podem ser classificados, de acordo com Phillips et al. (1994), como intrínsecos e extrínsecos, descritos a seguir.

3.2.2.1 Fatores intrínsecos e extrínsecos

Os fatores intrínsecos descritos a seguir estão relacionados à proteína: interações eletrostáticas, pontes dissulfeto, massa molecular, composição aminoacídica e hidrofobicidade (TOTOSAUS et al., 2002).

As interações eletrostáticas agem entre espécies com carga elétrica permanente, como dipolos ou íons, que podem ser atrativas ou de repulsão, dependendo das respectivas cargas. As proteínas podem ser envolvidas em diferentes tipos de interações eletrostáticas, de acordo com a natureza das moléculas envolvidas, como íon-íon, íon-dipolo, ou dipolo-dipolo (BRYANT; McCLEMENTS, 1998). A magnitude ou distribuição da carga na proteína é governada principalmente pelo pH e/ou força iônica da solução aquosa ao redor da molécula. A sensibilidade ao pH e à força iônica das interações eletrostáticas permite os pesquisadores na área de alimentos a manipulação das interações entre as moléculas protéicas e, por conseguinte, o controle de suas propriedades funcionais (KUIPERS et al., 2005).

As pontes dissulfeto não são essenciais para que ocorra a geleificação, mas seu papel está relacionado à capacidade de aumentar a massa molecular média e o comprimento da cadeia, agindo inicialmente como estabilizadores (WANG; DAMODARAN, 1990). As variações na formação da rede e na força do gel podem estar relacionadas às diferenças na média de massa molecular e tamanho hidrodinâmico das cadeias polipeptídicas no gel (TOTOSAUS et al., 2002). A massa molecular crítica para formação do gel é cerca de 23 kDa (WANG; DAMODARAN, 1990).

As proteínas que contêm menos que 31,5% mol de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e triptofano) formam, em geral, gel tipo coágulo enquanto as proteínas contendo acima desta porcentagem de resíduos

hidrofóbicos formam um gel translúcido (SHIMADA; MATSUSHITA, 1980). Os aminoácidos não polares agrupam-se formando um núcleo hidrofóbico envolvido por uma camada de resíduos polares em contato com o solvente, o qual desempenha um papel importante na organização da proteína (DAMODARAN, 1997).

Os fatores extrínsecos são as condições do meio que envolvem a proteína, que podem ser controlados para conduzir ou melhorar a formação do gel, tais como concentração de proteína, pH, temperatura, força iônica, pressão e tipo de sal. A variação destes fatores afeta o processo de formação de gel, estrutura da rede, propriedades reológicas e a capacidade de retenção de água do gel formado (RENKEMA, 2004).

A concentração de proteína é um fator importante na determinação do tipo de gel e nas suas características finais, principalmente em relação à textura. As ligações cruzadas entre as macromoléculas necessárias à geleificação protéica são proporcionais à concentração de proteína. A força do gel e a sua deformação são também altamente dependentes da concentração de proteína (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1997 b; RENKEMA, 2004). Quanto maior a carga líquida da molécula de proteína, maior é a repulsão eletrostática entre as moléculas, dificultando as interações que formam a matriz do gel (TOTOSAUS et al., 2002).

A temperatura é um dos fatores mais importantes, pois fornece a energia envolvida no processo de desdobraimento da proteína e influencia nas características do gel. A faixa de temperatura ótima para a geleificação, para proteínas globulares, é definida pela sua temperatura de desnaturação. O aquecimento excessivo em temperaturas superiores a 100°C pode causar ruptura das ligações peptídicas primárias em proteínas, inibindo a formação da rede de gel (DAMODARAN, 1997). Quando a velocidade de aquecimento é alta, a primeira etapa da geleificação (desnaturação) é completada mais rapidamente que a segunda etapa (agregação). Para uma determinada taxa de desnaturação, a taxa de agregação é lenta, se as forças atrativas entre as cadeias protéicas desnaturadas forem pequenas, resultando na formação de uma rede fina e um gel translúcido (TOTOSAUS et al., 2002).

A força iônica tem um efeito significativo na absorção de água, inchamento e solubilidade das proteínas e na microestrutura da matriz do gel. Em baixa força iônica

(< 0,1 M), a matriz de gel formada é de estrutura ordenada, enquanto sob a ação de forças iônicas maiores (> 0,1 M) a matriz torna-se mista, com os dois tipos de estrutura, ordenada e ao acaso (FOEGEDING et al., 1995; RENKEMA; GRUPPEN; VLIET, 2002). Os sais alteram as interações entre os filamentos de proteína de diferentes maneiras. Sais mono e divalentes agem reduzindo a repulsão eletrostática entre os filamentos de proteínas carregados eletricamente, conduzindo à agregação das moléculas (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998; TOTOSAUS et al., 2002; ALTING et al., 2003).

3.2.2.2 Géis protéicos induzidos termicamente

Géis protéicos podem ser induzidos por ação do calor ou alta pressão (JU; KILARA, 1998). O processo de produção de géis induzidos pelo aquecimento da solução protéica, apesar de complexo, pode ser resumido em duas etapas: a primeira é a transformação irreversível do estado de sol para progel, que ocorre com o aquecimento da solução. A desnaturação da proteína promovida pelo calor está associada com as alterações conformacionais que favorecem as interações intermoleculares entre as moléculas de proteína, conduzindo ao estado de pró-gel (FOEGEDING; BOWLAND; HARDIN, 1995; RENKEMA; VLIET, 2002). Nesta fase, ocorre a ruptura das pontes de hidrogênio, diminuição das interações eletrostáticas, enfraquecimento das interações intermoleculares e estabilização de interações hidrofóbicas. A segunda etapa é a conversão reversível do pró-gel em gel que ocorre no resfriamento da suspensão protéica e depende do tipo de agregação entre as subunidades da proteína resultando em uma rede tri-dimensional. Caso o tratamento seja realizado a temperaturas excessivas (125°C), pode ocorrer a passagem do estado de pró-gel para metasol, caracterizado pela irreversibilidade, ou seja, a proteína não consegue voltar para o estado pró-gel e posteriormente vir a formar o gel (DAMODARAN, 1997).

Após o aquecimento, o aumento significativo da hidrofobicidade é uma indicação do desdobramento da proteína, e quanto mais sítios hidrofóbicos estiverem expostos, maior possibilidade de interação entre eles causando a agregação das moléculas de proteína (YAMAUCHI; YAMAGISHI; IWABUCHI, 1991). Na **Figura 2** pode-se observar

o esquema de algumas proposições para a geleificação térmica de proteínas globulares (TOTOSAUS et al., 2002). A velocidade de aquecimento e/ou tempo de aquecimento afeta a desnaturação e parecem influenciar no tipo de agregado de proteína formado (FOEGEDING et al., 1986).

Durante o resfriamento, as proteínas desnaturadas podem voltar à sua conformação inicial. A desnaturação parcial da proteína pode diminuir a disponibilidade do número de grupos funcionais reativos para as ligações cruzadas intermoleculares e comprometer a formação de uma rede de gel auto-sustentável (DAMODARAN, 1988; MANGINO, 1992; DAMODARAN, 1997).

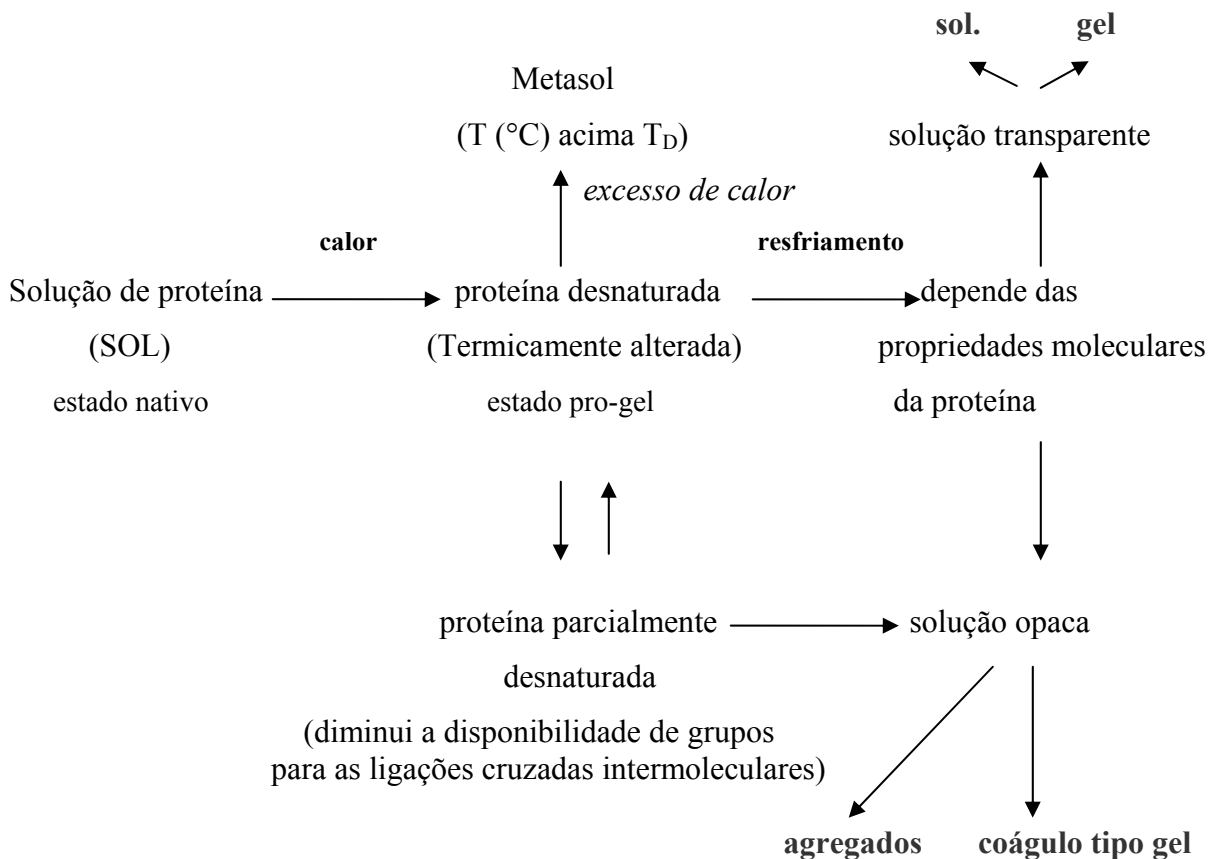


Figura 2. Esquema da geleificação de proteínas globulares induzida pelo calor (TOTOSAUS et al, 2002). T = temperatura e T_D = temperatura de desnaturação

A temperatura tem influência marcante no processo de geleificação e nas características do gel. A faixa de temperatura ótima para geleificação é definida pela temperatura de desnaturação. O aquecimento excessivo em temperaturas acima de 100°C, promove a quebra das ligações peptídicas primárias em proteínas, comprometendo a formação da rede de gel (DAMODARAN, 1994).

A temperatura de desnaturação da glicinina (11S) começa em torno de 80-90°C e da β -conglucina (7S) a 60-70°C e depende fortemente do pH e da força iônica, segundo RENKEMA; GRUPPEN; VLIET, 2002. Estes autores verificaram que a formação do gel inicia-se quando começa a desnaturação, indicando que a desnaturação térmica é um pré-requisito para formação de gel de proteínas da soja. Esta conclusão foi verificada para todas as condições de pH e força iônica estudadas. Tanto a glicinina como a β -conglucina têm a capacidade de formar géis de estrutura ordenada. As cadeias dos géis de glicinina são mais regulares comparadas às formadas pela β -conglucina (RENKEMA; KNABBEN; VLIET, 2001).

As condições necessárias para a geleificação dos isolados protéicos de soja e de suas frações 7S e 11S são diferentes. UTSUMI; KINSELLA (1985) mostraram que géis de proteína de soja apresentam dureza superior à observada em géis obtidos com 7S e 11S isoladamente. Os géis de 7S são mais duros que os de 11S (UTSUMI; KINSELLA 1985). Segundo Yao et al. (1990), a fração 11S forma géis mais fortes que a fração 7S, possivelmente devido à presença de maior número de grupos SH. Os isolados e as misturas de glicinina e β -conglucina em igual proporção mostram melhores características de geleificação que suas frações constituintes. Os géis dos isolados de soja são estabilizados principalmente por agregados formados entre as subunidades α' , α e β -7S e o polipeptídeo A-11S (UTSUMI; KINSELLA, 1985).

Nos géis formados de isolados protéicos de soja ou de glicinina, as pontes dissulfeto estão envolvidas no processo de geleificação, ao contrário dos géis obtidos de β -conglucina. No entanto, nos três sistemas (isolado de soja, glicinina e β -conglucina) as interações não covalentes como interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio têm um papel importante na geleificação (RENKEMA; VLIET, 2002).

Renkema et al., (2000) e Renkema (2004) estudaram a influência do pH na formação dos géis de glicinina e do isolado protéico de soja, em relação a desnaturação

e agregação. Em pH 7,6, os géis formados foram mais uniformes e levemente opacos, consistindo de agregados pequenos, com rede de filamentos finos e pequenos poros. Os géis obtidos em pH 3,8, ao contrário, apresentaram uma estrutura grosseira, esbranquiçada, com agregados grandes, filamentos grossos e grandes poros. A estrutura e o mecanismo de formação do gel de glicinina e do isolado de soja foram diferentes nos pH 7,6 e 3,8. De acordo com Renkema; Knabben; Vliet (2001), para proteínas de soja, a formação de gel coincide com a desnaturação térmica da β -conglucina em pH 3,8, porém, em pH 7,6, a formação do gel começa simultaneamente com a desnaturação da glicinina. As maiores temperaturas de desnaturação da glicinina foram observadas em pH 5,2 e força iônica de 0,2 M.

Puppo e Añón (1995) demonstram que géis de isolados protéicos em pH 3,5 apresentaram-se menos transparentes e com microestrutura mais agregada e menos homogênea que em pH 2,75 ou pH 8,0. Géis ácidos de isolados de soja aquecidos com 0,5 M de NaCl foram mais opacos e formaram uma estrutura mais aberta e mais frágil que géis ácidos de isolados obtidos sem a presença de NaCl (PUPPO; AÑÓN, 1998).

De acordo com Renkema e Vliet (2002), a força dos géis protéicos de soja, medida pelo módulo elástico, aumentou na proporção da proteína desnaturada. O aumento no G' foi também observado durante o aquecimento prolongado a 90°C, o que pode ser explicado pela ocorrência de uma reorganização estrutural da rede do gel e, possivelmente, pela inclusão de proteína na rede. O aumento no G' após o resfriamento foi termo-reversível, indicando que a formação de pontes dissulfeto e o rearranjo estrutural não ocorreram após o resfriamento.

3.2.2.3 Géis protéicos induzidos a frio

O processo de produção de géis a frio pode ser dividido em dois estágios: (1) a solução protéica é inicialmente desnaturada pelo calor e (2) a indução da geleificação é realizada em temperatura baixa ou ambiente (BRYANT; MCCLEMENTS, 2000). No processo de geleificação a frio, a etapa de ativação da proteína (indução térmica) não ocorre juntamente com as etapas de agregação e geleificação, ao contrário dos géis

induzidos termicamente em que o processo de desnaturação, agregação e geleificação são simultâneos (**Figura 3**) (ALTING, 2003).

O primeiro estágio (desnaturação térmica da proteína) promove a abertura da molécula e exposição de aminoácidos reativos (cisteína e resíduos não polares) formando agregados solúveis, porém, em condições que não produzem gel (baixa força iônica e pH diferente do ponto isoelétrico (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998; BRYANT; MCCLEMENTS, 2000). Este processo requer um controle cuidadoso das condições iniciais da solução (pH e concentração de proteína) e das condições de aquecimento (temperatura e tempo de aquecimento) (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998; ALTING, 2003). O pH da solução inicial deve ser diferente do ponto isoelétrico da proteína para assegurar que elas não se agreguem imediatamente após o aquecimento. A maioria das pesquisas é realizada em pH 7, no entanto é possível criar soluções protéicas desnaturadas com diferentes características a outros valores de pH, embora outras pesquisas nessa área ainda sejam necessárias (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1997 a e b; BRYANT; MCCLEMENTS, 1998; FOEGEDING et al., 2002).

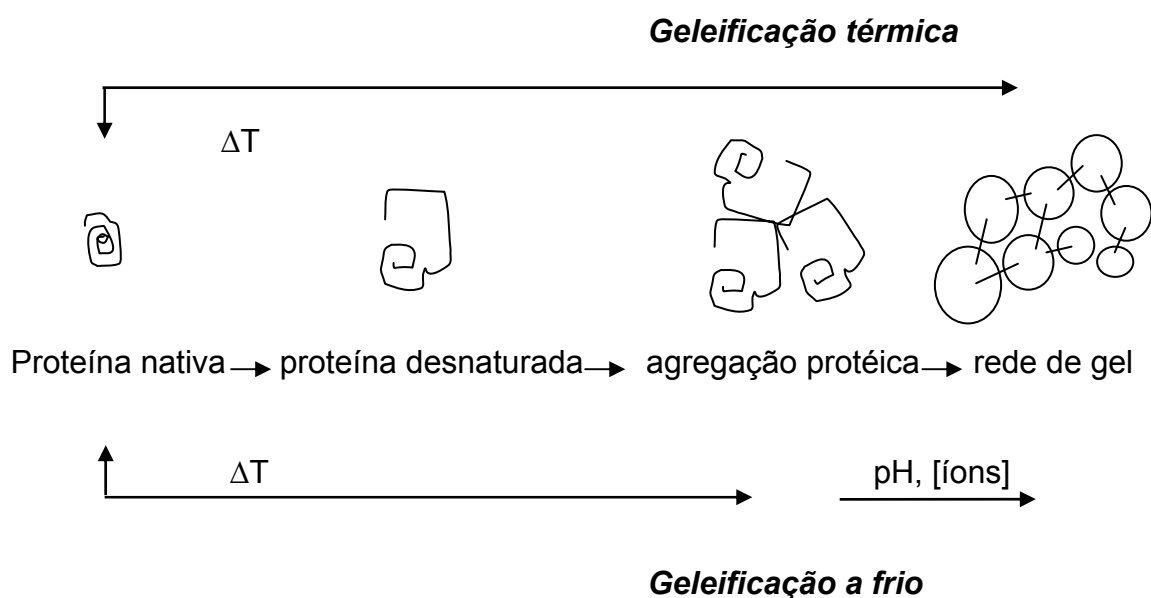


Figura 3. Conversão da proteína globular nativa em rede protéica de acordo com o procedimento de geleificação induzida pelo calor e a frio (ALTING, 2003).

A indução da geleificação pode ser realizada após adição de sal ou ácido, uréia (técnica não utilizada em alimentos) e enzimas. A adição do sal na solução protéica altera as interações entre as proteínas. Quando a solução é resfriada a temperatura ambiente e misturada ao sal, a repulsão eletrostática entre as proteínas é neutralizada, e o gel é formado (TOTOSAUS et al., 2002).

No processo de geleificação a frio induzido por Ca^{2+} a etapa de desnaturação da proteína, em geral por aquecimento, é essencial para expor os grupos reativos, necessários para formação da estrutura tridimensional do gel (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998; BRYANT; MCCLEMENTS, 1998; ALTING, 2003). Os íons divalentes como o Ca^{2+} são necessários em menores concentrações que os monovalentes para causarem agregação, devido à sua eficiência em reduzir a repulsão eletrostática e à capacidade de formar pontes salinas entre os grupos carboxílicos carregados negativamente das moléculas de proteína vizinhas (HONGSPRABHAS e BARBUT, 1997 b; TOTOSAUS et al., 2002; FOEGEDING et al., 2002). Molina e Wagner (1999) reportaram que as globulinas da soja, principalmente a fração 11S, ligam-se ao Ca^{2+} e ao Mg^{2+} induzindo a formação de agregados.

Assim como as condições utilizadas durante a etapa de desnaturação por ação do calor (concentração protéica, temperatura e tempo de aquecimento), a concentração de CaCl_2 parece ser determinante no processo de agregação de proteínas de soro de leite (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998; ALTING, 2003). Em concentrações menores ou iguais a 10 mM CaCl_2 , o mecanismo é governado principalmente pela dispersão de cargas, enquanto em concentrações maiores ou iguais a 30 mM, por ligações cruzadas de Ca^{2+} . As diferenças nos mecanismos de geleificação atribuídas às concentrações de CaCl_2 , podem ser responsáveis pelo processo de formação da rede do gel ao nível microscópico (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998).

O aumento da concentração de sal utilizado para promover a formação do gel a frio tem muitos efeitos nas propriedades dos géis de proteínas de soro de leite. Primeiramente, pode causar aumento na velocidade com que a geleificação ocorre e, secundariamente, pode causar um aumento na turbidez do gel. Acima de uma determinada concentração de sal pode ocorrer diminuição da capacidade de retenção de água do gel porque o tamanho dos poros entre as moléculas de proteína aumenta

(BARBUT, 1995; ROFF; FOEGEDING, 1996; ALTING, 2003). As características reológicas dos géis também são alteradas com aumento da concentração de sal, pois, neste caso, uma força maior é necessária para romper o gel, que também torna-se mais quebradiço (ALTING et al., 2003; ALTING et al., 2002; MULVIHILL; KINSELLA, 1988; HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998; ELOFSSON et al., 1997). Géis de proteínas de soro de leite que fraturam a baixos valores de deformação apresentam redes compostas de cadeias polipeptídicas finas e pequenas, além de poros homogêneos. Por outro lado, géis que fraturam a alta deformação têm cadeias compactas relativamente grandes e poros não homogêneos (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998).

YUAN et al. (2002) investigaram a associação induzida por Ca^{2+} das proteínas de soja, verificando que a quantidade de íons cálcio necessários para precipitar um mol de proteína em água é maior para a globulina 7S que para 11S. A precipitação das proteínas de soja por efeito do cálcio foi atribuída à formação de ligações cruzadas de Ca^{2+} , em sítios de ligação específicos, entre as moléculas protéicas da fração 11S ou às forças atrativas de van de Waals. A fração 7S formou um número pequeno de interações com cálcio, originando pequenos agregados, sendo menos propensa à precipitação pelas forças atrativas de van de Waals.

A contribuição de cada interação no processo de polimerização foi estudada por Hongsprabhas e Barbut (1997 a) utilizando agentes bloqueadores de grupos sulfidrilos ou manipulando as condições de aquecimento. Os resultados confirmaram que as interações eletrostáticas são as principais forças envolvidas na formação da rede de géis de proteína de soro de leite induzida por íons Ca^{2+} . As pontes dissulfeto, por outro lado, estão envolvidas principalmente na etapa inicial de polimerização (prévia à indução da geleificação) e ajudam na manutenção da estrutura da rede.

Marangoni et al. (2000) investigaram a estrutura dos géis induzidos por NaCl e CaCl_2 de proteínas de soro de leite desnaturadas termicamente, caracterizados por análise de fractal da microestrutura do gel. Os resultados indicaram que o tamanho dos agregados aumentaram com aumento da concentração de sal, como também mostrou Hongsprabhas e Barbut (1997 b). As dimensões fractais dos géis formados na presença de CaCl_2 foram maiores do que os formados na presença de NaCl, possivelmente devido às ligações cruzadas de Ca^{2+} .

Hongsprabhas e Barbut (1997) mostraram que suspensões de proteínas de soro de leite submetidas à etapa prévia de desnaturação (70°C/30min) resultaram em géis opacos, obtidos a frio por adição de CaCl₂, enquanto as aquecidas a 90°C formaram géis translúcidos. Este fato foi atribuído à formação de agregados de baixa massa molecular, comparado aos de alta massa molecular formados a 90°C. Os géis formados a partir das suspensões aquecidas a 70°C exibiram baixa capacidade de retenção de água comparada aos preparados a 90°C.

Na etapa da indução do gel a frio de proteínas de soro de leite, o aumento da concentração protéica favorece o aumento do módulo de Young' e a capacidade de retenção de água do gel (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1997 b). As soluções tornaram-se mais viscosas e, eventualmente, géis, de acordo com o aumento de pontos de contato entre os filamentos de proteína. O resultado foi um gel mais forte e transparente que o gel induzido pelo calor usando a mesma solução e concentração de proteína (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998).

Hongsprabhas e Barbut (1997b) avaliaram o efeito combinado da temperatura de geleificação (1, 11 e 24°C) e concentrações de Ca²⁺ (10 -120 mmol/L) na geleificação induzida por Ca²⁺ de isolado protéico de soro de leite. Baixas temperaturas de geleificação resultaram na formação de géis translúcidos. Porém, o aumento progressivo da concentração de CaCl₂ produziu géis mais opacos, indicando que agregados maiores foram formados. O incremento da concentração de CaCl₂ (10 -120 mmol/L) aumentou a força dos géis formados a 1, 11 e 24°C. A capacidade de retenção de água foi afetada somente nos géis formados a 1 e 11°C, quando a concentração de CaCl₂ aumentou de 10 para 30 mmol/L. Com exceção dos géis produzidos a 1°C com 10 mmol/L, os géis formados a baixa temperatura requerem maior força de compressão antes de fraturar-se que os géis formados a temperaturas maiores (24°C). De acordo com os autores, os resultados sugeriram que as características dos géis podem ser modificadas pelo controle tanto das condições utilizadas durante a etapa de desnaturação da proteína (aquecimento prévio) e formação do gel (temperatura de geleificação e concentração de CaCl₂), separadamente. A temperatura teve grande efeito na velocidade de geleificação e na estrutura do gel formado (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998).

Embora géis termicamente formados de proteínas da soja tenham sido extensivamente estudados, pouco se conhece sobre a capacidade das proteínas da soja de formarem gel a frio. É difícil antecipar resultados na geleificação a frio das proteínas da soja com base na literatura disponível da geleificação a frio de proteínas de soro de leite, pois o processo de geleificação depende de uma variedade de parâmetros, incluindo massa molecular, solubilidade e tamanho dos agregados (HUANG et al., 1994). As proteínas de soja são mais complexas que as do isolado protéico de leite ou a β -lactoglobulina (18 kDa) e apresentam massa molecular muito superior cerca de 200 kDa para conglicinina e 350 kDa para glicinina. Estas diferenças podem ter um impacto maior na preparação de géis produzidos a frio e nas propriedades finais dos géis (MALTAIS et al., 2005).

Maltais e et al. (op. cit.) constataram que dispersões de isolado protéico de soja previamente desnaturado pelo calor foram capazes de formar géis a temperatura ambiente, induzidos por adição de Ca^{2+} . Dependendo da concentração de proteína e/ou CaCl_2 , foram obtidos géis com propriedades reológicas, capacidade de retenção de água e opacidade diferentes. Este trabalho, segundo os autores, representa um ponto de partida para o desenvolvimento da geleificação a frio de proteínas da soja, pois ainda diferentes experimentos são necessários para estudar, no nível molecular, a formação destes géis. A expectativa é que os próximos resultados permitam aos técnicos na área de alimentos expandirem o uso das proteínas da soja no desenvolvimento de novas texturas de gel, variando ou a concentração de sal ou de proteína nas formulações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

Para a produção do isolado protéico de soja foi utilizada farinha desengordurada de soja (PROSAM R, lote FA093008ES), fornecida pela SOLAE DO BRASIL LTDA (BUNGE Alimentos – Esteio, RS). A amostra comercial de isolado protéico de soja (SAMPROSOY 90 MP, lote PI069227ES) foi fornecida pela SOLAE DO BRASIL LTDA (BUNGE Alimentos – Esteio, RS).

Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico (p.a.) e grau cromatográfico. Reagentes: Acetonitrila (J. T. Baker, Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México); metanol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA); reagente de Ellman 5, 5'- dithiobis (2-nitrobenzoic acid), (DTNB) Sigma (D-8130) da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany); β -mercaptoetanol (Merck, Hohenbrunn, Germany); uréia (Merck, Darmstadt, Germany); o dodecilsulfato de sódio (SDS) (Sigma L5750); cloreto de sódio dihidratado (Merck); cloreto de potássio mono e dibásico (Merck); ácido trifluoroacético (Merck, Darmstadt, Germany); cacodilato de sódio (Sigma A2382-5G); tetróxido de ósmio (Merck).

Água ultra pura (18,2 M Ω) foi obtida em purificador Maxima ultra pure water Elga (Elga High Wycombe, England).

4.2 Obtenção do isolado protéico de soja (IPS)

Os IPS foram obtidos a partir da farinha desengordurada de soja, utilizando o método tradicional (Petruccelli; Añón, 1995): solubilização em pH alcalino, precipitação no pl e neutralização (**Figura 4**).

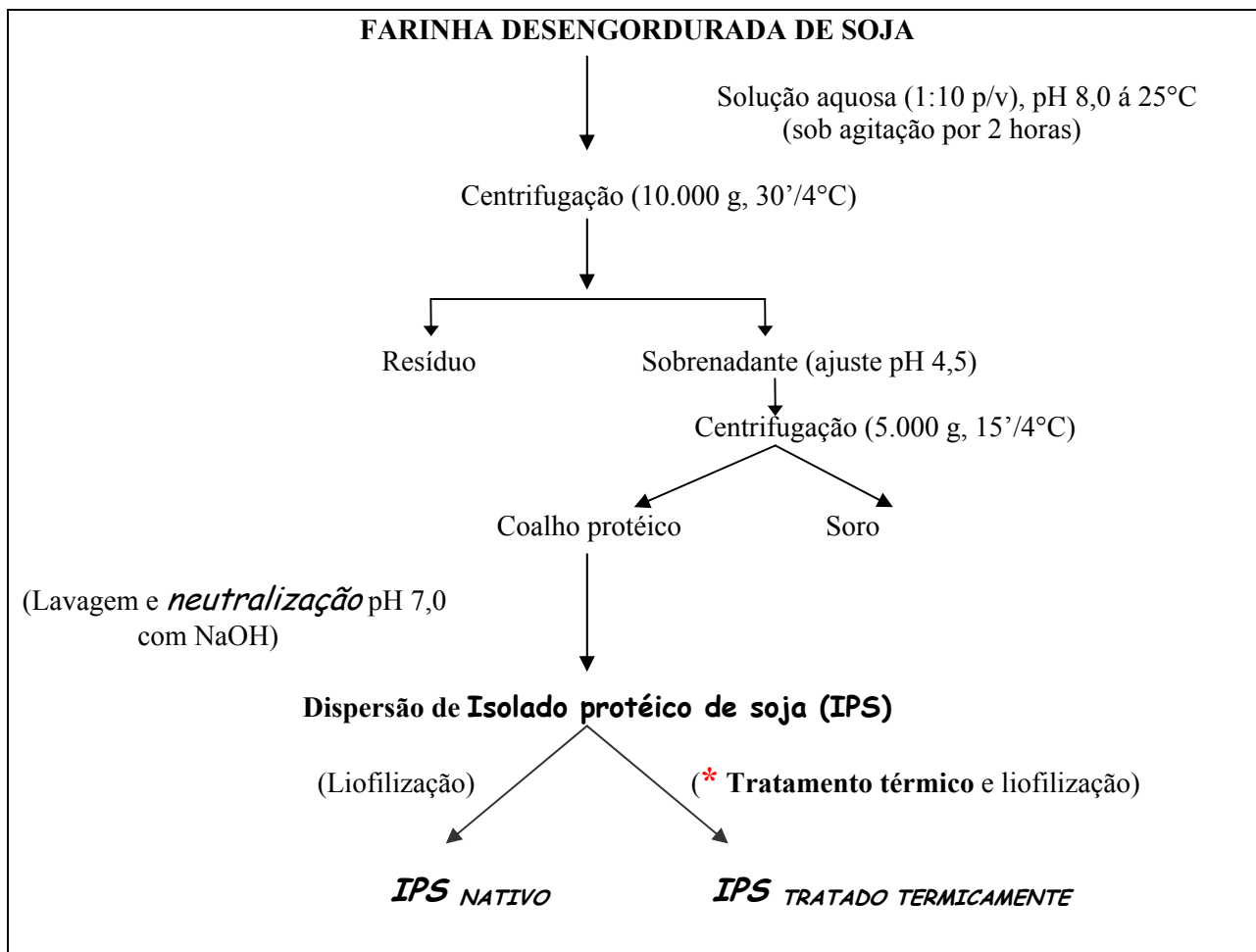


Figura 4. Fluxograma de obtenção do isolado protéico de soja.

Antes da etapa de secagem, feita por liofilização, foram preparadas dispersões com diferentes concentrações de proteína (3 e 5%) e estas submetidas à diferentes condições de temperatura (60 e 80°C) e tempo de aquecimento (15 e 30 min). Os isolados foram identificados com a letra T, e com um número referente às condições de tratamento térmico aos quais foram submetidos (**Tabela 2**). As condições experimentais (concentração de proteína, temperatura e tempo de aquecimento) utilizadas nos tratamentos térmicos visaram a obtenção de IPS com diferentes graus de desnaturação e formação de agregados protéicos solúveis.

Tabela 2. Isolados protéicos de soja produzidos a partir de dispersões com diferentes concentrações de proteína e diferentes tratamentos térmicos (temperatura e tempo).

Identificação das amostras de IPS	Concentração de proteína (%)	Tempo de tratamento (min.)	Temperatura (°C)
T1	5	15	60
T2	3	15	80
T3	3	30	80
T4	5	15	80
T5	5	30	80

Nota: os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

4.3 Caracterização dos isolados protéicos de soja

Nesta etapa do trabalho, foi realizada a caracterização estrutural e funcional dos isolados de soja.

4.3.1 Composição centesimal dos isolados de soja (IPSS)

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl segundo a A.O.A.C. (1995). Foi utilizado o fator 6,25 para a conversão de nitrogênio em proteína e as determinações foram realizadas em triplicata. A concentração de cálcio e sódio foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica em espectrofotômetro Varian – AA1475 (Mulgrave, Australia), utilizando curva padrão dos metais requeridos (A.O.A.C., 1990).

4.3.2 Calorimetria diferencial de varredura (CDV)

A análise foi realizada em calorímetro DSC Polymer Laboratories (Reometric Scientific) (Church Stretton, UK), controlado por software PLV5.41. A taxa de aquecimento utilizada foi 10°C/min, num intervalo de 25°C a 120°C (SORGENTINI et al. 1991). O equipamento foi calibrado usando índio como padrão e taxa de aquecimento de 10°C/min. Os ensaios foram realizados com amostras (3 mg) das dispersões

protéicas dos isolados de soja (14% p/p), em água destilada (sem CaCl₂) e com adição de CaCl₂ (7,1 mg Ca²⁺/g de proteína). Foram utilizadas cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas e uma cápsula dupla como referência. Após a corrida, as cápsulas contendo as amostras foram perfuradas e colocadas na estufa (105 °C) por toda a noite, para determinação do teor de proteína em base seca. A temperatura de desnaturação (Td) foi correspondente ao pico do termograma. A entalpia de desnaturação (ΔH) e a temperatura de desnaturação foram calculadas utilizando *software* do equipamento DSC. O grau de desnaturação (%) foi definido a partir do valor médio de ΔH do isolado nativo [$(\Delta H_{\text{tratado}}/(\Delta H_{\text{nativo}} \times 100))$]. Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata.

4.3.3 Fluorescência intrínseca

As medidas de fluorescência dos isolados protéicos de soja (0,5 mg/mL em 0,01M de tampão fosfato pH 7,4) foram realizadas utilizando-se espectrofotofluorômetro modelo F-4500 (HITACHI Instrument Co, Tóquio, Japão), segundo metodologia descrita por Kalapathy et al. (1997). O λ de excitação foi de 280 nm e de emissão na faixa de 300-450 nm. As curvas obtidas foram normalizadas em função das concentrações protéicas dos isolados, determinadas espectrofotometricamente (Beckman DU®70em) 280 nm com coeficiente de extinção $E^{0,1\%}_{1\text{cm}}$ de 1,204.

4.3.4 Turbidez das dispersões protéicas dos isolados de soja

A turbidez das dispersões 0,05% proteína (p/v) em solução tampão 10 mM fosfato pH 7,4, foi determinada por leitura em espectrofotômetro Beckman DU®70 (Fullerton, USA) a 600 nm. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente (25°C), em duplicata.

4.3.5 Solubilidade dos IPSs

As frações dos isolados protéicos de soja (1% de proteína p/v) foram determinados de acordo com SHIMADA e CHEFTEL (1988) nos seguintes meios: **a)** água destilada (AG); **b)** solução tampão 0,086 M Tris-HCl, 0,09 M Glicina, 0,004 M Na₂EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI); **c)** solução **b** contendo 6 M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (T/U-SDS) e **d)** solução **b** contendo 10 mM de ditioeritritol (DTT) (T/U-SDS/DTT). A dispersão das amostras de isolados de soja foi realizada com um agitador Ultra Turrax 250 (Wilmington, USA) a velocidade de 10.000 rpm e a temperatura ambiente (25 ± 3°C) por 2 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 35.700x g/15 min a 20°C em centrífuga SORVALL (Wilmington, Delaware, USA). A fração solúvel foi filtrada em papel Whatman nº 01. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 1 mL às quais acrescentou-se 9 mL da mesma solução utilizada anteriormente. A concentração de proteína solúvel foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm, utilizando-se coeficiente de extinção $E^{0,1\%}_{1\text{cm}} = 1,204$ (SHIMADA e CHEFTEL, 1988).

4.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas solúveis e totais dos isolados protéicos de soja

A técnica de eletroforese dissociante SDS-PAGE foi realizada de acordo com o sistema de tampões descrito por Laemmli (1970). Alíquotas de 5 µL de amostra foram aplicadas no gel. As eletroforeses foram realizadas em equipamento BioRad, modelo Mini Protean II (California, USA) em voltagem constante (120 V).

O perfil eletroforético das proteínas solúveis nos sistemas: AG; TRIS/GLI; T/U-SDS e T/U-SDS/DTT foi analisado a partir das alíquotas de 0,5 mL, às quais foi adicionado igual volume de tampão de amostra para eletroforese: Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), glicerol 10% (v/v), de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,05% (p/v), com e sem β-mercaptoetanol (β-ME) 5% (v/v).

O perfil eletroforético das proteínas totais das amostras também foi analisado, para comparação com o perfil das frações protéicas solúveis nas diferentes soluções

tampão. Foram preparadas dispersões aquosas com 0,5% de proteínas totais das amostras de isolados de soja em tampão de amostra com e sem o agente redutor β -ME. Utilizou-se gel de empilhamento com concentração de 4% (p/v) de acrilamida e gel de separação com 12% (p/v) de acrilamida.

Para o cálculo das massas moleculares dos polipeptídeos utilizou-se padrões de baixa massa molecular da Pharmacia Biotech Inc (USA): fosforilase b (94 KDa), albumina bovina (67 KDa), ovalbumina (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e α -lactalbumina (14,4 KDa).

Os géis foram fixados e corados com Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% (p/v) em solução de água, metanol 40% e ácido acético 10%, durante doze horas. Posteriormente, os géis foram descoloridos em solução de água, metanol 25% e ácido acético 10%.

A densitometria dos géis foi realizada em densitômetro Sharp JX 330, utilizando o software Image Máster (Pharmacia – Sweden). A porcentagem da área das subunidades α' , α e β da fração 7S; dos polipeptídeos ácido-A e básico-B da fração 11S em relação à área total, foi calculada a partir da densitometria dos géis de eletroforese das proteínas totais e solúveis dos isolados de soja.

4.3.7 Grupos sulfidrila livre (SH)

O teor de grupos sulfidrila livre foi determinado utilizando o reagente de *Ellman* (ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzóico) – DTNB) de acordo com o método de Beveridge e col. (1974) e modificações de Hardham (1981). Amostras de cada isolado de soja (100 mg) foram dispersas em 10 mL de tampão 0,086 M Tris-HCl, 0,09 M Glicina, 0,004 M Na_2EDTA e 8 M uréia, (pH 8,0), homogeneizadas por uma hora e centrifugadas a 20.897x g por 10 minutos a 20°C em centrífuga SORVALLL (Wilmington, Telaware, USA). Adicionou-se 30 μL do reagente de *Ellman*, preparado em tampão 0,086 M Tris-HCl, 0,09 M Glicina, 0,004 M Na_2EDTA e 8 M uréia, (pH 8,0) (4 mg/mL), a 3 mL dos sobrenadantes. O produto de reação, o ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB), é amarelo intenso. A leitura da absorbância do ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB) foi realizada a 412 nm, contra um branco sem amostra (tampão + *Ellman*). Determinou-se também a

absorbância a 412 nm de todas as amostras de isolado de soja antes de adicionar o reagente. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Para o cálculo utilizou-se a seguinte equação (1):

$$SH_L = 73,53 \frac{(DO1 - DO2 - DO3)}{C} \quad \text{Equação (1)}$$

onde: SH_L = concentração de sulfidrilas livres na amostra em $\mu\text{moles/g}$ de proteína; DO1 = absorbância da amostra com o reagente de *Ellman*; DO2 = absorbância da amostra sem o reativo de *Ellman*; DO3 = absorbância do branco do reagente de *Ellman*; C = concentração de proteína na amostra expressada em mg/mL ; O número 73,53, que aparece na equação, tem origem do coeficiente de extinção molar do TNB a 412 nm ($13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.3.8 Hidrofobicidade superficial

A hidrofobicidade superficial das amostras de isolados de soja foi determinada utilizando ácido 8-anilino naftaleno-sulfônico (ANS) como sonda fluorescente (HAYAKAWA; NAKAI, 1985). As amostras foram dispersas em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), de modo a se obter concentração de proteína de 10 mg/mL . As amostras foram agitadas por uma hora a temperatura ambiente e centrifugadas a $10.000 \times g/10 \text{ min}$ a 4°C . Para determinar o comprimento de onda de máxima emissão da amostra, realizou-se varredura entre 400 e 500 nm. O comprimento de onda escolhido foi de 475 nm. As amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), a fim de se obter concentrações de proteína de aproximadamente 2,5 mg/mL . A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm utilizando coeficiente de extinção $E^{0,1\%}_{1\text{cm}} = 1,204$, em espectrofotômetro Beckman DU@70 (Fullerton, California, USA). A cada amostra (3 mL) adicionou-se a sonda ANS (8 M), em alíquotas de 5 μL , até a saturação da amostra. A medida foi realizada em espectrofotofluorômetro HITACHI modelo F4500. Tanto o branco como os conjugados proteína-ANS foram obtidos utilizando comprimentos de excitação 363 e emissão 475 nm.

4.3.9 Perfil de hidrofobicidade/hidrofilicidade

O perfil de hidrofobicidade/hidrofilicidade foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), segundo a metodologia escrita por Oomah et al. (1994). As amostras (5 mg de proteína/mL) em tampão 0,035 M Tris-HCl, 0,4 M NaCl (pH 7,6) foram homogeneizadas por 30 minutos e centrifugadas 20.897x *g*, a 5°C. O sobrenadante foi filtrado em um filtro Millipore com tamanho de poro de 0,22 µm. A concentração de proteína solúvel foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm, utilizando coeficiente de extinção $E^{0,1\%}_{1\text{cm}}$ de 1,204, em espectrofotômetro Beckman DU®70. As corridas foram realizadas em equipamento de marca Varian, modelo 9050 (Palo Alto, Califórnia, EUA) e coluna Varian, C₁₈ FR100 (250 mm x 4,5 mm D.I.), acoplado a um detector UV-VIS. A análise foi realizada a temperatura ambiente e as proteínas eluídas em um gradiente linear de 20 a 65% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) no tempo de 60 minutos com fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 280 nm (0,02 AUFS). Para fins de análise, os cromatogramas foram divididos em três regiões: região I, de 0 a 8 min de eluição (eluente com 0 - 20% de acetonitrila e 0,1% TFA); região II, de 8 a 16 min de eluição (eluente com 20 - 35% de acetonitrila e 0,1% TFA); região III de 16 a 40 min (eluente com 35 - 65% de acetonitrila e 0,1% TFA). Foram realizadas duas extrações e cada extrato foi analisado em duplicata.

4.3.10 Perfil de distribuição de massa molecular aparente

Foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM), de acordo com a metodologia descrita por Kalapathy et al. (1997). Foi utilizado um equipamento Varian, modelo 9075 (Palo Alto, Califórnia, EUA), coluna RES ELUT SEC 3000 STEEL (300 x 7,75 mm D.I.) e detector de absorvância de duplo comprimento de onda e software Star Chromatography Workstation (Varian, Walnut Creek, CR, USA). As amostras de IPS foram diluídas a 0,1% (p/v) de proteína em tampão 35 mM Tris-HCl e 0,15 M (pH 6,8), homogeneizadas por 30 minutos e centrifugadas a 20.897x *g*/10 min a temperatura ambiente (24°C). Em seguida, os

sobrenadantes foram filtrados em um filtro Millipore 0,22 μm e 40 μL de amostra foi injetada na coluna. As amostras foram eluídas isocraticamente em tampão 0,05 M fosfato de potássio (pH 6,8) contendo 0,15 M NaCl a um fluxo de 0,8 mL/min, a temperatura ambiente e detecção a 280 nm. A curva padrão foi obtida com os seguintes marcadores de proteína Bio-Rad (Hercules, CA, EUA): tiroglobulina bovina (617 kDa), gama globulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B₁₂ (1,35 kDa).

A concentração de proteína solúvel foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm com um coeficiente de extinção $E^{0,1\%}_{1\text{cm}}$ de 1,204, em espectrofotômetro Beckman DU®70.

4.3.11 Determinação da capacidade de absorção de água (CAA)

A capacidade de absorção de água foi determinada utilizando-se equipamento similar ao aparato desenvolvido por Baumann, 1967 e modificado por Scilingo (2000). Para avaliar o efeito do cloreto de cálcio (CaCl₂) na CAA dos diferentes isolados de soja produzidos em laboratório, as dispersões protéicas com CaCl₂ foram liofilizadas para realização da análise.

Para medir a CAA dos isolados foi colocada uma quantidade exata de amostra, em forma de monocamada, distribuída utilizando uma peneira de 250 μm , sobre a superfície de um papel filtro umedecido. Imediatamente foi cronometrado o tempo que o pó protéico levou para absorver um determinado volume de água, seguindo a cinética de absorção das amostras contra a força de gravidade. A medida foi realizada pelo menos em triplicata.

4.3.12 Comportamento reológico

O comportamento reológico dos isolados protéicos de soja foi determinado usando as seguintes condições: dispersões de proteína a 8% (p/p) em água e em 10 mM de cloreto de cálcio. A medição foi realizada em reômetro de tensão controlada Thermo Haake RheoStress 600 (Waltham, Massachusetts, EUA), utilizando sensor de

pratos paralelos (0,105 mm). O prato superior usado foi um rotor de titânio (C35/2 TI - tipo cone-placa). A desidratação da amostra durante o ensaio foi prevenida com a adição de silicone com baixa viscosidade ao redor das bordas dos pratos. O ensaio reológico foi realizado a 25°C. Os dados experimentais foram obtidos pelo registro da tensão de cisalhamento (*shear stress*), taxa de deformação (*shear rate*) e viscosidade aparente (η).

Os parâmetros índice de comportamento de fluxo (n) e de consistência (K) foram obtidos do modelo de Ostwald de Waele ou lei da potência, aplicado a curva de escoamento de ida das dispersões de isolados de soja sem a presença de cloreto de cálcio.

4.4 Obtenção e caracterização dos géis protéicos de soja obtidos a frio

4.4.1 Obtenção do gel a frio de isolados de soja

A partir dos isolados de soja obtidos em laboratório e do isolado comercial MP foram preparadas dispersões 14 e 16% de proteína em água deionizada. Estas dispersões foram diluídas em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) para obtenção de soluções com concentração final de proteína de 14% (a partir da dispersão 16%) e 12, 10, 8 e 6% (a partir da dispersão 14%). As concentrações finais de CaCl_2 foram 0, 5, 10 e 15 mM, no pH da amostra (6,7). A adição das soluções de CaCl_2 foi feita sob agitação com espátula em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram armazenadas a 4°C por 15 horas, antes de serem analisadas. A formação de gel induzida por adição de íons Ca^{2+} foi avaliada visualmente logo após o preparo, para verificar se houve a geleificação imediata, e após 15 horas. As amostras foram analisadas subjetivamente em função das seguintes características: opacidade, cor, formação de precipitado, dispersão viscosa e tipo de gel (auto-sustentável ou não).

4.4.2 Caracterização reológica dos géis

4.4.2.1 Perfil de textura

O perfil de textura (TPA) foi analisado em texturômetro *Texture Analyser* modelo TA.XT2 (Stable Micro Systems Ltd, England). Os géis foram preparados em recipientes de acrílico com 3 cm de diâmetro interno e 5 cm de altura e superfície lisa. Os géis foram comprimidos com uma sonda (*probe*) cilíndrica com 2,5 cm de diâmetro. A curva da força (N) versus tempo (seg) foi obtida a uma velocidade de 20 mm seg⁻¹ por um deslocamento da sonda de 50 mm e deformação de 20%. Foram determinados dureza, adesividade e coesividade. A dureza foi definida como altura do pico da força na primeira compressão, a adesividade considerou-se a área negativa (A2:3) e a coesividade como divisão das áreas dos picos da força na primeira e na segunda compressão (PONS; FISZMAN, 1996). A análise dos géis foi realizada em seis réplicas.

4.4.2.2 Viscoelasticidade (Reometria)

As propriedades viscoelásticas dos géis foram determinados por meio de medidas oscilatórias utilizando-se reômetro de tensão controlada (RheoStress 600 – ThermoHaake), utilizando um sensor de pratos paralelos. O prato superior usado foi um rotor de titânio (C35/2 TI - tipo cone-placa). Os géis analisados foram preparados com concentração protéica de 12% (p/p) e concentrações de CaCl₂ 0, 5 e 15 mM após 15 horas a 4°C. O comportamento dinâmico dos géis, módulos elástico G', viscoso G'' e da tangente delta ($\tan \delta$) como função da freqüência de oscilação (0,01 e 1 Hz) foi avaliado a 25°C. A tensão de cisalhamento foi de 0,05 Pa. Para prevenir a desidratação da amostra durante o ensaio, adicionou-se silicone de baixa viscosidade ao redor das bordas dos pratos. A faixa da viscoelasticidade linear das amostras foi determinada pela varredura de deformação e tensão a 1 Hz de freqüência. As medidas reológicas foram realizadas em duplicata.

4.4.3 Solubilidade dos géis

Amostras de géis (1 g) preparados com 12% (p/p) de proteína e 15 mM de cloreto de cálcio e sem a presença de cálcio (0 mM) foram dispersas nas seguintes soluções aquosas (10 mL): **a)** água destilada (AG); **b)** solução tampão 0,086 M Tris-HCl, 0,09 M Glicina, 0,004 M Na₂EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI); **c)** solução **b** contendo 6 M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (T/U-SDS) (PUPPO; AÑÓN, 1998). As amostras de géis preparados com 15 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) também foram dispersas em solução de 15 mM CaCl₂ (solução **d**). Foram, em seguida, centrifugadas a 35.700x g/15 min a 20°C em centrífuga SORVALL (Wilmington, Delaware, USA). A fração solúvel foi filtrada em papel Whatman nº 1. Em seguida, foram retirados alíquotas de 1 mL às quais acrescentou-se 9 mL das soluções AG, TRIS/GLI ou T/U/SDS. A concentração de proteína solúvel foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm, utilizando coeficiente de extinção $E_{0,1\%}^{1\text{cm}}$ de 1,204 (SHIMADA e CHEFTEL, 1988).

4.4.4 Perfil eletroforético das frações protéicas solúveis nas diferentes soluções aquosas

O perfil eletroforético das proteínas solúveis foi analisado a partir das alíquotas de 0,5 mL coletadas da fração protéica solúvel (10 mg de proteína/ mL), procedimento descrito no item 4.3.6, acrescentados de igual volume de tampão de amostra para eletroforese dissociante: Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), glicerol 10% (v/v), de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,05% (p/v), com e sem β -mercaptoetanol (β -ME) 5% (v/v). Utilizou-se gel de empilhamento com concentração de 4% (p/v) de acrilamida e gel de separação com 12% (p/v) de acrilamida. A técnica de eletroforese dissociante SDS-PAGE foi realizada de acordo com o sistema de tampões descrito por Laemmli (1970). Aplicaram-se alíquotas de 5 μ L de amostra no gel. As eletroforeses foram realizadas em miniplacas com o equipamento BioRad, modelo Mini Protean II e se realizaram a voltagem constante de (120 V), por um período de aproximadamente duas horas. Para o cálculo das massas moleculares dos

polipeptídeos utilizaram-se padrões de baixa massa molecular da Pharmacia Biotech Inc (USA): fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Os géis foram fixados e corados com Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% (p/v) em solução de água, metanol 40% (p/v) e ácido acético 10% (p/v), durante doze horas. Posteriormente, os géis foram descoloridos em solução de água, metanol 25% (p/v) e ácido acético 10% (p/v).

Realizou-se a densitometria dos géis em densitômetro Sharp JX 330, utilizando o software Image Master (Pharmacia – Sweden).

4.4.5 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água dos géis foi avaliada de acordo com o método de Jauregui, Regenstein e Baker (1981), com as modificações descritas por Beuschel et al. (1992). Amostras dos géis (1g) foram pesadas em papel filtro Whatman nº 1 e centrifugadas a 268x g/10 min a 6°C em centrífuga SORVALL (Wilmington, Delaware, USA). A água retirada do gel foi calculada pela diferença de peso entre o papel de filtro seco e úmido. Foi utilizada uma tela para evitar a aderência do gel no papel filtro. A capacidade de retenção de água (%) dos géis foi calculada pela relação: capacidade de retenção de água (%) = 100 – (% de umidade retirada por centrifugação). A análise de cada amostra de gel foi realizada em duplicata.

4.4.6 Microscopia

A microestrutura dos géis foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os géis (12%) foram fixados em glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com ácido tânico 1% (p/v), pH 7,2. Após 90 minutos, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), por duas vezes, 15 minutos cada. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% (v/v) diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), durante 120 minutos a 4°C e duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), 15 min cada lavagem. A desidratação

das amostras de géis foi iniciada por lavagem em série etanólica (30, 50, 70, 95%), 20 min cada e 100% por três vezes de 10 min. O processo de desidratação foi finalizado em um *Critical Point Dehydration* (CPD) 030 marca Balzers. As amostras secas foram fraturadas e os fragmentos fixados nos *stubs* com carbono e esmalte sob o calor de uma placa de aquecimento por aproximadamente 10 minutos. A metalização das amostras foi realizada com ouro (200seg/40mA) no equipamento SCD 050 marca Balzers. Por fim, realizou-se a observação ao MEV (JEOL JSM – 5880LV, Japan).

4.5 Análise estatística

A diferença entre as médias foram comparadas por análise de variância utilizando o teste de Tukey ao nível de significância de 95% (COCKRAN; COX, 1957). Utilizou-se o programa STATISTICA (versão 5.0) (StaSoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos IPSs

5.1.1 Composição centesimal dos isolados de soja (IPSs)

A composição centesimal dos IPS obtidos em laboratório e do IPS comercial (IPS MP) está apresentada na **Tabela 3**. Os valores médios do teor proteico, umidade, cinzas, cálcio e sódio encontrados para os isolados estão de acordo com os valores descritos na literatura (WOLF; COWAN, 1975, HENN; NETTO, 1998, LIU, 1997). A concentração de cálcio (0,08%) encontrada nestes isolados foi menor que a reportada por Liu (1997) (0,13 – 0,24%). A composição centesimal dos isolados protéicos de soja varia em função de uma série de fatores: variedade da soja, condições do meio em que são cultivadas e do seu processo de obtenção (PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994).

Tabela 3. Composição centesimal dos isolados protéicos de soja (IPSs) sem tratamento térmico (T0), tratados termicamente (T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30')) e comercial (MP).

IPS	Proteínas (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Cálcio (%)	Sódio (%)
T0	97,68 ± 0,42	0,50 ± 0,01	3,54 ± 0,05	0,08	1,10
T1	97,98 ± 0,36	0,11 ± 0,13	3,42 ± 0,03	0,08	1,10
T2	96,08 ± 0,59	1,5 ± 0,01	3,14 ± 0,01	0,08	1,10
T3	97,33 ± 0,16	0,71 ± 0,06	3,10 ± 0,06	0,09	1,10
T4	98,23 ± 0,34	1,63 ± 0,12	3,53 ± 0,02	0,08	1,10
T5	98,43 ± 0,33	0,52 ± 0,01	3,50 ± 0,01	0,07	1,10
MP	89,50 ± 0,55	3,14 ± 0,33	3,14 ± 0,33	0,13	-

Valores médios de três determinações ± desvio padrão.
Valores expressos em base seca.

5.1.2 Calorimetria diferencial de varredura (CDV)

Na **Tabela 4** pode-se observar os valores médios de ΔH e temperatura de desnaturação (Td) dos IPS tratados termicamente sob diferentes condições.

Tabela 4. Valores médios de entalpia de transição (ΔH) e temperatura de desnaturação (Td) dos isolados de soja (14%) sem presença de solução salina e após adição de CaCl_2 (12,5 mM), medidas por DSC. Os isolados de soja correspondem aos: T0 (sem tratamento), tratados termicamente (T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30')) e MP (comercial).

IPS	Dispersão protéica sem CaCl_2			Dispersão protéica com adição de CaCl_2 12,5 mM (7,1 mg Ca^{2+} /g de proteína)		
	ΔH (J/g)	Td ₁ (°C)	Td ₂ (°C)	ΔH (J/g)	Td ₁ (°C)	Td ₂ (°C)
T0	13,42±0,08 aA	78,71±0,26	93,17±0,03	13,42±0,81 aA	78,25±0,32	93,73±0,54
T1	9,95±0,58 bA	77,37±1,76	91,8±0,23	12,47±1,07 aB	79,22±2,35	94,41±0,45
T2	3,32±0,48 cA	-	93,69±0,55	1,63±0,33 bdB	-	96,50±0,93
T3	2,95±0,59 dA	-	94,36±0,40	2,95±1,08 bcA	-	96,88±2,06
T4	2,29±0,51 dA	-	93,78±0,21	3,99±0,00 cB	-	96,02±0,00
T5	2,5±0,26 dA	-	94,20±0,48	1,34±0,25 bdB	-	95,27±0,41
MP	-	-	-	-	-	-

Valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O termograma do IPS T0 apresentou dois picos, que correspondem às frações 7S (β -conglucina) e 11S (glicina) e valor de entalpia de transição de 13,42 J/g de proteína. O isolado T1, submetido ao tratamento térmico com temperatura mais baixa que os demais, 60 °C, também apresentou dois picos, referentes às frações 7S e 11S, porém com menor entalpia de desnaturação que o T0. Os isolados tratados termicamente a 80°C, por outro lado, apresentaram valores de ΔH menores e apenas um pico de transição endotérmica, correspondendo à fração 11S, indicando que estes tratamentos levaram à desnaturação total da fração 7S e parcial da 11S. O termograma

do isolado comercial MP não apresentou nenhum pico, indicando a completa desnaturação de ambas as frações.

Avaliando-se o grau de desnaturação das amostras de isolado de soja, dado pela relação percentual entre valor de ΔH do isolado tratado e do isolado nativo (T0), os seguintes valores foram obtidos: 25,86% para o T1, 75,86% para o T2, 78,02% para o T3, 79,81% para o T4 e 81,37% para o T5. Os resultados indicam que a temperatura de aquecimento, a concentração de proteína bem como o tempo de tratamento influenciaram o grau de desnaturação dos IPSs.

Tang, Choi e Ma (2007) reportaram completa desnaturação da β -conglucina, diminuição de 15% do ΔH da glicinina além do aumento da Td de 94,1°C para 97,6°C após o tratamento térmico a 80°C/45 min. Arrese et al. (1991) reportou desnaturação de 65% após tratamento térmico a 85°C por 5 min, com concentração de 1% de proteína.

Comparando-se o ΔH determinado na presença de CaCl_2 (12,5 mM) com os determinados sem o sal, verificou-se que para os isolados T4 e T1 houve aumento, para os isolados T5 e T2 diminuição, enquanto para T0 e T3 manteve-se inalterado. Estes fatos sugerem que a ligação com o íon Ca^{2+} foi diferente em função do tratamento térmico e das alterações ocorridas em consequência dele. Scilingo (2000), em estudo sobre o efeito do cálcio nas propriedades estruturais e funcionais de isolados de soja, verificou aumento do ΔH das proteínas com a adição de cálcio. Segundo Mata et al. (1998), em alguns casos, quando a interação íon-proteína é específica, o ΔH de desnaturação pode aumentar com a adição de íon. No entanto, em concentrações maiores de cálcio ($> 2,87 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{g}$ de proteína), poderia prevalecer a agregação, por efeito combinado da presença de cálcio e do aquecimento, contribuindo com sua exotermicidade para diminuição do ΔH (MURRAY et al. 1985; SCILINGO, 2000).

Em relação à temperatura de desnaturação para todos os IPSs, houve um pequeno aumento com a adição de CaCl_2 entre 1 e 3°C, que pode sugerir aumento da estabilidade térmica da proteína na presença do sal. Puppo (1997) mostrou que em isolados de soja de pH 8,0 tanto a globulina 7S como a 11S aumentaram sua estabilidade térmica quando a concentração de CaCl_2 aumentou de 0 a 100 mM CaCl_2 . A temperatura de desnaturação das frações 7S e 11S aumentaram de 79 para 86°C e de 93 para 104°C, respectivamente. Yamauchi et al. (1991) observaram um

deslocamento de 20°C na temperatura de desnaturação quando a concentração de NaCl aumentou de 0 para 1M.

5.1.3 Fluorescência intrínseca

O anel indol do triptofano (Trp) apresenta propriedades de fluorescência relativamente sensíveis ao microambiente. A magnitude da intensidade de fluorescência, assim como o comprimento de onda de máxima emissão fluorescente, são sensíveis à polaridade do ambiente (NAKAI; LI-CHAN; ARTEAGA, 1996). A **Figura 5** mostra o espectro de fluorescência (comprimento de onda de emissão máxima e intensidade de fluorescência) dos isolados de soja obtidos sem e com tratamento térmico e o comercial.

O espectro de fluorescência de todos os IPSs mostrou não haver mudança no ambiente do Trp, pois não foi observado deslocamento para o vermelho (*red-shift*) no comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência (λ_{max}). Isto sugere que a alteração estrutural das proteínas em função do tratamento térmico não foi suficiente para expor o Trp a um ambiente mais polar. No espectro de fluorescência do isolado comercial MP houve um pequeno deslocamento para o vermelho no λ_{max} da proteína. Por outro lado, a proteína desnaturada pode não ter apresentado deslocamento para o vermelho no λ_{max} , como esperado, devido a formação de agregados impedindo a exposição do Trp a um ambiente mais polar (MARANGONI et al., 2000).

O deslocamento para o vermelho, juntamente com a intensidade da fluorescência, é utilizado para caracterizar desnaturação. Em geral, para as proteínas globulares desnaturadas termicamente, o deslocamento para o vermelho no λ_{max} vem acompanhado pelo aumento na intensidade da fluorescência (YANG et al, 2001). Embora o deslocamento para o vermelho não tenha sido observado para as amostras de IPSs, ocorreram variações na intensidade das amostras em função da concentração de proteína e da temperatura de aquecimento.

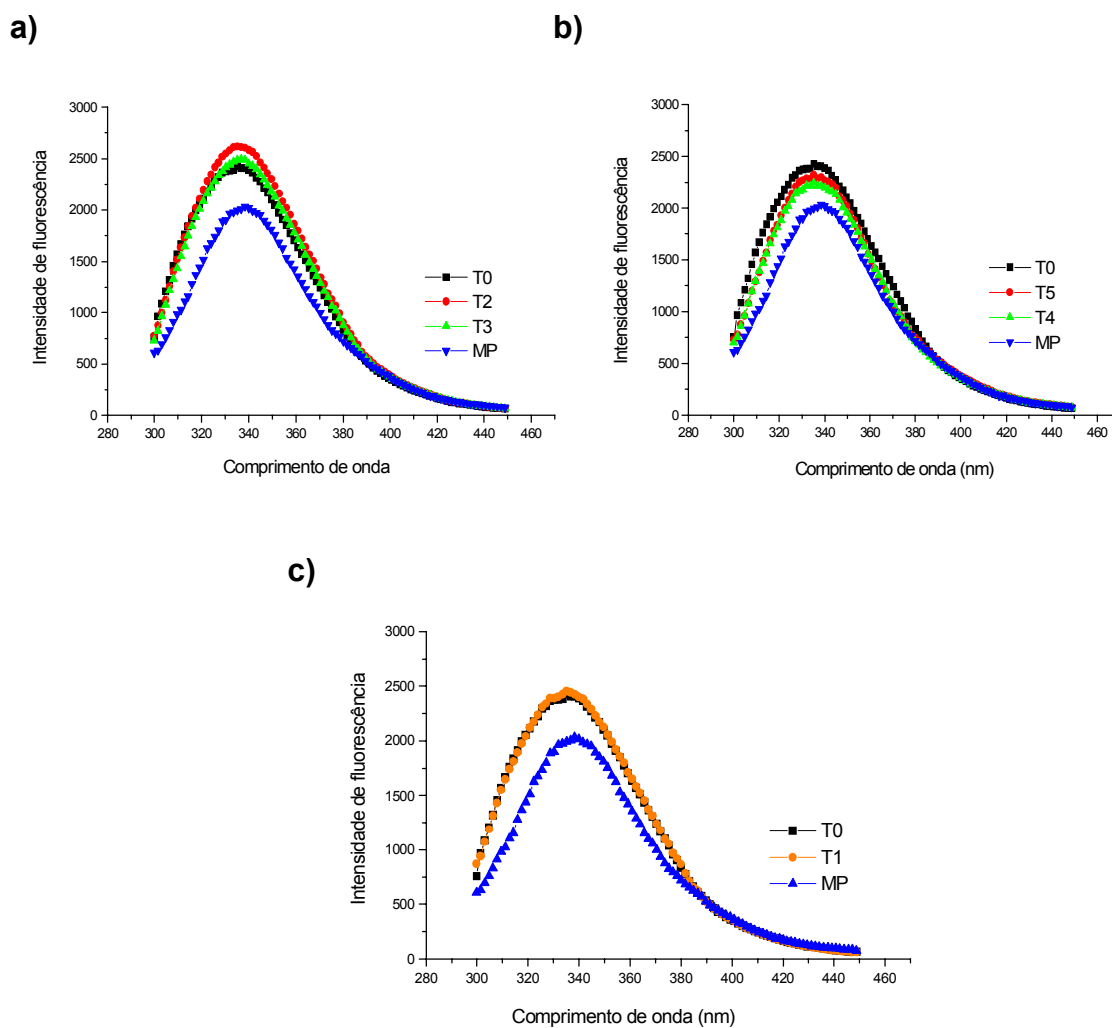


Figura 5. Espectro de fluorescência dos isolados de soja sem tratamento térmico (T0), comercial (MP) e isolados tratados termicamente, nas seguintes condições (proteína, temperatura, tempo): **a)** T0, T2 (3%,80°C,15'), T3 (3%,80°C,30') e MP; **b)** T0, T4 (5%,80°C,15'), T5 (5%,80°C,30') e MP; **c)** T0, T1 (5%,60°C,15') e MP.

Nos isolados T2 e T3, tratados termicamente com 3% de proteína, houve aumento da intensidade de fluorescência, enquanto nos isolados T4 e T5, previamente tratados termicamente com 5% de proteína, a intensidade da fluorescência diminuiu e, no isolado T1, tratado termicamente com 5% de proteína a 60°C, o resultado foi semelhante ao do T0 (sem tratamento). A menor intensidade da fluorescência foi a do isolado comercial MP. Uma possível explicação para a diminuição na intensidade da fluorescência é que o Trp passou a ocupar uma posição com maior supressão do que na estrutura nativa, fato que pode ser atribuído à agregação da proteína.

Muitos processos podem levar à diminuição de emissão, ou *quenching*, que pode ter origem na formação de complexos, transferência de energia de fluorescência, dentre outros. Marangoni et al. (2000) relataram deslocamento para o vermelho de 4,5 nm no comprimento de onda de máxima emissão fluorescente do Trp e diminuição significativa da intensidade de fluorescência quando as proteínas de soro de leite foram desnaturadas por tratamento térmico. De acordo com os autores, ambos os efeitos são devido à exposição dos grupos hidrofóbicos em decorrência da desnaturação protéica.

5.1.4 Turbidez

A medida da turbidez das dispersões dos IPSs foi realizada com a finalidade de estimar o grau de agregação protéica. A agregação de moléculas de proteína conduz a formação de partículas que dispersam a luz e fazem a solução parecer turva (HERMANSSON, 1979). A concentração de agregados não é determinada precisamente porque a turbidez depende tanto do tamanho e efeito do espalhamento dos agregados como da sua concentração. Portanto, a turbidez fornece uma indicação qualitativa da extensão da agregação protéica (MCCLEMENTS; KEOGH, 1995).

A turbidez das soluções dos IPSs tratados termicamente aumentou significativamente em relação à da solução do IPS não tratado, indicando a formação de agregados (**Tabela 5**).

Os isolados aquecidos com 5% de proteína (T3 e T4) apresentaram turbidez maior que os isolados tratados com 3% de concentração protéica (T1 e T2) ($p < 0,05$). Para o mesmo tempo de aquecimento, a turbidez foi maior para os IPSs tratados com 5% de proteína. Para as amostras aquecidas com 3% de proteína, o tempo de aquecimento (15 e 30 min) teve maior efeito que para os isolados tratados com 5% de proteína. Interessante notar que os isolados T1 e T2, embora tenham apresentado uma pequena diminuição da turbidez em relação ao T0, apresentaram uma significativa diminuição de ΔH , indicando que a desnaturação não resultou na formação de agregados ou os agregados não foram detectáveis por esta técnica.

Tabela 5. Transmitância (%) das dispersões dos isolados protéicos de soja nativo (T0) e tratados termicamente. Os isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15') e T5 (5%,80°C,30').

IPSs	Transmitância (%)
T0	98,91 ± 0,02 a
T1	97,66 ± 0,19 b
T2	97,75 ± 0,12 b
T3	96,43 ± 0,02 c
T4	94,00 ± 0,10 d
T5	93,87 ± 0,53 d

¹ Valores médios de três determinação ± desvio padrão.

² Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

O estudo sobre agregação térmica dos isolados protéicos de soja realizado por Petruccelli e Añón (1995) mostrou que a agregação das subunidades ácidas e básicas da glicinina dos isolados de soja ocorre em tratamentos térmicos com temperaturas maiores que 85°C e que o aumento da concentração de proteína (< 10 mg/mL) do isolado favorece a agregação.

5.1.5 Solubilidade dos IPSs

A solubilidade dos IPS nos diferentes meios: água destilada (AG); solução tampão 0,086 M Tris-HCl, 0,09 M Glicina, 0,004 M Na₂EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI); solução TRIS/GLI + 6 M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (T/U-SDS) e solução TRIS/GLI + 10 mM de ditioeritritol (DTT) (T/U-SDS/DTT) pode ser observado na **Figura 6**.

No presente trabalho, a solubilidade dos IPSs em AG foi ao redor de 80% para os isolados T0 (nativo), T2 e T3 (isolados tratados com 3% de proteínas), valor semelhante aos reportados por outros autores para isolados com estrutura nativa (HERMANSSON, 1973; WAGNER; SORGENTINE; AÑÓN, 1996; SCILINGO, 2000). Porém, os isolados T4 e T5, tratados termicamente com 5% de proteína, apresentaram

solubilidade em AG $\leq 60\%$, assim como o MP. Wagner, Sorgentine e Añón (2000) reportaram solubilidade em água de isolados de soja obtidos em laboratório tratados a 90°C com concentrações de proteínas menores que 5% acima de 60%, enquanto que para um isolado comercial solubilidade $< 60\%$. A desnaturação das proteínas, conforme evidenciado pela análise térmica dos isolados protéicos, pode ter levado à interação entre as moléculas, promovendo a agregação e insolubilização parcial das proteínas (DAMODARAN, 1997).

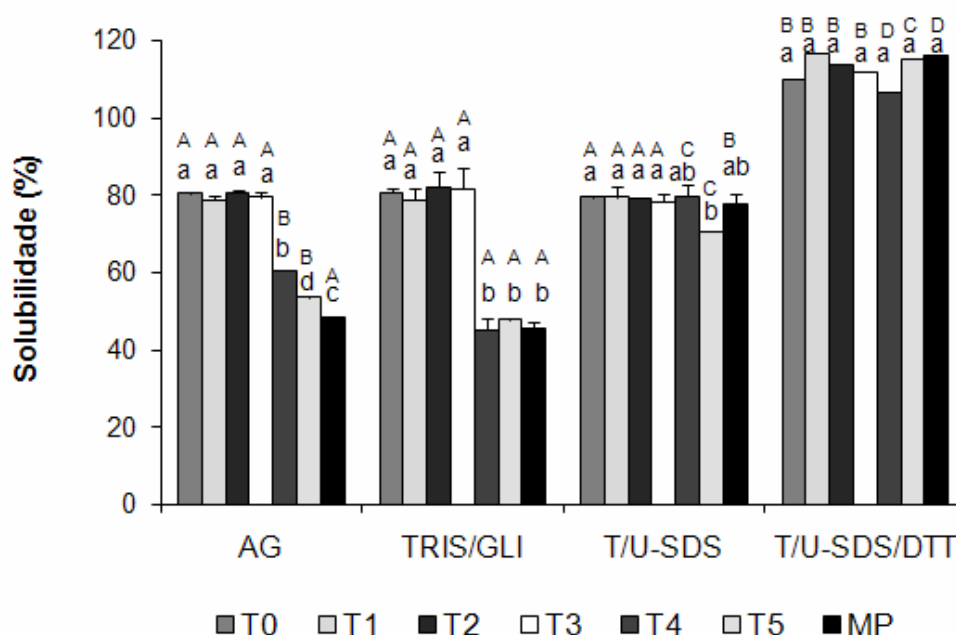


Figura 6. Solubilidade dos isolados protéicos de soja T0 (nativo) e MP (comercial) e dos isolados tratados termicamente, nas seguintes condições (proteína, temperatura, tempo): T1 (5%, 60°C ,15'); T2 (3%, 80°C ,15'); T3 (3%, 80°C ,30'); T4 (5%, 80°C ,15') e T5 (5%, 80°C ,30'). Letras minúsculas diferentes em cada meio de extração e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

Em relação à solubilidade em AG e em TRIS/GLI, pode-se dividir os isolados em dois grupos: (1) T0, T1, T2 e T3 e (2) T4, T5 e MP. As diferenças entre os dois grupos estão na menor solubilidade do segundo grupo ($p < 0,05$). A solubilidade dos isolados do primeiro grupo também foi semelhante nos demais solventes estudados. Embora tanto o ΔH como a turbidez destes isolados sejam diferentes, indicando desnaturação parcial

e agregação, a solubilidade nos solventes não indica a formação de agregados por interações S-S, já que a solubilidade dos isolados tratados termicamente foram iguais à do T0 (sem tratamento). Por outro lado, a menor solubilidade dos isolados T4, T5 e MP em AG e TRIS/GLI sugere que os agregados foram formados principalmente via interações hidrofóbicas, pois romperam-se parcial ou totalmente por ação dos desnaturantes (uréia e SDS). A concentração de proteína no tratamento dos isolados T4 e T5 (5%) favoreceu a interação proteína-proteína via interação hidrofóbica, o que não aconteceu, ou aconteceu em menor proporção, quando os IPSs foram tratados termicamente com 3% de proteína.

A total solubilização em T/U-SDS/DTT de todos os IPSs tratados e do T0, contra aproximadamente 80% no mesmo tampão sem o agente redutor DTT (T/U-SDS), sugere que não houve a formação de pontes S-S. Shimada e Cheftel (1988), ao contrário, relataram que cerca de 10% dos constituintes protéicos foram insolubilizados devido à formação de ligações dissulfeto intra e intermoleculares em decorrência do aquecimento de isolados protéicos de soja, a 80°C por 30 min. A solubilidade desses isolados em solução tampão TRIS/GLI com desnaturantes foi de 90%, superior ao encontrado em nosso trabalho.

A menor solubilidade apresentada pelo isolado MP pode ser atribuída ao processamento industrial e/ou presença de sais como $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e ou fosfolípidos (WAGNER; SORGENTINI; AÑÓN, 2000).

5.1.6 Perfil eletroforético das proteínas totais e solúveis em diferentes meios

O perfil eletroforético das proteínas totais, obtido em ambiente não redutor, dos IPSs T0, T1, T2, T3, T4 e T5, foram similares (**Figura 7**). Isto confirma os resultados de solubilidade, isto é, que não houve formação de ligações S-S em decorrência dos tratamentos térmicos. O perfil do isolado comercial (MP) não apresentou a banda referente ao agregado das subunidades AB-11S e de uma das frações ácidas da glicinina. Nos perfis de todos os IPSs, observou-se uma banda no topo do gel, o que indica a presença de compostos de alta massa molar.

Na **Figura 8** pode-se observar o perfil eletroforético, em ambiente não redutor, das proteínas solúveis dos IPS nos diferentes meios de extração (AG, TRIS/GLI, T/U-SDS e T/U-SDS/DTT).

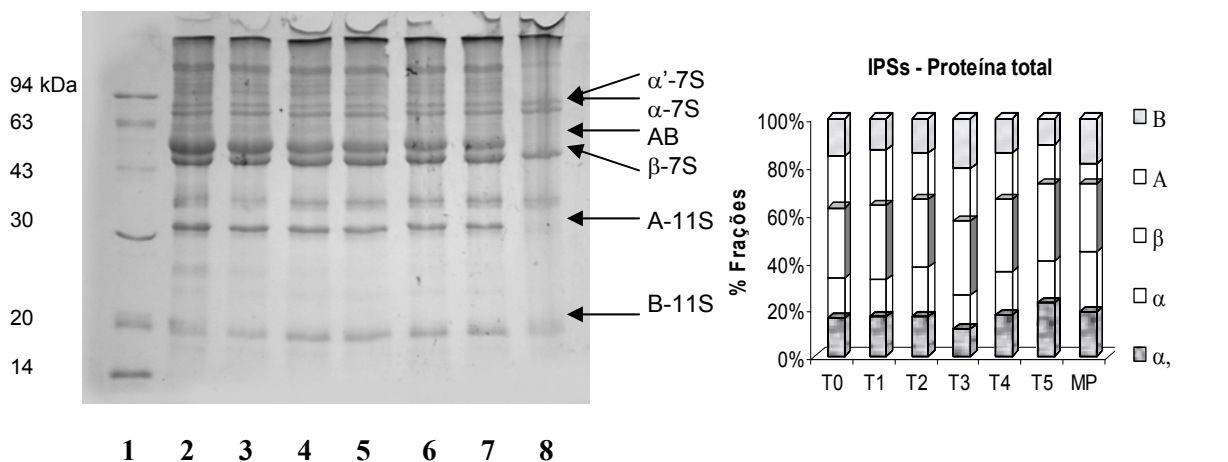
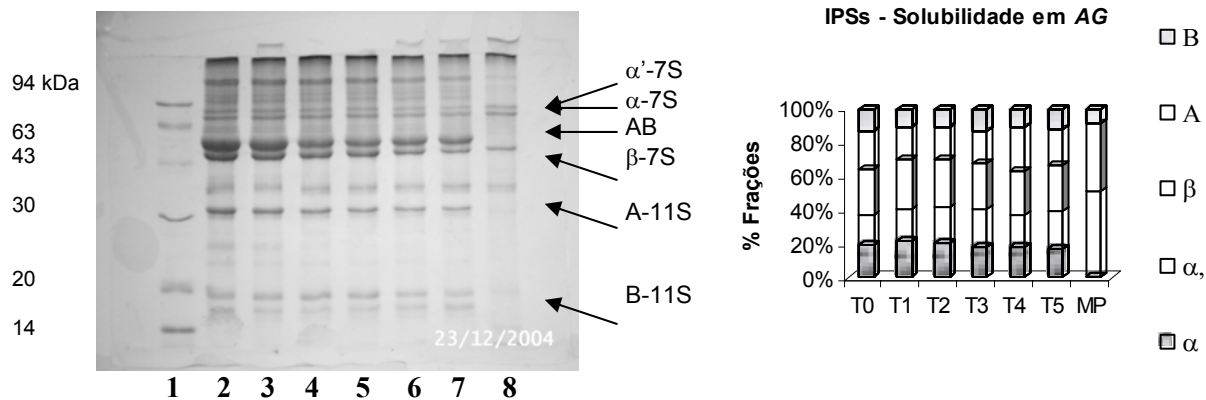


Figura 7. Eletroforese SDS-PAGE, em condições não redutoras, das proteínas totais do isolado de soja sem tratamento térmico (T0) **(2)** e dos isolados tratados termicamente. Os isolados tratados termicamente correspondem aos (prot.%, temperatura, tempo): T4 (5%,80°C,15') **(3)**; T5 (5%,80°C,30') **(4)**; T1 (5%,60°C,15') **(5)**; T2 (3%,80°C,15') **(6)**; T3 (3%,80°C,30') **(7)** e IPS MP (comercial) **(8)**. Padrão de baixa massa molecular **(1)**. O gráfico à direita mostra a porcentagem da área das subunidades α' , α e β da fração 7S e dos polipeptídeos ácido e básico da fração 11S em relação à área total, obtida por análise de densitometria.

a)



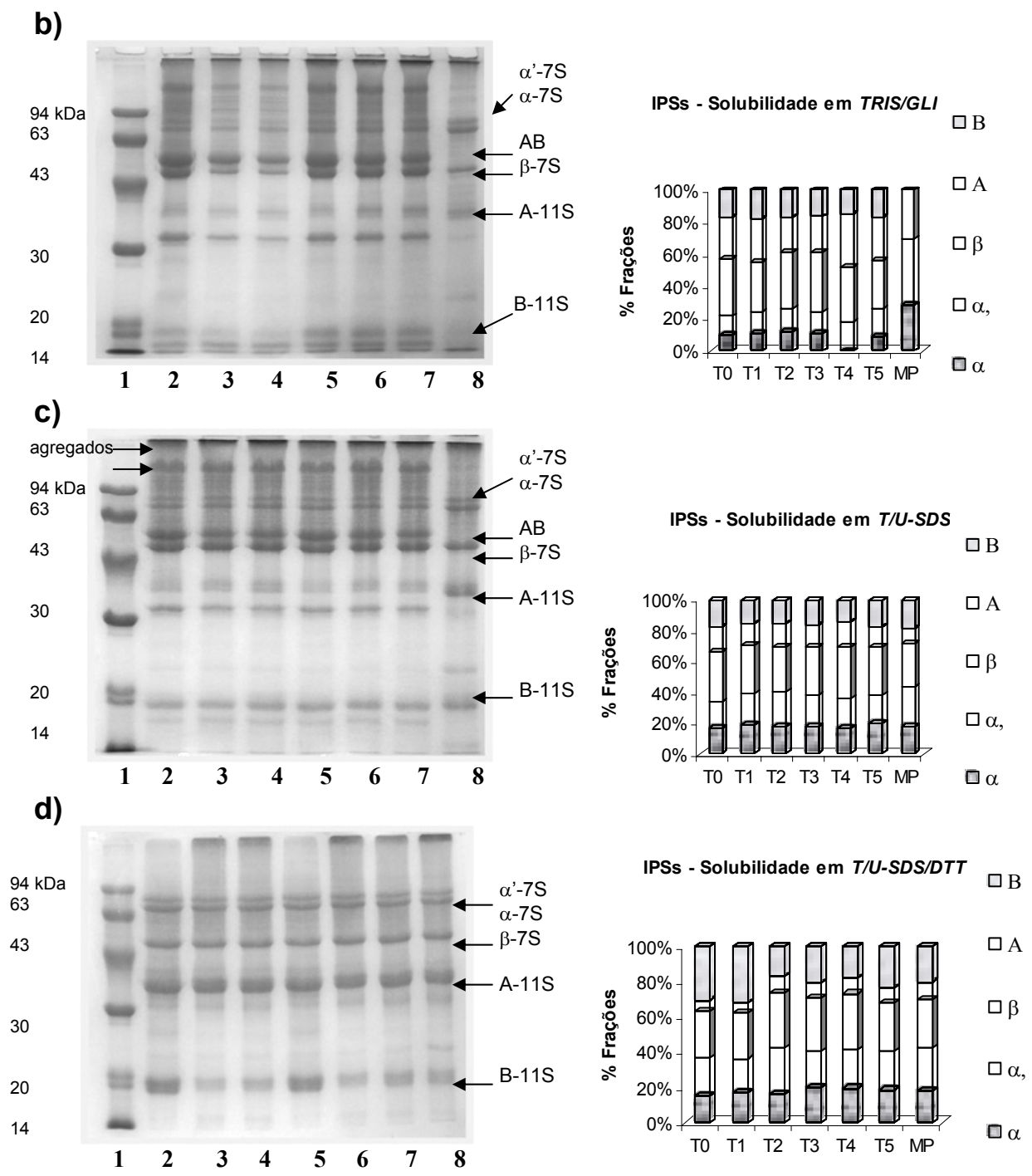


Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE das frações solúveis em a) AG, b) TRIS/GLI e c) T/U-SDS e d) T/U-SDS/DTT, ambiente não redutor, do isolado de soja sem tratamento térmico (T0) (2) e tratados termicamente. Os isolados tratados termicamente correspondem aos (prot.%, temperatura, tempo): T4 (5%,80°C,15') (3); T5 (5%,80°C,30') (4); T1 (5%,60°C,15') (5); T2 (3%,80°C,15') (6); T3 (3%,80°C,30') (7) e IPS MP (comercial) (8). Padrão de baixa massa molecular (1). Os gráficos à direita mostram a porcentagem da área das subunidades α' , α e β da fração 7S e dos polipeptídeos ácido e básico da fração 11S em relação à área total, obtidas por densitometria.

O perfil das proteínas solúveis em AG (**Figura 8 - a**) foi semelhante para todos os IPS obtidos em laboratório, apresentando as bandas correspondentes à globulina 7S de soja; α' (89 kDa), α (81 kDa) e β (51 kDa), a globulina 11S; AB (54 kDa), A (34 2 kDa) e B (21 kDa) livres além de bandas de massa molecular ≥ 94 kDa, incluindo também material que não penetrou na rede do gel. Não foram observadas entre as frações solúveis em AG do isolado comercial MP as frações AB e A-11S.

O perfil das proteínas solúveis em TRIS/GLI mostrou para os isolados T4 e T5, menor intensidade relativa das bandas das frações 7S e 11S. A subunidade α' -7S não foi detectada entre as proteínas solúveis do isolado T4, enquanto no perfil do isolado T5 esta banda está presente em menor proporção que nas demais amostras, sugerindo que estas frações foram envolvidas na formação de agregados como resultado do tratamento térmico realizado em maior concentração de proteína. Como esta fração foi detectada em maior concentração relativa quando o solvente usado foi o T/U-SDS, sugere-se que interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio participaram na formação dos agregados, envolvendo a α' -7S. Na presença de uréia/SDS houve maior solubilização das frações que se agregaram por efeito dos tratamentos térmicos realizados com 5% de proteína, a 80°C por 15 e 30 minutos, isolados T4 e T5 respectivamente (**Figura 8**, linha 3 e 4 – T/U-SDS).

Parte dos agregados das frações solúveis em T/U-SDS de todos os isolados retidos no topo do gel, próximo a fração α' , desapareceram em T/U-SDS/DTT, indicando que estes agregados estariam estabilizados por ligações S-S. No perfil das proteínas solúveis em T/U-SDS/DTT dos isolados T0 e T1 também não foram observados os agregados retidos no topo do gel, por efeito do agente redutor DTT (**Figura 8**, linha 2 e 5 – T/U-SDS/DTT).

No perfil eletroforético obtido em condições redutoras observou-se, para todos os meios de extração, a presença das subunidades α' , α e β -7S e os polipeptídeos A e B-11S (**Figura 9**). Entretanto, os agregados retidos no topo do gel (**Figura 8 - T/U-SDS/DTT**) que persistiram nos perfis dos isolados T2, T3, T4 e T5 e que poderiam, indicar agregados estabilizados por ligações isopeptídicas, não foram observados nos perfis eletroforéticos obtidos em condições redutoras (**Figura 9, c**). Este fato indica que pode ter havido redução incompleta das ligações dissulfeto no solvente T/U-SDS/DTT.

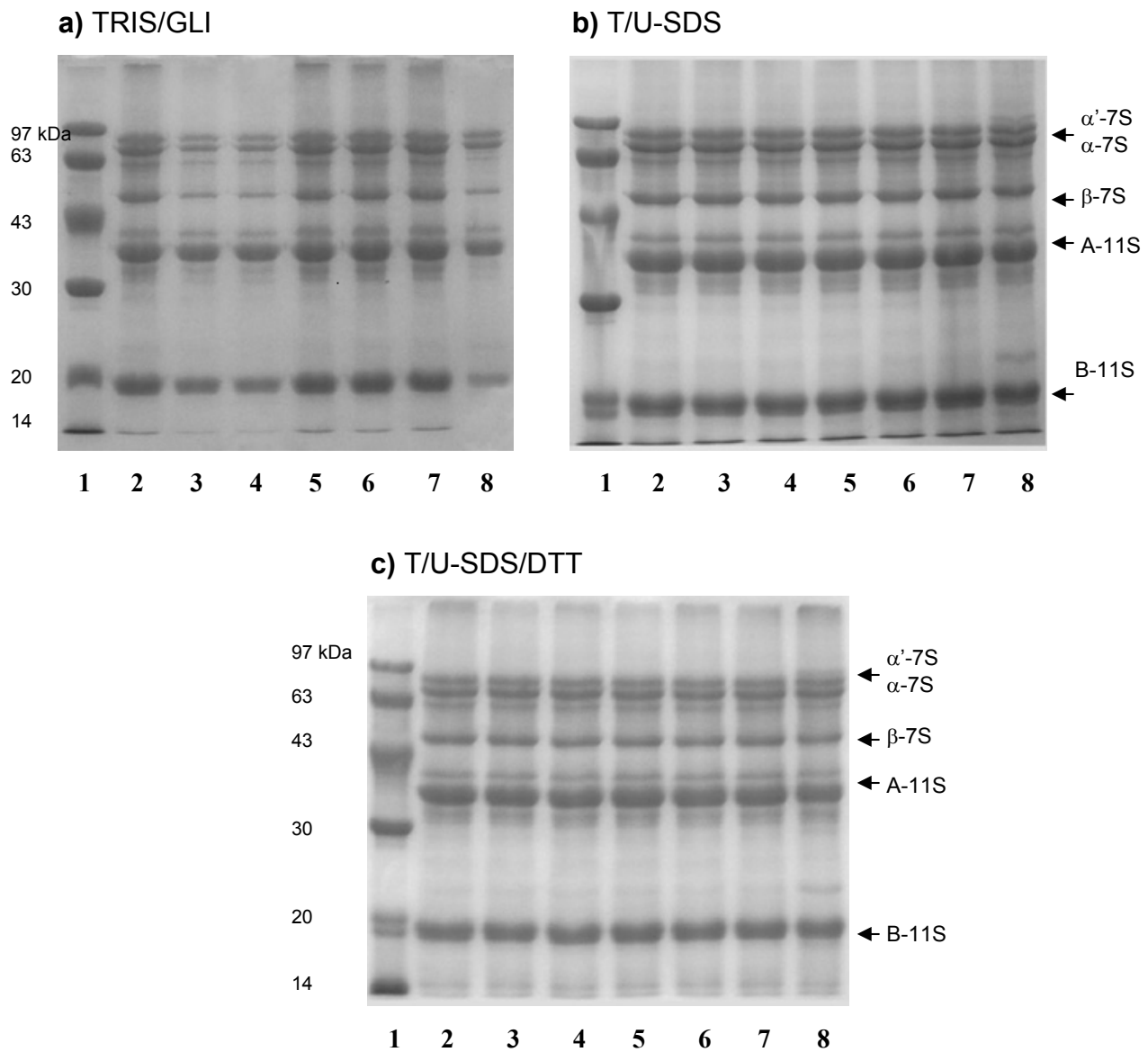


Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE das frações solúveis em TRIS/GLI **(a)** e T/U-SDS **(b)** e T/U-SDS/DTT **(c)** do isolado de soja sem tratamento térmico (T0) **(2)** e tratados termicamente. Os isolados de soja tratados termicamente correspondem aos (prot.%, temperatura, tempo): T4 (5%,80°C,15') **(3)**; T5 (5%,80°C,30') **(4)**; T1 (5%,60°C,15') **(5)**; T2 (3%,80°C,15') **(6)**; T3 (3%,80°C,30') **(7)** e IPS MP (comercial) **(8)**. Padrão de baixa massa molecular **(1)**.

Utsumi et al. (1984) mostraram que macrocomplexos solúveis em água, formados predominantemente por subunidades B-11S e subunidades β -7S, unidas por interações eletrostáticas e dissulfeto, foram formados após tratamento térmico de soluções a 0,5% de proteína de soja, contendo 0,01 M de 2-mercaptoetanol.

Damodaran e Kinsella (1982) indicaram que o polipeptídeo básico precipita logo após a dissociação térmica da glicinina do isolado de soja, por interações hidrofóbicas entre eles. Segundo Arrese et al. (1991), a agregação das subunidades AB-11S é promovida por aumento da concentração protéica na qual o tratamento térmico é realizado.

A análise do perfil eletroforético das frações solúveis dos isolados em diferentes meios de extração permitiu determinar a existência de agregados com massa molecular maior que 94 kDa estabilizados por ligações dissulfeto não promovidas pelo tratamento térmico, pois aparecem da mesma forma no T0 (sem tratamento). Verificou-se, também, a formação de ligações não covalentes entre as subunidades das frações 7S e 11S agregadas, decorrentes do tratamento térmico realizado com 5% de proteína, a 80°C. Segundo Petrucelli e Añón (1995) a interação entre a subunidade β -7S e o polipeptídeo básico da 11S é inicialmente de natureza hidrofóbica e depois estabilizada por ligações S-S.

5.1.7 Grupos sulfidrila livre (SH)

A **Tabela 6** mostra os valores de SH livres dos isolados de soja que receberam tratamento térmico (T1, T2, T3, T4 e T5), do isolado de soja nativo (T0) e do comercial (MP).

Segundo Petrucelli e Añón (1995), o conteúdo de grupos SH esperado para isolados protéicos nativos é de aproximadamente 1,34 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína. Pode-se verificar que o valor encontrado de SH para o IPS não tratado foi de 1,30 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína, valor similar ao obtido por Petrucelli e Añón (1995). Em relação ao isolado comercial MP, o conteúdo de SH encontrado está dentro da faixa reportada por Wagner e Añón (1990), de 0,48 a 5,9 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína para isolados protéicos de soja comerciais.

Tabela 6. Teor de grupos SH livres ($\mu\text{mol SH/g}$ de proteína) do isolado nativo (T0), dos isolados de soja que receberam tratamento térmico (T1, T2, T3, T4 e T5) e do comercial (MP). Os isolados de soja tratados termicamente correspondem aos: T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15') e T5 (5%,80°C,30').

IPSs	SH ($\mu\text{mol/g}$ de proteína)
T0	1,30 \pm 0,00 c
T1	1,50 \pm 0,00 b
T2	1,09 \pm 0,06 d
T3	1,09 \pm 0,01 d
T4	1,10 \pm 0,00 d
T5	0,70 \pm 0,07 e
MP	1,72 \pm 0,02 a

¹ Valores médios de três determinação \pm desvio padrão.

² Letras diferentes em cada amostra de isolado, indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

O isolado T0 apresentou teor de SH livres significativamente maior ($p < 0,05$) que os isolados tratados termicamente em diferentes condições. Entre os isolados tratados, o T1 que recebeu tratamento térmico mais brando, foi o que apresentou o maior (1,5 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína) e o T5, com tratamento mais intenso, o menor teor de grupos SH livre (0,85 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína) ($p < 0,05$). Petruccelli e Añón (1994) verificaram que tratamentos térmicos induziram a diminuição de 1,5 - 1,8 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína para valores menores que 0,8 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína. Scilingo (2000) também constatou que o conteúdo de SH livre dos isolados de soja que passaram por tratamento térmico a 80°C/5 min ou a 90°C/15 min, foi significativamente menor que o dos isolados sem tratamento.

Os resultados apresentados sugerem que o tratamento térmico favoreceu as reações de agregação protéica e/ou oxidação dos grupos SH. No entanto, a avaliação da solubilidade protéica em diferentes meios de extração indicou que não houve, em decorrência dos tratamentos térmicos realizados, agregação estabilizada por pontes dissulfeto. Uma explicação possível para estes resultados conflitantes é que devido às alterações conformacionais ocorridas, os grupos SH ficaram inacessíveis e não puderam ser quantificados.

5.1.8 Hidrofobicidade superficial

A hidrofobicidade de uma proteína é importante em sua caracterização estrutural e está intimamente relacionada com o seu comportamento funcional (HAYAKAWA; NAKAI, 1985). As alterações na hidrofobicidade superficial podem ser reflexos de alterações na conformação e/ou no estado de dissociação-agregação das proteínas como resultados de processos físicos e químicos (LALIGANT et al., 1991). A utilização de sondas que fluorescem quando se une aos resíduos hidrofóbicos é um dos métodos usados para determinar a hidrofobicidade superficial. Estas sondas podem ligar-se às regiões com resíduos hidrofóbicos aromáticos ou alifáticos. A sonda ANS (ácido 8-anilino naftaleno-sulfônico), que possui um anel aromático em sua estrutura química, pode unir-se a zonas hidrofóbicas com resíduos aromáticos (HAYAKAWA; NAKAI, 1985; KATO; NAKAI, 1980). A **Figura 10** mostra a hidrofobicidade superficial das amostras de isolado de soja, avaliada em função da intensidade de fluorescência apresentada pelos isolados de soja em resposta à adição da sonda ANS.

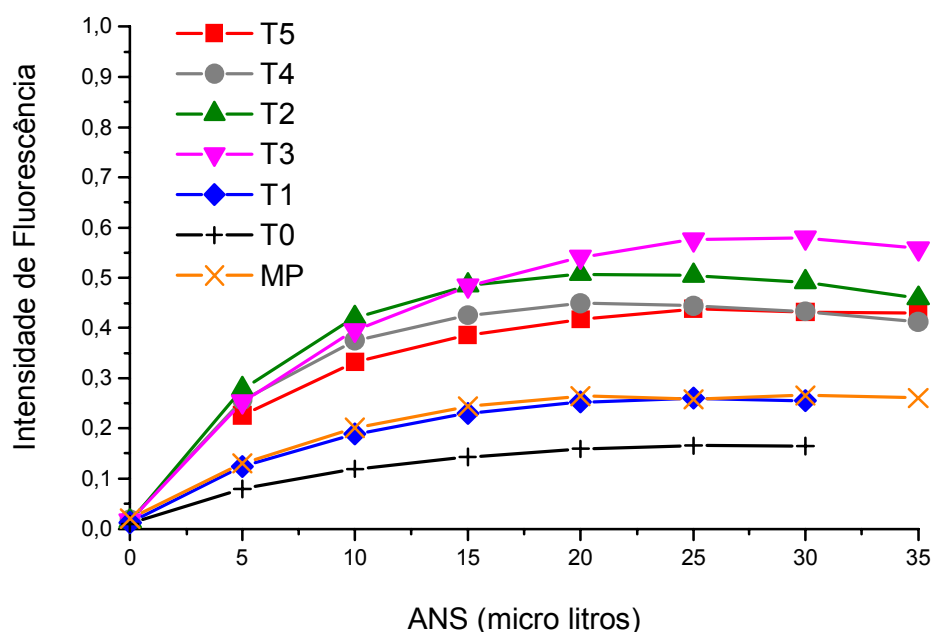


Figura 10. Hidrofobicidade superficial determinada com ANS das amostras de isolado de soja sem tratamento térmico (T0) e comercial (MP) e dos isolados tratados termicamente, nas seguintes condições (prot.%, temperatura, tempo): T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15') e T5 (5%,80°C,30').

O isolado T0 apresentou a menor hidrofobicidade superficial, que aumentou com o tratamento térmico sofrido pelos demais isolados de soja. O isolado T1 (60°C/15 min) apresentou o menor aumento em relação ao T0. Os isolados T2 e T3 apresentaram maior hidrofobicidade superficial que T4 e T5. Quando a fração 11S foi totalmente desnaturada, no caso do isolado comercial MP ($\Delta H=0$), a hidrofobicidade superficial diminuiu. Desta forma, o aumento da hidrofobicidade superficial pode ser atribuído à desnaturação parcial e/ou total das frações 7S e da 11S, enquanto que a formação de agregados via interações hidrofóbicas, como foi constatado nos isolados T4 e T5, acarretou na diminuição da hidrofobicidade superficial. De acordo com Petruccelli e Añón (1994), a hidrofobicidade superficial da fração 11S da soja aumenta quando submetida a tratamento térmico em condições nas quais não ocorre agregação protéica. Por outro lado, se o processo de desnaturação for seguido de agregação das proteínas parcial ou totalmente desnaturadas, a hidrofobicidade superficial pode diminuir (LALIGANT et al., 1991; PETRUCCELLI; AÑÓN, 1994). Contudo, não é possível prever como irá variar a hidrofobicidade superficial das proteínas quando se produzem modificações em sua conformação (KATO et al., 1984).

Sorgentini, Wagner e Añón (1995) também observaram alterações na hidrofobicidade superficial das proteínas dos isolados de soja como resultado da desnaturação térmica. Estes autores verificaram que a hidrofobicidade superficial do isolado nativo foi inferior aos dos isolados tratados termicamente a 80°C. É importante lembrar que a determinação da superfície hidrofóbica por sonda ANS inclui somente a fração solúvel no tampão utilizado (HETTIARACHCHY et al., 1995), porém, segundo Scilingo (2000), é possível inferir que a fração solúvel poderia representar a insolúvel, talvez com menor grau de agregação.

A baixa hidrofobicidade superficial nas proteínas dos isolados de soja comerciais também foi observada por Wagner, Sorgentini e Añón (2000). Estes resultados sugerem que as moléculas de proteínas sofreram maior agregação via interação hidrofóbica de modo que somente os agregados mais hidrofílicos permaneceram solúveis ou, com a agregação, as zonas hidrofóbicas foram encobertas, resultando em agregados solúveis com baixa hidrofobicidade superficial (WAGNER, SORGENTINI; AÑÓN, 2000).

5.1.9 Perfil de hidrofobicidade e hidrofiliidade

Na **Figura 11** estão apresentados os cromatogramas do isolado T0, dos isolados T1, T2, T3, T4 e T5 (tratados termicamente) e do isolado comercial (MP). Os cromatogramas foram divididos em três regiões relativas à hidrofobicidade da fase móvel: *região I*, baixa hidrofobicidade, - com até 8 min de eluição; *região II*, média hidrofobicidade, - com 8 a 16 min; e a *região III*, alta hidrofobicidade, tempos de retenção maiores - 16 até 40 min. Os picos dos cromatogramas de todos os IPSs distribuíram-se principalmente nas regiões II e III. No cromatograma do isolado T0, a maior parte dos picos se concentrou na região III e em menor proporção na região II, correspondendo aos polipeptídeos hidrofílicos. No perfil do isolado T1 observou-se aumento da altura dos picos da região III, mais hidrofóbica, correspondente ao tempo de retenção de 24 min.

Em relação aos isolados T0 e T1, os perfis dos isolados T2, T3, T4 e T5 mostraram redução da altura dos picos na região III, localizados entre os tempos de retenção entre 20 e 25 minutos, que se acentuou no isolado MP. Os isolados T2 e T3 apresentaram cromatogramas semelhantes, assim como T4 e T5. Nos dois casos, como o tempo de aquecimento foi a única diferença entre as condições de tratamento, sugere-se que este fator não influenciou significativamente as características estruturais dos isolados.

A solubilidade dos isolados tratados termicamente foi praticamente duas vezes menor no tampão de solubilização da amostra (0,035 M Tris-HCl pH 7,6 com adição de 0,4 M NaCl) que a dos isolados T0 e T1 ($73 \pm 0,08\%$). Estas diferentes solubilidades no eluente indicam que houve formação de agregados insolúveis, formados principalmente pelas frações mais hidrofóbicas.

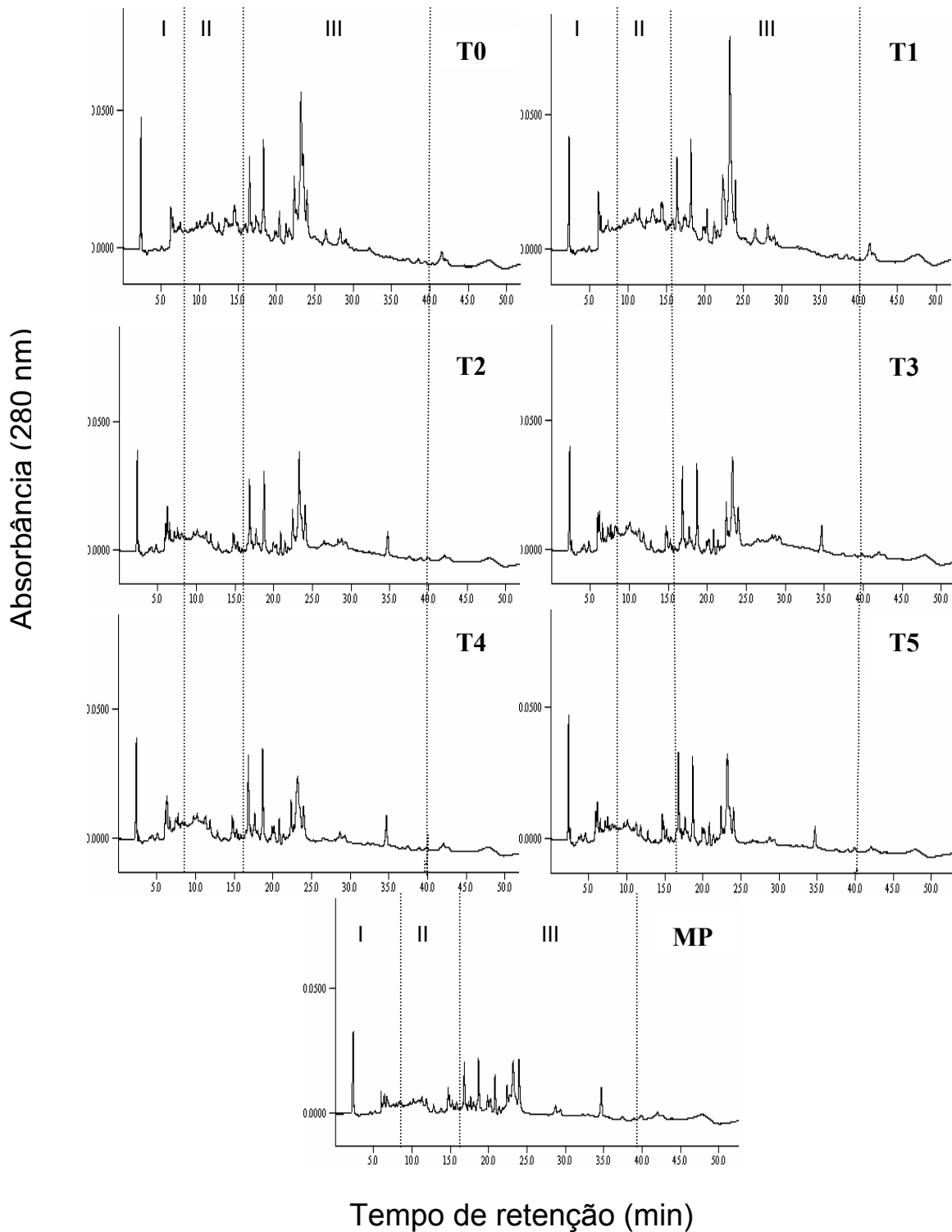


Figura 11. Cromatogramas CLAE-FR dos isolados protéicos de soja: sem tratamento térmico T0 (controle); tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo) T1 (5%,60°C,15'), T2 (3%,80°C,15'), T3 (3%,80°C,30'), T4 (5%,80°C,15'), T5 (5%,80°C,30') e comercial (MP).

5.1.10 Perfil de distribuição de massa molecular aparente

A **Figura 12** ilustra os perfis de eluição dos isolados protéicos de soja sem tratamento (T0) e dos tratados termicamente utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta-eficiência de Exclusão Molecular (CLAE-EM).

O perfil da amostra T0 foi diferente dos isolados tratados termicamente e da amostra comercial (MP). Os isolados T1, T2, T3 e a amostra comercial (MP), embora sujeitos a tratamentos diferenciados, apresentaram perfis semelhantes. Os isolados T4 e T5 mostraram perfil semelhante, porém diferente de todos os demais, especialmente em relação aos picos com tempos de eluição entre 6 e 8 e 10 min. Um ponto interessante é que nos cromatogramas dos isolados T1, T2 e T3 aparece um pico no volume de exclusão, que não existe no T0, indicando que houve a formação de agregados solúveis de alto peso molecular. Nos isolados T4 e T5 este pico desaparece, assim como os outros de alta massa molecular, indicando que houve formação de agregados insolúveis a partir destas frações.

A comparação dos cromatogramas dos isolados T2 *versus* T3 e T4 *versus* T5 mostra que, para uma mesma concentração de proteína, o aumento no tempo de aquecimento (de 15 para 30 min) não influenciou significativamente as características de eluição. Por outro lado, a influência da temperatura foi marcante no perfil dos isolados, no caso de T1 e T4, tratados a 60°C e 80°C, respectivamente. O aumento da concentração de proteína (de 3 para 5%), comparando os cromatogramas dos isolados T2 *versus* T4 e T3 *versus* T5, tratados a mesma temperatura e tempo de aquecimento, também modificou as características de eluição dos isolados. No cromatograma desses isolados houve diminuição dos picos correspondentes aos tempos de eluição de aproximadamente 6 e 7 min. No caso dos isolados T4 e T5, não houve solubilização total no eluente, indicando que houve formação de agregados insolúveis, induzidos pelo tratamento térmico.

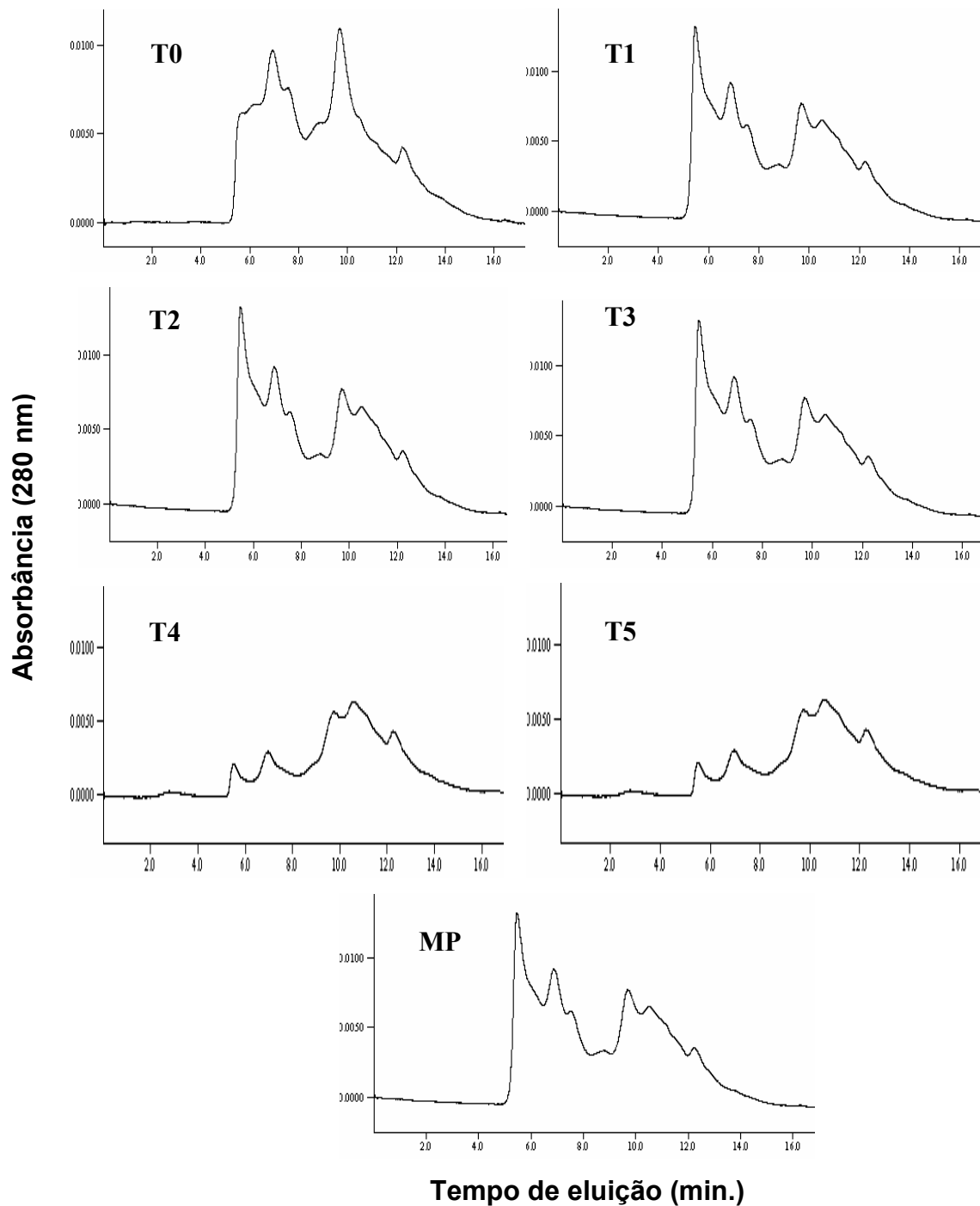


Figura 12. Cromatogramas CLAE-EM dos isolados protéicos de soja: T0 (sem tratamento térmico); tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo) T1 (5%,60°C,15'), T2 (3%,80°C,15'), T3 (3%,80°C,30'), T4 (5%,80°C,15'), T5 (5%,80°C,30') e MP (comercial).

5.1.11 Determinação da capacidade de absorção de água (CAA)

Várias propriedades funcionais de proteínas são manifestações de sua interação com a água. A CAA é definida como a máxima quantidade de água que é absorvida espontaneamente por um grama de amostra de isolado de soja (SCILINGO, 2000).

Na **Figura 13** estão apresentados os valores médios de CAA dos isolados de soja obtidos em laboratório e o comercial (MP). O isolado T0 apresentou o menor valor (3,25 mL/g de amostra) de CAA. Os isolados tratados termicamente, com exceção do T1, diferiram significativamente ($p < 0,05$) do isolado nativo (T0), indicando que o tratamento térmico melhorou as propriedades de hidratação dos IPSs. Entre os isolados tratados a 80°C não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos de CAA.

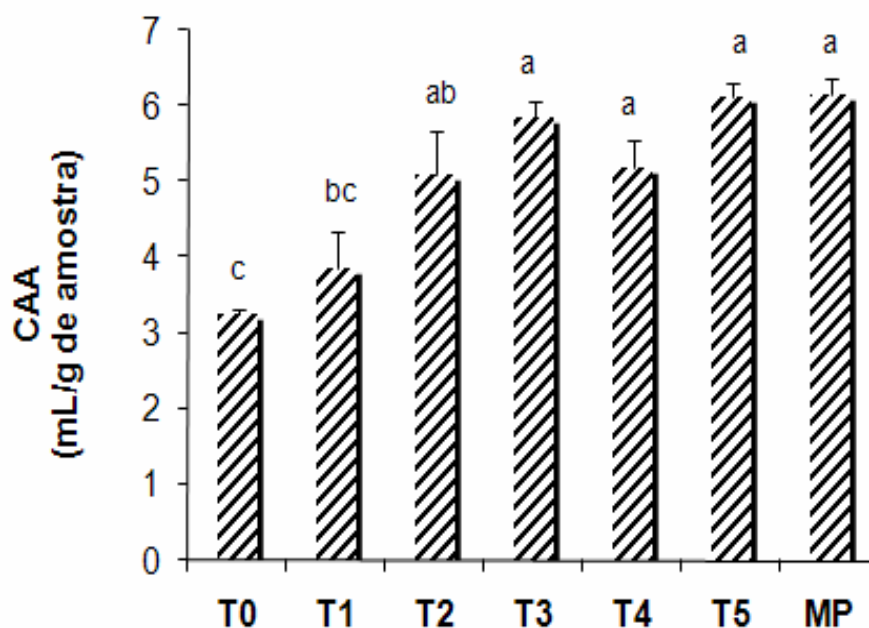


Figura 13. Capacidade de absorção de água (CAA) dos isolados de soja: T0 (sem tratamento); tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo): T1 (5%,60°C,15'), T2 (3%,80°C,15'), T3 (3%,80°C,30'), T4 (5%,80°C,15'), T5 (5%,80°C,30') e MP (comercial). Letras diferentes em cada amostra de isolado indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

No presente estudo, os isolados T0 e T1, com estrutura nativa e baixo grau de desnaturação, respectivamente, e com solubilidade em água em torno de 80%, apresentaram menor CAA que os isolados T4 e T5, constituídos por proteínas total e parcialmente desnaturadas, cujas solubilidades em água eram menores que 60%. Entretanto, observou-se que os isolados T2 e T3, com alta solubilidade (80%) e também constituídos pelas proteínas total e parcialmente desnaturadas, apresentaram a mesma CAA dos isolados T4 e T5 (20% menos solúveis). O grau de desnaturação e/ou agregação da proteína desnaturada termicamente é um fator preponderante que afeta as propriedades de solubilidade e absorção espontânea de água. Assim como o grau de agregação, a natureza dos agregados influencia a CAA da proteína (AÑÓN; SORGENTINI; WAGNER, 2001).

Segundo Añón, Sorgentini e Wagner (2001), a CAA dos isolados aumenta quando há um balanço entre agregados solúveis e insolúveis, sendo que a alta solubilidade ou excessiva insolubilização diminui a CAA. Os resultados anteriores de solubilidade, grupos sulfidril livres e CLAE-EM mostraram que o tratamento térmico realizado com 5% de proteína a 80°C promoveu a formação de agregados insolúveis, unidos por interações hidrofóbicas. Portanto, o tratamento térmico realizado nos IPSs conduziu à formação de agregados com diferentes características estruturais, corroborando os resultados obtidos para CAA dos IPSs, que é determinada pela quantidade e pelas propriedades das frações insolúveis (AÑÓN; SORGENTINI; WAGNER, 2001).

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por Añón, Sorgentini e Wagner (2001), que observaram que isolados protéicos de soja com alta solubilidade (80 – 90%), constituídos pelas subunidades 7S e 11S nativas, apresentaram CAA menores do que aqueles com solubilidade intermediária (40 - 60%), compostos por proteínas total ou parcialmente desnaturadas. As propriedades funcionais relacionadas com a interação proteína-água dos isolados de soja dependem da estrutura e características de agregação das suas principais frações (7S e 11S), alteradas por processos de preparação e/ou tratamentos térmico ou químico (AÑÓN; SORGENTINI; WAGNER, 2001).

A avaliação da CAA em função do tempo mostrou que houve rápida absorção nos primeiros 5 minutos, tanto maior quanto mais severo foi o tratamento térmico sofrido pelos IPSs (**Figura 14**). Em seguida, observou-se a etapa de saturação, na qual a massa de proteína seca já não é capaz de absorver água e o tempo necessário para alcançar o volume máximo de água absorvido, conhecido como tempo de estabilização (T_e). Os parâmetros cinéticos (volume máximo de água captada por grama de sólido, tempo de estabilização e velocidade inicial de absorção de água), característicos para cada isolado, mostraram tendência de aumento da CAA por influência do tratamento térmico aplicado aos isolados.

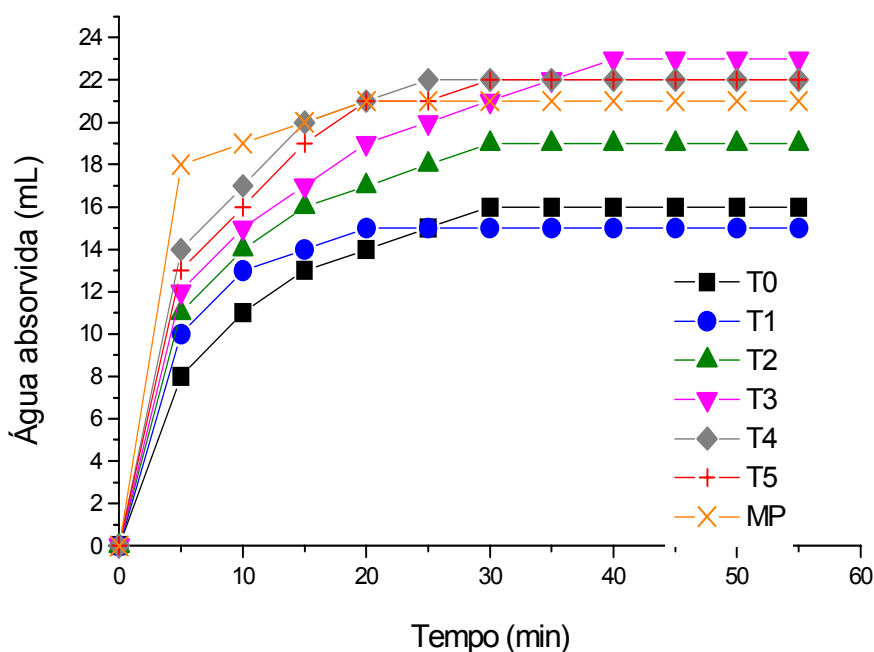


Figura 14. Cinética de absorção espontânea de água (CAA) dos isolados de soja captada por grama de proteína em pó em função do tempo (minutos). As amostras de IPSs são: T0 (sem tratamento); tratados termicamente (prot.%, temperatura, tempo) T1 (5%,60°C,15'), T2 (3%,80°C,15'), T3 (3%,80°C,30'), T4 (5%,80°C,15'), T5 (5%,80°C,30') e MP (comercial).

A CAA dos isolados de soja também foi determinada com adição de CaCl_2 (0, 2,8, 4, 7,1, 7,7, 12 e 20 mg de Ca^{2+} /g de proteína) aos IPSs e os resultados estão apresentados na **Figura 15**.

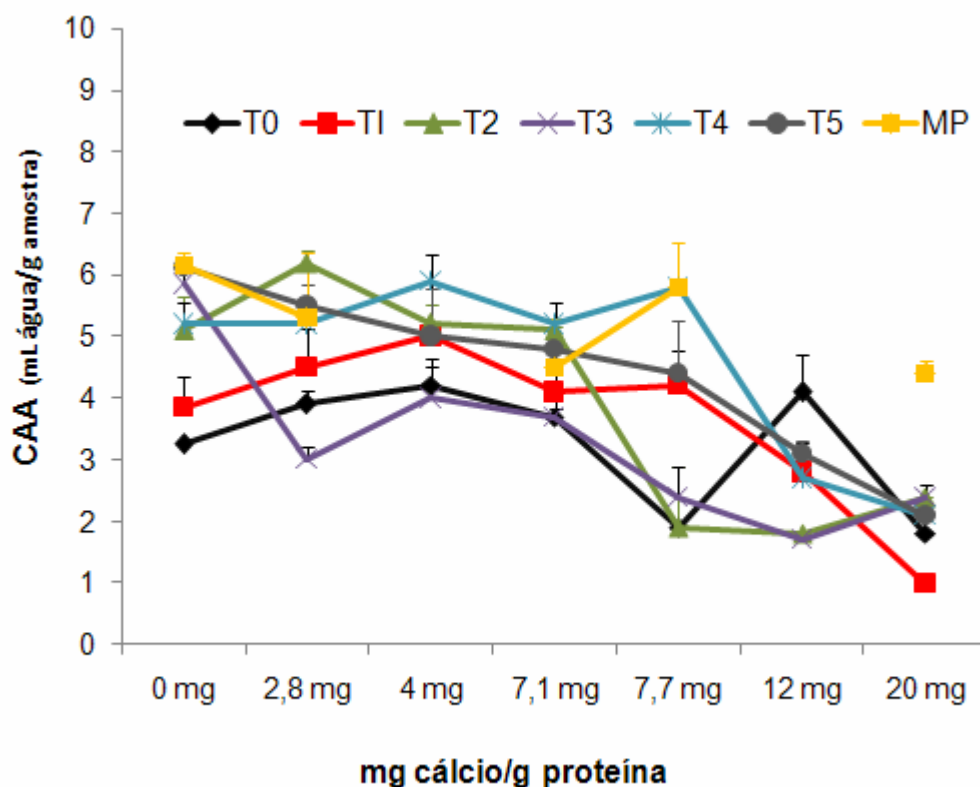


Figura 15. Capacidade de absorção de água (CAA) das dispersões protéicas dos isolados de soja T0 (sem tratamento); tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo) T1 (5%,60°C,15'), T2 (3%,80°C,15'), T3 (3%,80°C,30'), T4 (5%,80°C,15'), T5 (5%,80°C,30') e MP (comercial). As dispersões foram liofilizadas após adição de CaCl_2 (0, 2,8, 4, 7,1, 7,7, 12 e 20 mg de Ca^{2+} /g de proteína).

A adição de íons cálcio em pequenas quantidades (0 – 4 mg Ca^{2+} /g de proteína) aumentou a CAA dos isolados T0, T1 e T2, diminuiu a do T3 ou não produziu alterações, caso dos isolados T4 e T5. Com o aumento da proporção de cálcio, observou-se uma tendência de menor absorção de água, sugerindo predomínio da interação proteína-cálcio em relação com a água. O efeito combinado das condições de tratamento térmico e adição de cálcio, na faixa de 0 a 7 mg Ca^{2+} /g de proteína,

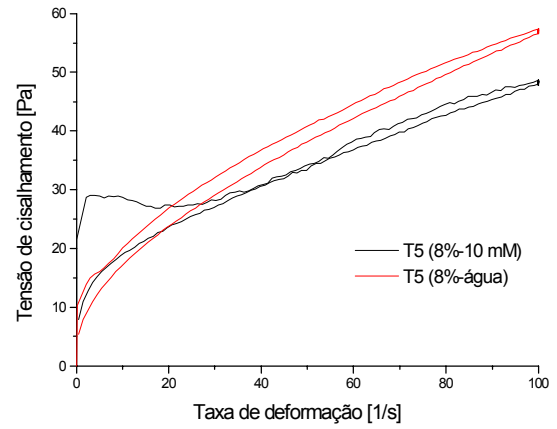
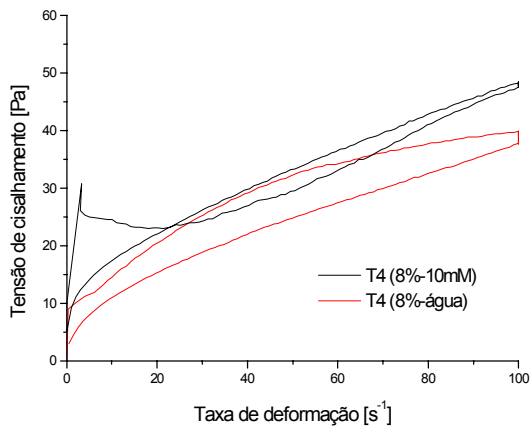
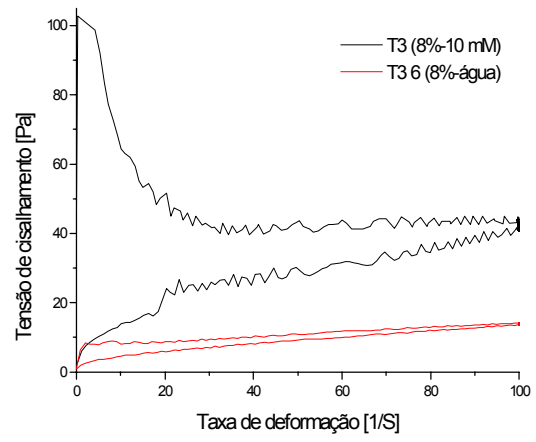
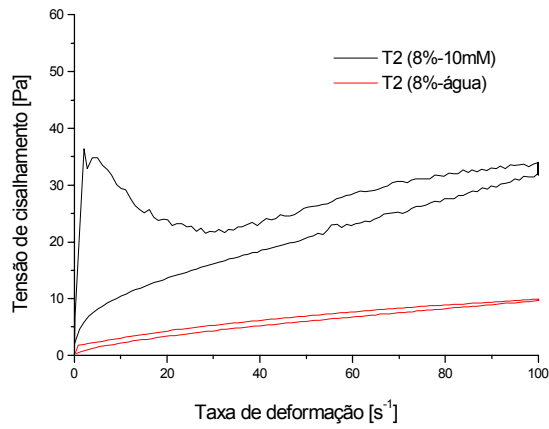
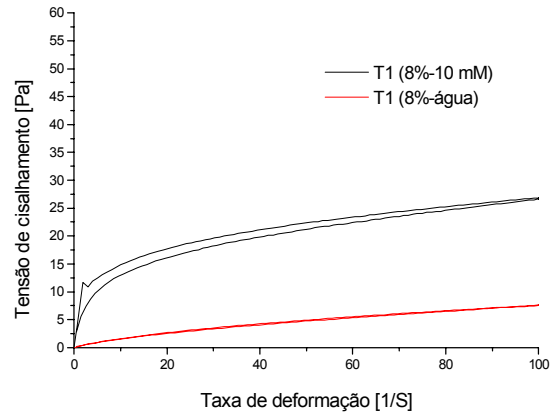
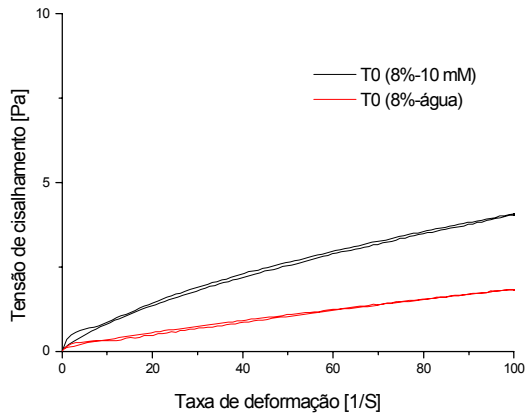
aumentou a CAA dos IPSs. A interação estabelecida entre as proteínas e o cálcio promove, em baixas concentrações do íon, a captação de maior quantidade de água, porém logo predomina a interação proteína-cálcio frente a solvatação, processo que se acentua quando o conteúdo de cálcio aumenta (SCILINGO, 2000).

Scilingo (2000) verificou que baixos conteúdos de cálcio provocaram aumento na CAA de isolados de soja, a qual foi reduzida com o incremento da concentração do íon. Os isolados com mais de 4,52 mg de Ca^{2+} /g de proteína absorveram água mais lentamente. Yao, Wei e Steinberg (1988) também verificaram redução da CAA de proteínas de soja na presença de NaCl, atribuída, principalmente, à diminuição da repulsão eletrostática entre os grupos carregados da proteína, que resulta na união proteína-proteína, reduzindo a interação da água com as moléculas de proteína.

5.1.12 Comportamento reológico

O comportamento reológico de um material consiste em relacionar a tensão aplicada à deformação ou taxa de deformação resultante. A **Figura 16** mostra as curvas de escoamento obtidas para os isolados de soja obtidos em laboratório (T0, T1, T2, T3, T4 e T5) e o comercial (MP).

Todos os isolados analisados apresentaram comportamento reológico de um fluido pseudoplástico ($n < 1$). Com exceção dos isolados T0 e T1 na ausência do cálcio, todos os isolados apresentaram características tixotrópicas. O modelo de Ostwald de Waele ou Lei da Potência foi o que melhor ajustou aos dados experimentais analisados na ausência de cálcio (STEFFE, 1996).



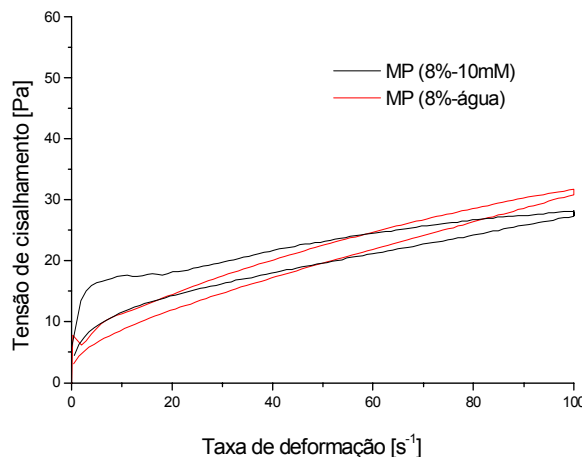


Figura 16. Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação das dispersões de isolado de soja (8% p/p) sem e com presença de CaCl_2 (10 mM) do isolado de soja sem tratamento térmico (T0); tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo) T1 (5%,60°C,15'), T2 (3%,80°C,15'), T3 (3%,80°C,30'), T4 (5%,80°C,15'), T5 (5%,80°C,30') e MP (comercial).

Com CaCl_2 nas dispersões, as curvas de escoamento apresentaram fenômeno associado à ruptura de estrutura (*overshoot*). Isto ocorreu em todas as dispersões protéicas, com exceção do T0, porém, em diferentes proporções. Este fenômeno, associado à ruptura de estrutura, pode ser atribuído ao efeito dos íons cálcio no desenvolvimento da agregação protéica.

A curva de escoamento de ida do T5 na presença do cálcio mostra a necessidade de uma tensão inicial para que o material começasse a fluir, evento denominado de *yield stress* (STEFFE,1996). Isto significa que houve a formação de uma estrutura mais rígida, demandando maior força para fazer o material escoar (STEFFE,1996).

Os parâmetros, índice de comportamento de fluxo (n) e de consistência (K), obtidos do modelo da lei da potência, foram utilizados para descrever o comportamento da viscosidade aparente das dispersões de isolado de soja, sem a presença de cloreto de cálcio. Os índices de consistência (K) para os isolado estudados são apresentados na **Figura 17**.

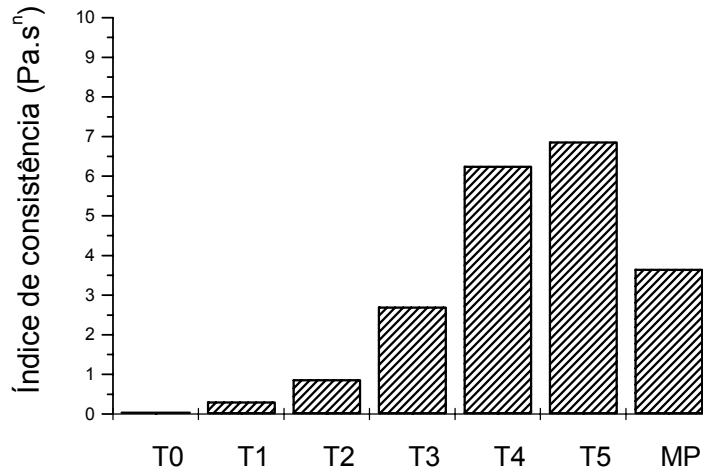


Figura 17. Índice de consistência (k) calculado para as dispersões de isolado protéico de soja nativo (T0) e modificadas termicamente, preparadas sem presença de cálcio. Os isolados e as respectivas condições de tratamento térmico (proteína, temperatura, tempo): T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30') e MP (isolado comercial).

As dispersões dos isolados T4 e T5, tratados termicamente com maior concentração de proteína (5%) apresentaram maiores K que as dos isolados T2 e T3 (3%), sugerindo que este foi o parâmetro do tratamento térmico que mais influenciou esta característica. Comparando-se os resultados dos isolados T2 *versus* T3 e T4 *versus* T5, verificou-se que o tempo de aquecimento do tratamento térmico também resultou no aumento de consistência dos isolados, porém com menor impacto que a concentração protéica.

O comportamento tixotrópico apresentado por quase todas as amostras também está associado à ruptura estrutural. Apenas os isolados T0 (nativo) e T1 não mostraram tixotropia, com exceção da dispersão do T1 na presença de cálcio, que apresentou pequena tixotropia. Neste caso, a área entre a curva de ida e de volta, denominada de *loop* de histerese, está relacionada ao tempo necessário para romper a estrutura do material e pode dar idéia do grau de ruptura estrutural (STEFFE, 1996). A variação do *loop* de histerese observado na curva de escoamento dos isolados sugere a formação de agregados decorrentes da desnaturação protéica em função do tratamento térmico e/ou induzidos pelos íons cálcio.

Os valores de viscosidade aparente (η_{app}) foram considerados a partir da taxa de deformação 72 s^{-1} , ponto onde a η_{app} permaneceu constante até a máxima taxa de deformação 120 s^{-1} (**Figura 18**). A η_{app} das dispersões protéicas dos isolados T4 e T5, sem a presença do sal, diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos demais IPSs avaliados. Estes resultados sugerem que a desnaturação seguida de agregação protéica induzida pelo tratamento térmico promoveu alterações conformacionais que incrementaram o tamanho das partículas e por conseqüência aumentaram a viscosidade.

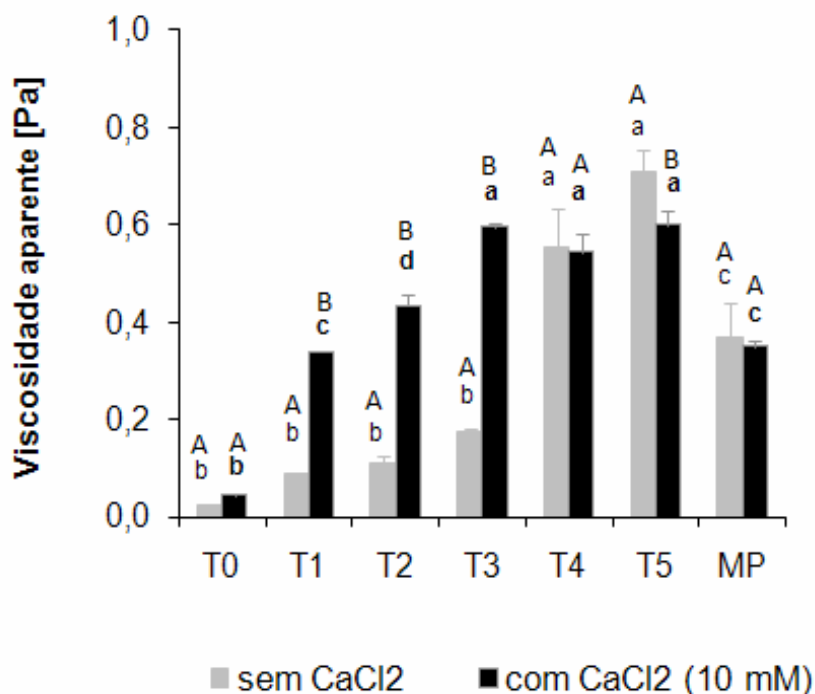


Figura 18. Viscosidade aparente de dispersões protéicas de soja a 8% (p/p) preparadas sem e com adição de CaCl₂ (10 mM). Estes valores de viscosidade foram tomados da curva de tensão de cisalhamento versus taxa de deformação (de ida) em um determinado ponto da taxa de deformação (72 s^{-1}). Os isolados e as respectivas condições de tratamento térmico (proteína, temperatura, tempo): T1 (5%,60°C,15'); T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30') e MP (isolado comercial). Letras minúsculas diferentes na mesma concentração de CaCl₂ (sem ou 10 mM CaCl₂) e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolados de soja indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

Porém, na presença do sal, os isolados de soja T1, T2 e T3 diferiram significativamente entre si e também do T0. Com adição de cálcio, a viscosidade tende a aumentar devido à agregação produzida por meio de entrecruzamentos

intermoleculares favorecidos pelos íons cálcio (SAIO et al., 1980). A diminuição ($p < 0,05$) da viscosidade também foi observada com a adição de cálcio, como para o T5, o que pode ser explicado como uma resposta à maior interação entre as moléculas de proteína favorecida pela adição do sal, tornando a estrutura protéica mais compacta, fazendo com que a dispersão apresente menor viscosidade.

O grau de desnaturação e/ou agregação das proteínas durante a preparação dos isolados é um importante fator que afeta as propriedades funcionais, como a solubilidade, absorção de água (CAA) e a viscosidade. As propriedades reológicas, como a viscosidade aparente, das dispersões aquosas dos isolados de soja estão relacionadas com as propriedades de hidratação dos seus componentes protéicos (AÑÓN; SORGENTINE; WAGNER, 2001). A η_{app} parece depender das interações entre as proteínas solúveis e insolúveis com a água, assim como, da morfologia, tamanho e interação das partículas hidratadas (YAO; WEI; STEINBERG, 1988; AÑÓN; SORGENTINE; WAGNER, 2001).

Neste trabalho, verificou-se que o tratamento térmico dos isolados de soja permitiu obter dispersões viscosas com baixa concentração de proteína (8%). Melhor propriedade de hidratação resultante do tratamento térmico levou ao aumento da viscosidade, que está associada à forma hidrodinâmica e tamanho das partículas hidratadas (HARDING, 1997). De acordo com este conceito, os resultados de viscosidade dos IPSs corroboram os resultados obtidos para CAA dos isolados.

5.2 Geleificação a frio de isolados protéicos de soja

5.2.1 Avaliação visual dos géis

A formação de géis protéicos de soja induzida a frio sem e com adição de íons Ca^{2+} foi avaliada visualmente 15 horas após o preparo e os resultados estão apresentados na **Figura 19**. Foram observados quatro principais padrões: dispersão pouco viscosa, dispersão viscosa, gel (auto-sustentável ou não) e formação de precipitado.

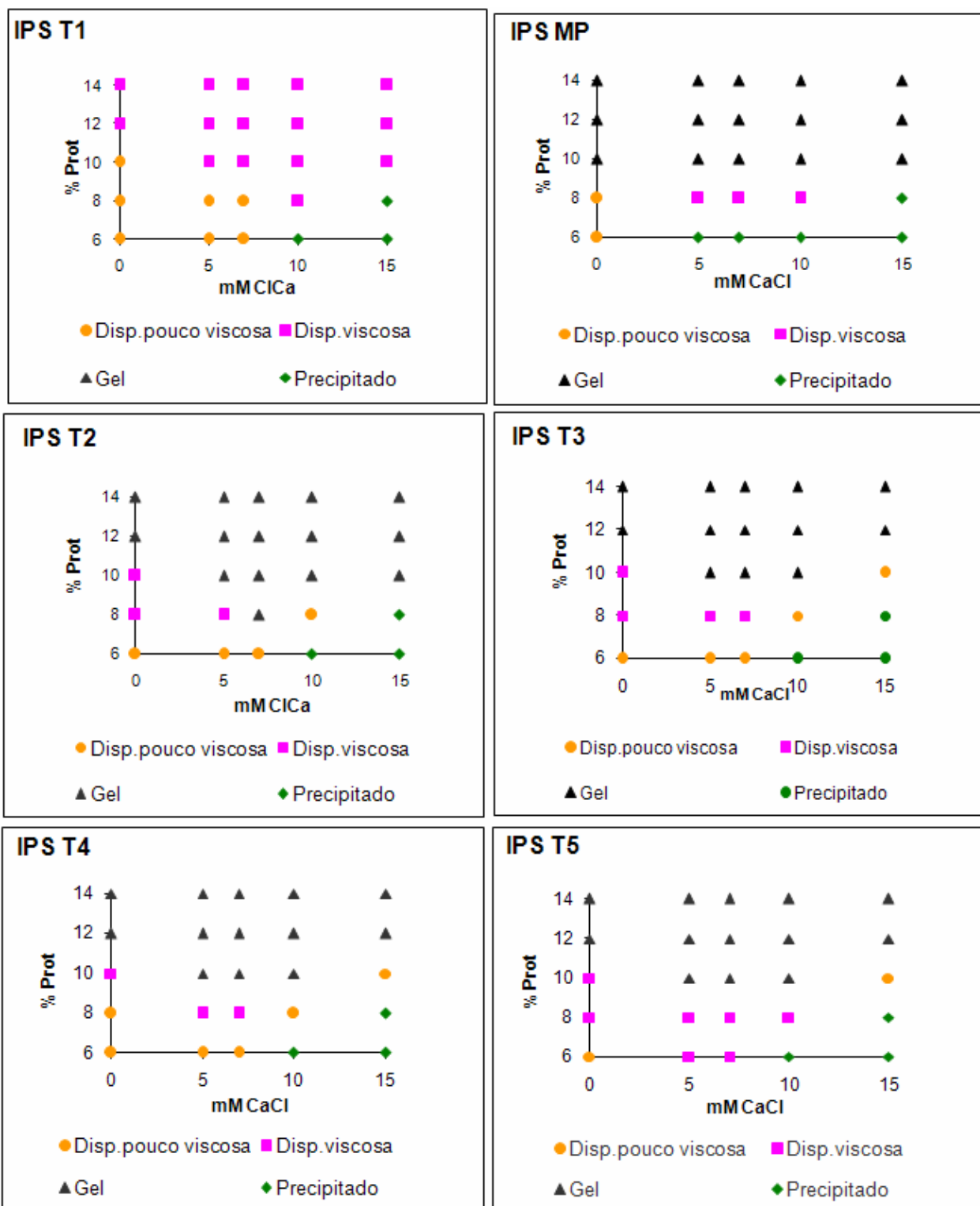


Figura 19. Avaliação da formação de gel dos isolados de soja, tratados termicamente, em diferentes condições de concentração protéica (%) e CaCl₂ (mM). Os isolados correspondem aos seguintes tratamentos (prot.%, temperatura, tempo): T2 (3%, 80°C, 15'); T3 (3%, 80°C, 30'); T4 (5%, 80°C, 15'); T5 (5%, 80°C, 30') e IPS MP (comercial).

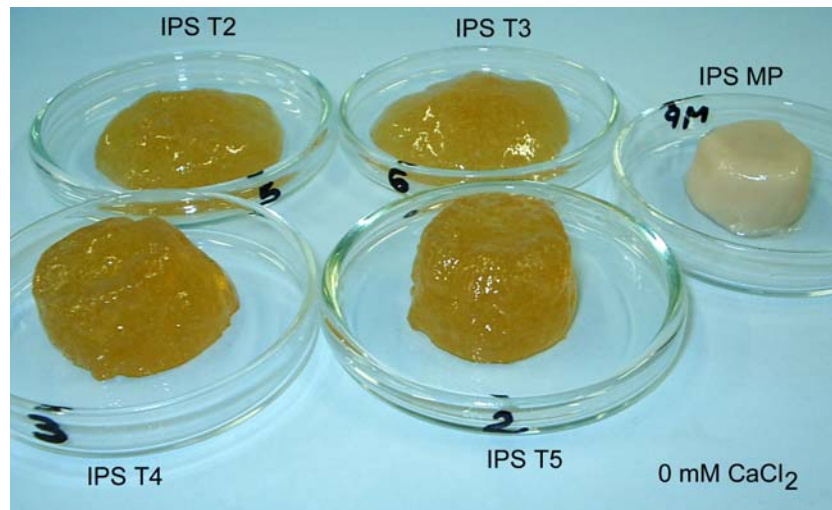
Com dispersões com 6 e 8% de proteína, para todos os IPSs estudados, não houve formação de gel, obtendo-se apenas uma solução pouco viscosa. Com a adição de elevados teores de CaCl_2 , observou-se a formação de um precipitado. Para o isolado MP, este comportamento foi observado na presença de 5 mM CaCl_2 enquanto que para os demais, a partir de 10 mM de CaCl_2 . Com concentrações de proteína 10, 12 e 14% de proteína, foram obtidos géis que apresentaram características distintas de consistência - auto-sustentabilidade ou não e de aparência, translúcido a opaco, que variaram em função tanto da concentração de proteína como de CaCl_2 adicionado.

A **Figura 20** mostra o efeito da concentração de CaCl_2 na aparência dos géis com 12% de proteína (p/p). Os géis dos IPS obtidos em laboratório, formados sem a presença de CaCl_2 , apresentaram-se translúcidos e menos consistentes que os géis preparados com adição do sal. Quando os géis foram preparados com 5 ou 15 mM de CaCl_2 , ocorreu formação de géis mais opacos e consistentes. No entanto, o aumento da concentração de CaCl_2 de 5 para 15 mM resultou em géis esbranquiçados, granulares (não homogêneos) e quebradiços, sugerindo que o aumento da concentração de CaCl_2 aumentou o tamanho dos agregados de proteína, devido à maior importância das interações proteína-proteína e diminuição das interações proteína-água. Observou-se que a adição de CaCl_2 não foi determinante para formação de gel, porém foi importante no processo de geleificação a frio das proteínas de soja.

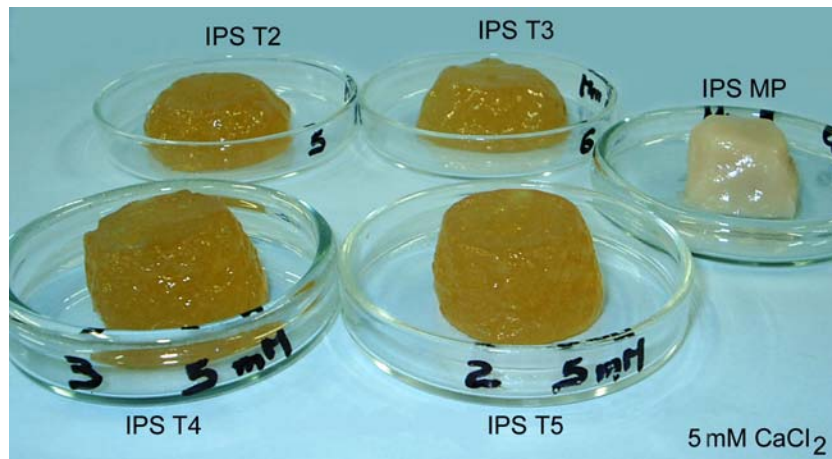
Os géis dos isolados T2 e T3 mostraram-se mais moles, opacos e esbranquiçados que os dos isolados T4 e T5, quando adicionado 5 e 15 mM CaCl_2 respectivamente, sugerindo que as condições do tratamento térmico prévio influenciam fortemente nas características dos géis formados a frio. Nenhum dos géis (12% p/p) preparados com 15 mM CaCl_2 apresentou sinerese, com exceção do gel obtido do isolado T3.

A **Figura 21** mostra os géis do isolado comercial MP formados a frio sem e na presença de CaCl_2 (5 ou 15 mM). Ao contrário do que foi observado para os géis dos IPSs obtidos no laboratório, não houve alteração na aparência com adição de CaCl_2 (5 e 15 mM). Comportamento semelhante foi reportado por Maltais et al. (2005) para géis com 9% de proteína de soja desnaturada a 105°C/30 min.

a)



b)



c)

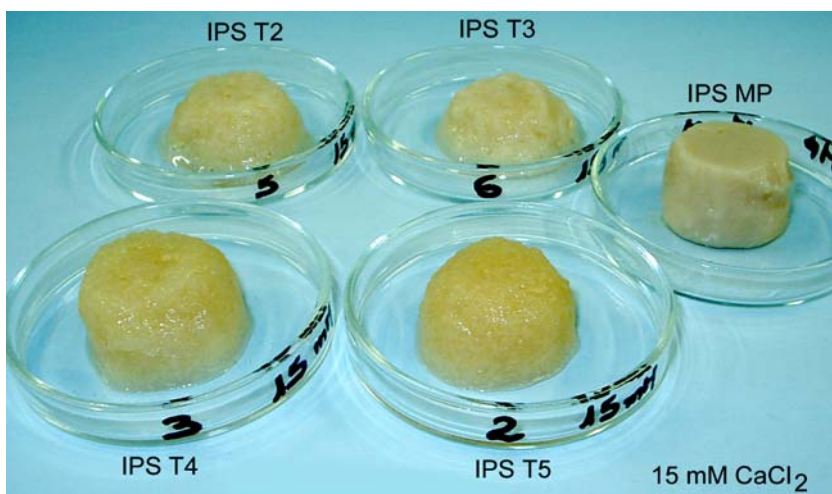


Figura 20. Géis protéicos de soja (12% p/p), sem (a) e com presença de CaCl₂ 5 mM (b) ou CaCl₂ 15 mM (c), obtidos dos isolados de soja tratados termicamente. Os isolados e as condições de tratamento correspondentes são (proteína, temperatura, tempo): T2 (3%, 80°C,15'); T3 (3%, 80°C,30'); T4 (5%, 80°C,15') e T5 (5%, 80°C,30').

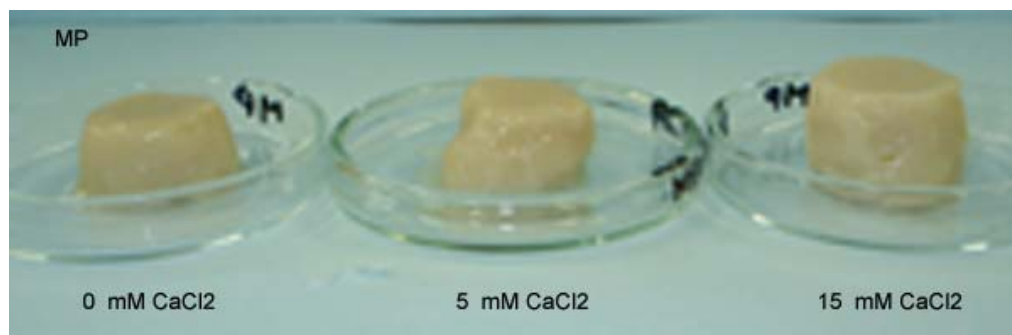
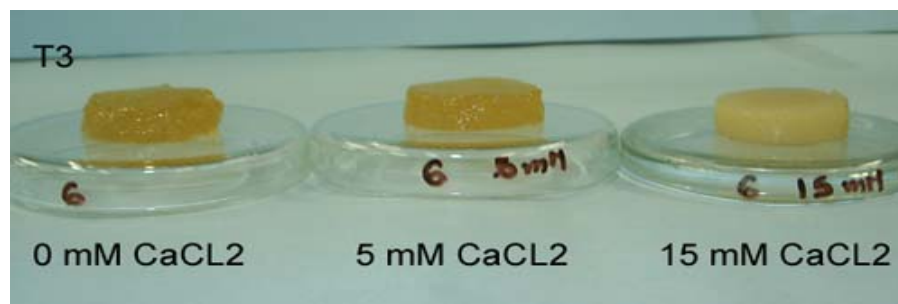


Figura 21. Géis protéicos de soja (12% p/p), sem e com presença de CaCl_2 (5 ou 15 mM), obtidos do isolado de soja comercial (MP).

As diferenças entre a aparência dos géis preparados com os isolados obtidos em laboratório e comercialmente podem ser atribuídas às modificações adicionais do processo industrial, que envolvem a secagem do isolado a altas concentrações de proteína, a presença de sais adicionados deliberadamente (por ex. $\text{Ca}(\text{OH})_2$) ou na água utilizada na extração e resuspensão do isolado, além da adição de fosfolipídeos (WAGNER; SORGENTINI; AÑÓN, 2000).

A **Figura 22** mostra os géis com 14% de proteína (p/p), obtidos dos isolados T3 e T5, preparados sem e com adição de CaCl_2 . Os géis obtidos dos isolados T2 e T3 apresentaram características de textura e cor semelhantes assim como o gel de T4 foi semelhante ao de T5 (**Figura 22**). Os géis 14%, comparado aos géis com 12% de proteína, apresentaram diferenças menos marcantes e cor em função da adição do sal (5 e 15 mM de CaCl_2) e das condições do tratamento térmico utilizado. Os géis com 14% de proteína apresentaram maior consistência do que os géis com 12%. A opacidade dos géis formados com adição de CaCl_2 aumentou de forma menos acentuada nos géis com 14% que nos géis com 12% de proteína, evidenciando a importância da concentração protéica na formação da rede de gel.

a)



b)

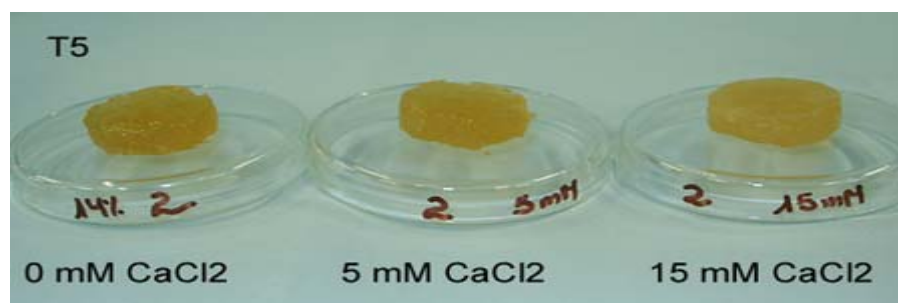


Figura 22. Géis protéicos de soja (14% p/p) preparados sem e com adição de CaCl₂, obtidos dos isolados de soja T3 (a) e T5 (b). As condições de tratamento térmico correspondente aos isolados foram: T3 (proteína 3%, 80°C, 30 min) e T5 (proteína 5%, 80°C, 30 min).

5.2.2 Caracterização reológica

5.2.2.1 Análise de perfil de textura (TPA)

A textura reflete um conjunto de propriedades físicas, resultado da forma como os componentes estruturais do alimento se organizam em micro e macro estrutura. Está relacionada à deformação, desintegração e fluidez do material sob a ação de uma força (BOURNE, 1978). A dureza, coesividade e adesividade fazem parte da análise do perfil de textura (BOURNE, 1968). A **Figura 23** mostra os parâmetros de dureza, coesividade e adesividade dos géis formados a frio, obtidos dos isolados de soja pré-tratados termicamente, em relação à concentração de proteína (12 e 14% p/p) e CaCl₂ (0, 5 e 15 mM). Os isolados T0 e T1 não formaram gel em nenhuma das condições experimentais utilizadas, permaneceram como dispersões viscosas mesmo com adição de CaCl₂ e, por tanto, não foram analisadas.

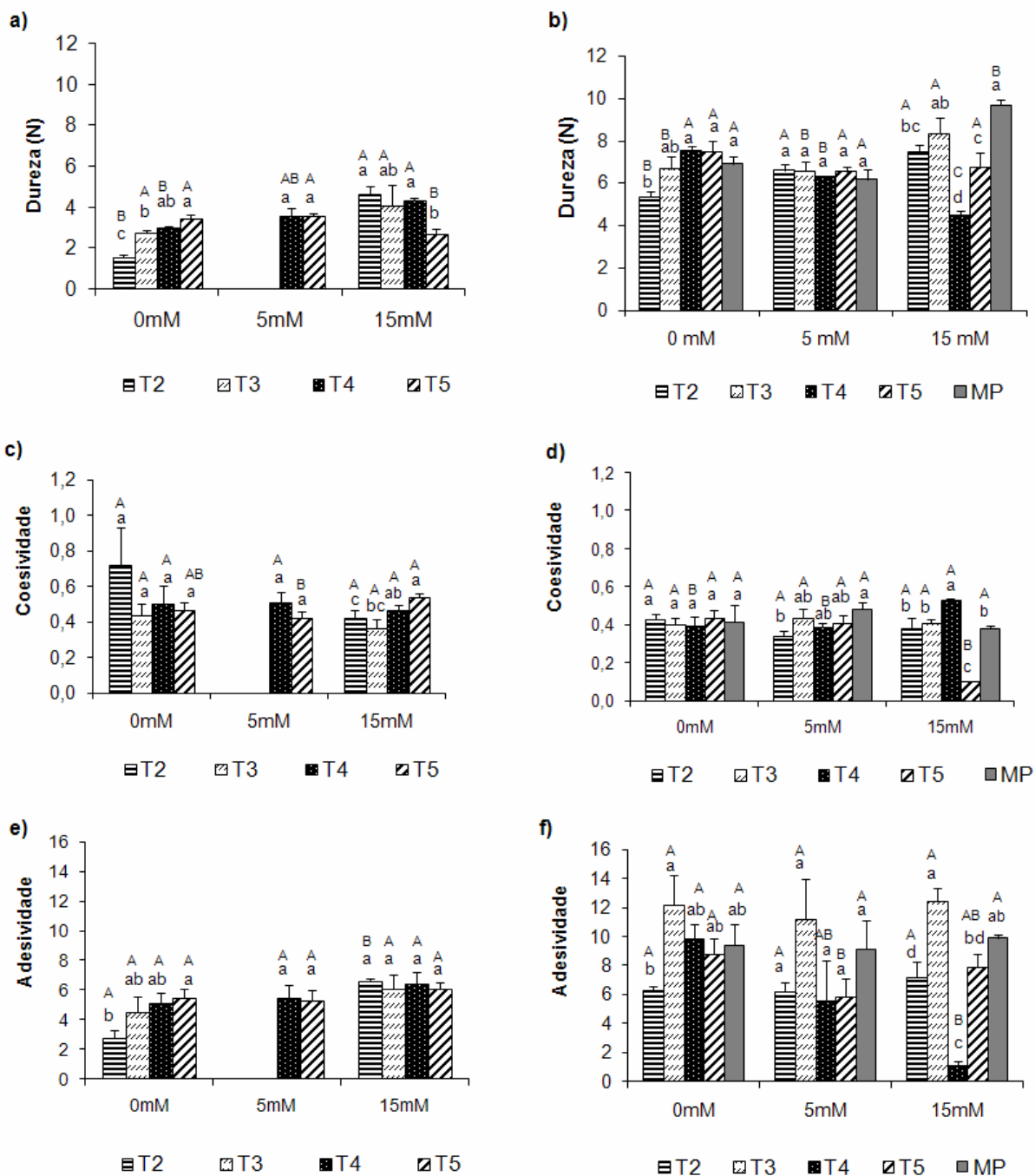


Figura 23. Dureza, coesividade e adesividade dos géis protéicos de soja (12%– a, c, e e 14% de proteína (p/p) – b, d, f) formados a frio nas concentrações de CaCl₂ 0, 5 e 15 mM. Os isolados correspondem aos seguintes tratamentos (prot.%, temperatura, tempo): T2 (3%, 80°C, 15’); T3 (3%, 80°C, 30’); T4 (5%, 80°C, 15’); T5 (5%, 80°C, 30’) e IPS MP (comercial). NOTA: Letras minúsculas diferentes: diferença (p<0,05) entre as médias na mesma concentração de CaCl₂. Letras maiúsculas diferentes: diferença (p<0,05) entre as médias obtidas para o mesmo isolado de soja em relação a concentração de CaCl₂.

De forma geral, a dureza dos géis aumentou com o incremento da concentração protéica de 12 para 14% (p/p), o que pode ser atribuído à maior interação proteína-proteína. Entre os géis com 12 e 14% de proteína e sem adição de sal, o de menor dureza foi o do isolado T2 ($p < 0,05$). Outro aspecto importante observado, essencialmente nos géis obtidos sem os íons cálcio, foi a maior dureza daqueles obtidos dos isolados T4 e T5, cuja concentração de proteína foi maior (5%) na etapa de aquecimento embora, estatisticamente, a dureza dos géis 12 e 14% obtidos do isolado T3 foi semelhante a do T4 (gel 12%) e semelhante a dos isolados T4 e T5 (gel 14%). Ju e Kilara (1998) e Alting (2003) também observaram aumento da dureza de géis obtidos a frio de isolado protéico de soro de leite com o aumento da concentração protéica no pré-aquecimento e também com o tamanho e concentração dos agregados.

A presença de CaCl_2 (15 mM) promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) da dureza dos géis com 14% de proteína (p/p), obtidos dos isolados T2, T3 e MP. Entretanto, os géis obtidos com o isolado T4 apresentaram menor dureza ($p < 0,05$) à medida que a concentração de sal aumentou e, no caso do T5, não sofreram alteração pela adição de CaCl_2 adicionado para induzir a geleificação, pois promoveram interações entre os agregados protéicos originalmente existentes no isolado (ALTING, 2003).

A coesividade dos géis com 14% de proteína formados sem CaCl_2 , não diferiu significativamente ($p > 0,05$) em função do tipo de isolado utilizado. Quando os géis foram formados na presença do sal, observou-se que com 15 mM CaCl_2 houve diferenças ($p < 0,05$) de coesividade. O gel, com 14% de proteína, do isolado T5 apresentou coesividade significativamente mais baixa que os demais na mesma concentração de CaCl_2 (15 mM). O gel com 12% de proteína do isolado T5, ao contrário, foi o mais coeso, sugerindo que o aumento na coesividade com a diminuição da concentração protéica pode ser atribuído à formação de agregados induzidos pelo cálcio, o que resultou em uma matriz mais coesa. Hongsprabhas e Barbut (1998) observaram que o aumento da concentração de CaCl_2 de 10 para 120 mM em géis de isolados protéicos de soro de leite obtidos a frio tornava-os progressivamente mais duros, menos coesos e menos elásticos.

Os resultados não mostraram aumento da adesividade em decorrência da adição do CaCl_2 , em ambas as concentrações de proteína utilizadas, com exceção do gel 12% preparado com adição de 15 mM CaCl_2 obtido do isolado T2. A adesividade de géis tem sido associada às ligações não covalentes, principalmente as interações eletrostáticas formadoras da rede de gel (MOOR; HA, 1993). Porém, os géis dos isolados T4 e T5 (14% de proteína) apresentaram valores significativamente menores ($p < 0,05$) de adesividade com o acréscimo do sal. A alta concentração de proteína aumenta a interação proteína-proteína e pode comprometer a acessibilidade dos íons cálcio na estrutura protéica formada. Dessa maneira, o efeito do cálcio em produzir agregação via interações eletrostáticas com a proteína poderia ser minimizado ou, ainda, o Ca^{2+} possivelmente desestabiliza os agregados formados na etapa de aquecimento acarretando em géis menos adesivos.

5.2.2.2 Viscoelasticidade

Para avaliar o efeito dos íons cálcio no processo de geleificação por adição de CaCl_2 , a variação dos módulos dinâmicos, G' e G'' , a viscosidade complexa ou elástica (η^*) e a tangente de delta ($\text{tang } \delta$), foram determinadas nos géis obtidos em três diferentes condições: a) dispersões preparadas com concentração de proteína 12% e 0 mM de CaCl_2 (em água); b) dispersões preparadas com concentração de proteína 12% e 5mM de CaCl_2 ; e c) dispersões preparadas com concentração de proteína 12% e 15mM de CaCl_2 .

As características viscoelásticas dos isolados de soja foram determinadas somente nas amostras que formaram gel: T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30') e IPS MP (comercial). Todas as avaliações foram realizadas em géis com 12% de proteína, pois, em experimentos preliminares, verificou-se que em géis com 14% o efeito da adição de sal não era detectável com a metodologia utilizada.

Na **Figura 24** pode-se observar o efeito do tratamento térmico na fase de produção do IPS e a adição de CaCl_2 no comportamento viscoelástico dos géis obtidos a frio está apresentado. Para todas as condições estudadas, G' apresentou-se superior

à G'' . Nas três concentrações de sal (0, 5 e 15 mM CaCl_2) os módulos G' e G'' permaneceram constantes com o aumento da frequência, sugerindo que houve a formação de uma matriz tridimensional estável, independente da presença de Ca^{2+} . Puppo, Sorgentini, Añón, (2000) sugerem que a rede protéica é estabilizada possivelmente por interações não covalentes (pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas) e covalentes (pontes dissulfeto).

Com a adição de CaCl_2 , verificou-se aumento dos módulos elástico e viscoso dos géis. O aumento mais expressivo do módulo elástico dos géis com a maior concentração do sal (15 mM) resultou possivelmente do efeito dos íons cálcio na redução da repulsão eletrostática da proteína e a conseqüente associação entre as moléculas protéicas (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998; CHRONAKIS, 2001). Bryant e McClements (2000), em estudo sobre a influência do NaCl e CaCl_2 na gelificação a frio de proteínas do soro de leite desnaturadas, mostraram que o aumento da concentração de Ca^{2+} resultou numa estrutura de gel mais rígida, fato atribuído à sua capacidade de promover agregação das proteínas via interações eletrostáticas e de formar pontes salinas entre as proteínas.

O aumento de G' e G'' com o incremento da concentração do sal de 5 para 15 mM, foi mais importante para os géis dos isolados T2 e T3, tratados termicamente com 3% de proteína, do que nos géis dos isolados T4 e T5, tratados com 5% de proteína. Neste último caso, provavelmente devido aos agregados formados no tratamento térmico, a possibilidade de interações eletrostáticas diminuiu, debilitando a associação molecular na estrutura tridimensional (CHRONAKIS, 1996).

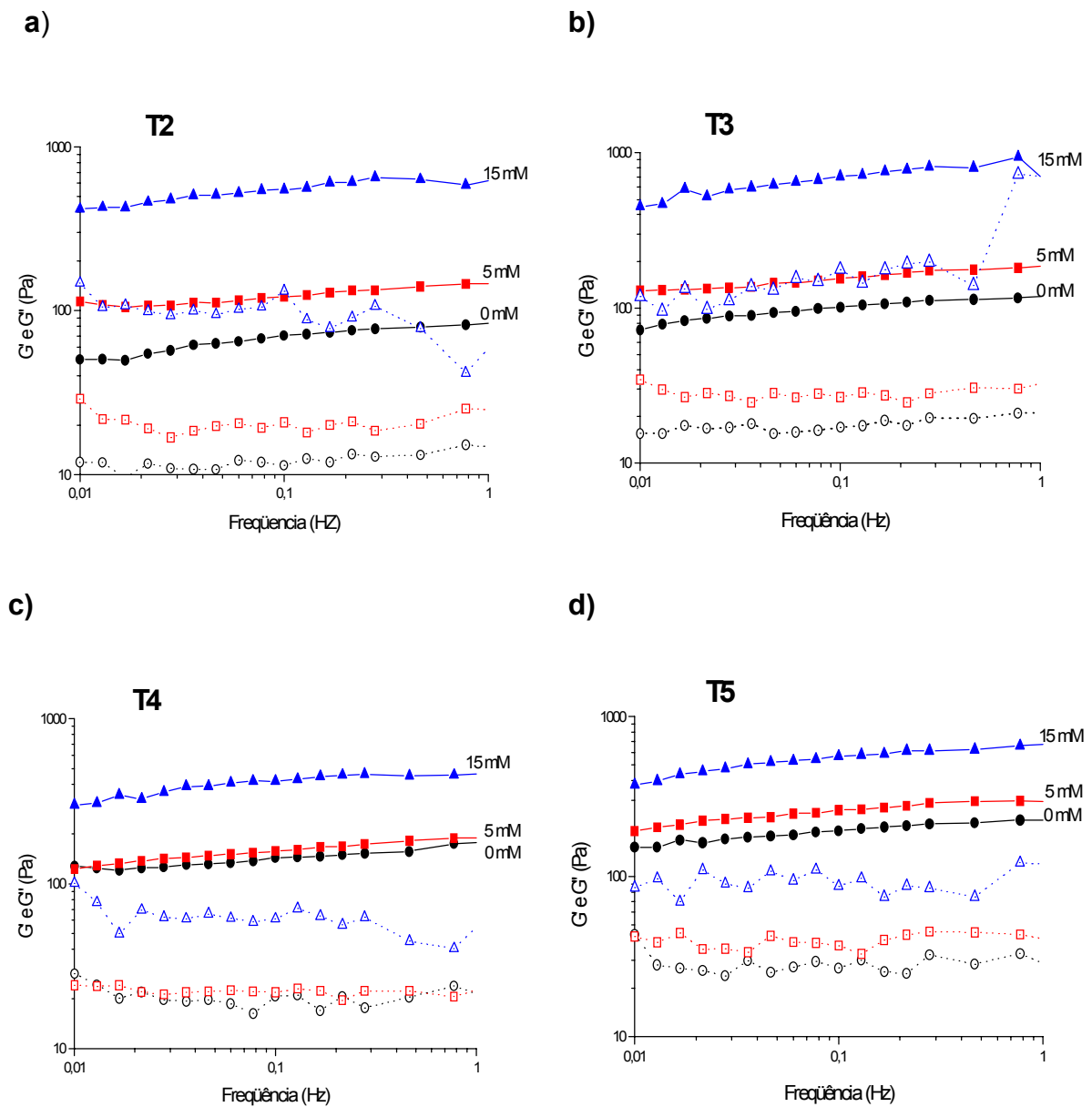


Figura 24. G' e G'' em função da concentração de CaCl_2 dos isolados. Os isolados correspondem aos seguintes tratamentos (proteína, temperatura, tempo): **a)** T2 (3%, 80°C, 15'); **b)** T3 (3%, 80°C, 30'); **c)** T4 (5%, 80°C, 15') e **d)** T5 (5%, 80°C, 30'). As linhas contínuas referem-se à variação do módulo G' e as linhas pontilhadas à variação do G'' .

Os géis obtidos a frio com o isolado comercial IPS MP sem e com CaCl_2 (5 mM) alcançaram valores de G' e G'' maiores do que os dos isolados obtidos em laboratório (**Figura 25**), resultado, possivelmente, do maior grau de modificação estrutural da proteína comercial.

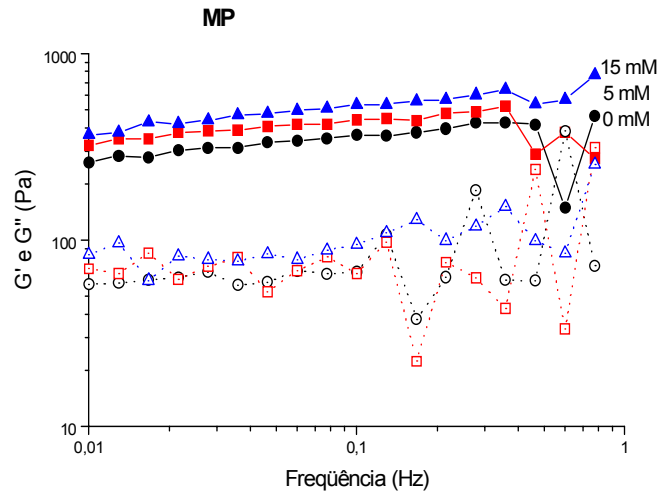


Figura 25. Variação de G' e G'' em função da concentração de CaCl_2 do IPS MP (comercial). As linhas contínuas referem-se à variação do módulo G' e as linhas pontilhadas à variação do G'' .

O aumento dos valores de G' e G'' observado em função do aumento da força iônica não alterou expressivamente a $\tan \delta$, sugerindo que os componentes viscoso e elástico foram igualmente modificados pela concentração de CaCl_2 (**Figura 26**). Todos os valores da $\tan \delta$ situaram-se abaixo de 0,5, sugerindo que o comportamento dos géis foi essencialmente elástico (COONEY; ROSENBERG; SHOEMAKER, 1993).

O pequeno aumento da $\tan \delta$ dos géis obtidos com 15 mM CaCl_2 em relação aos géis sem e com 5 mM CaCl_2 , indica que a estrutura foi um pouco menos elástica que o restante dos géis. Este comportamento foi verificado em todas as amostras de isolados tratados termicamente, sendo mais expressivo no isolados T3. Apesar disso, este parâmetro não mostrou influência expressiva das condições dos tratamentos térmicos realizados nos isolados.

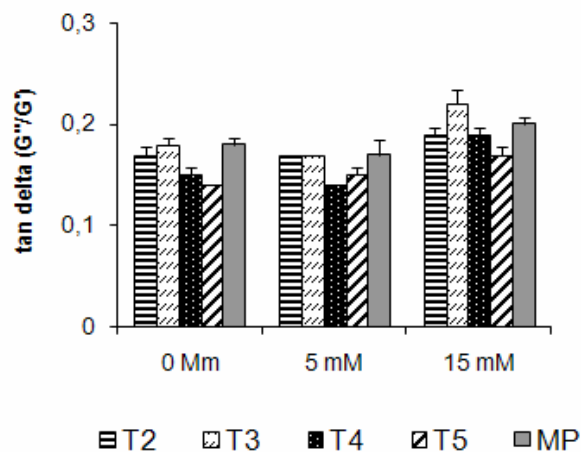


Figura 26. Variação da $\tan \delta$ em função da concentração de CaCl_2 , determinada em 0,1 Hz de frequência, para cada amostra de isolado de soja representada pelos isolados tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo): T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30') e IPS MP (comercial).

Resultados semelhantes foram observados por Maltais et al. (2005) quando analisaram, por medidas oscilatórias de propriedades dinâmicas, a formação de géis protéicos de soja com 9% de proteína induzidos a frio e formados pela adição de 0, 10 e 20 mM de CaCl_2 . Os autores reportaram que houve aumento em ambos, G' e G'' , e diminuição da $\tan \delta$ para todas as condições testadas. O comportamento elástico aumentou quando as concentrações de CaCl_2 aumentaram.

Mleko et al. (2002) avaliaram algumas das propriedades reológicas dos géis obtidos de soro de leite a temperatura ambiente induzidos por íons cálcio. Os autores constataram que o aumento da concentração de CaCl_2 de 7,5 para 15 mM resultou em maiores valores de G' promovendo a formação de uma estrutura mais rígida e mais elástica. Entretanto, o aumento de cálcio para 20 mM resultou numa estrutura menos elástica. Ao contrário, os resultados obtidos no presente estudo com as proteínas de soja, verificou-se que o aumento da concentração de CaCl_2 resultou no aumento de G' , entretanto, não resultou em géis mais elásticos.

A **Figura 27** mostra a variação da viscosidade complexa (η^*), com a frequência dos géis obtidos com diferentes isolados protéicos em concentrações de CaCl_2 0, 5 e 15 mM.

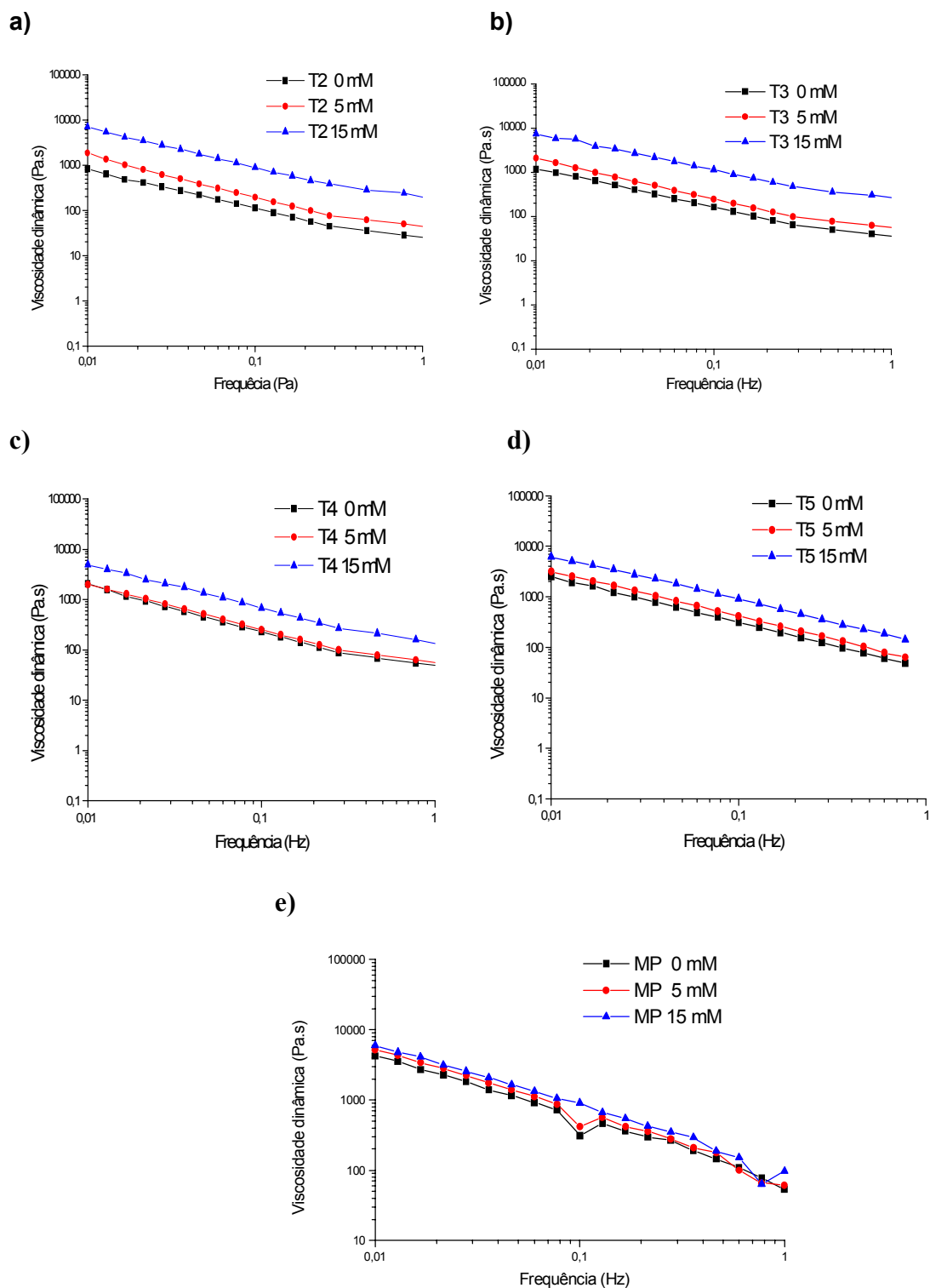


Figura 27. Variação de η^* em função da frequência oscilatória dos géis obtidos na ausência e na presença de CaCl_2 (5 e 15 mM). Os géis dos isolados de soja tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo) correspondem aos: **a)** T2 (3%, 80°C, 15'); **b)** T3 (3%, 80°C, 30'); **c)** T4 (5%, 80°C, 15'); **d)** T5 (5%, 80°C, 30') e **e)** IPS MP (comercial).

A variação de η^* com a frequência corresponde a de géis fortes (ROSS-MURPHY, 1995). Os valores de η^* dos géis preparados com 15 mM CaCl_2 foram maiores para todos os isolados, exceto para o IPS MP, sugerindo a formação de agregados com a adição do sal.

Nas condições experimentais, G' , G'' e η^* indicaram comportamento característico de um sólido viscoelástico, dos géis obtidos sem e com CaCl_2 de todos os IPSs analisados. Esse comportamento “tipo gel” que reflete a formação de uma matriz tridimensional estável quando submetida ao intervalo de frequência aplicado (HAAKE, 1991).

5.2.3 Solubilidade dos géis

A solubilidade dos géis em diferentes meios de extração tem como objetivo averiguar a contribuição de cada tipo de união que formam e/ou estabilizam a estrutura dos géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente.

A **Figura 28** mostra os valores médios percentuais de solubilidade dos géis obtidos dos isolados protéicos de soja, sem a presença de CaCl_2 , nos diferentes meios: a) água destilada (AG); b) solução tampão 0,086 M Tris-HCl, 0,09 M Glicina, 0,004 M Na_2EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI); c) solução **b** contendo 6 M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (T/U-SDS).

A solubilidade em AG dos géis com 12% de proteína foi de aproximadamente 80%, para todos os isolados avaliados. Em TRIS/GLI, a solubilidade dos géis obtidos de T2, T3 e T5 foi semelhante à da em água ($p > 0,05$), e do T4 foi maior. A solubilidade do gel do isolado comercial MP foi menor ($p < 0,05$) na solução TRIS/GLI do que a dos géis dos isolados obtidos no laboratório. Em T/U-SDS a solubilidade dos géis diminuiu ($p < 0,05$) em relação à da em TRIS/GLI, para todos os IPSs. Por outro lado, a solubilidade do gel do MP aumentou ($p < 0,05$) em relação à da em TRIS/GLI.

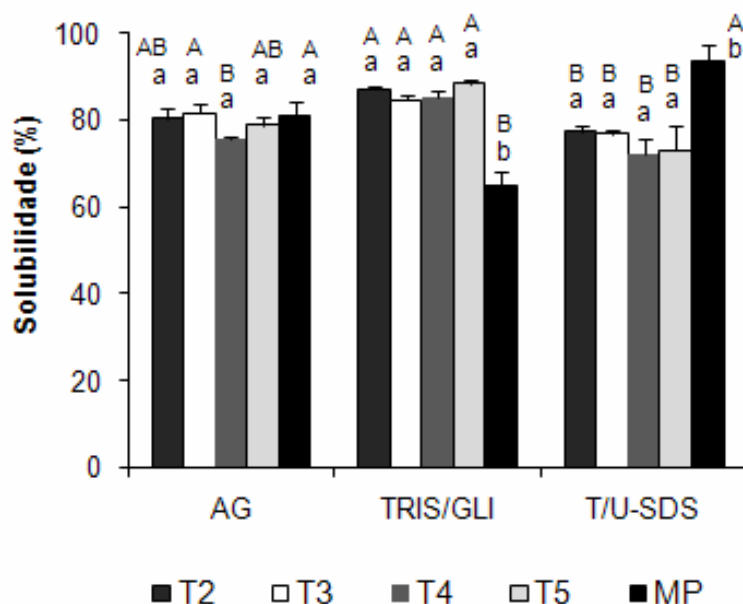


Figura 28. Solubilidade dos géis protéicos de soja (12% p/p), induzidos a frio sem a presença de CaCl_2 , em: água destilada (AG); solução tampão Tris-HCl/Glicina/ Na_2EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI) e solução tampão HCl/Glicina/ Na_2EDTA , contendo 6 M uréia e 0,5% SDS (T/U-SDS). Os géis dos isolados de soja tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo) correspondem aos: T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15'); T5 (5%,80°C,30') e IPS MP (comercial). Letras minúsculas diferentes em cada meio de extração e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

Os géis formados com os isolados de soja obtidos em laboratório apresentaram o mesmo comportamento de solubilidade nos três meios de extração analisados AG, TRIS/GLI e T/U-SDS. Esses resultados sugerem que as eventuais alterações estruturais decorrentes do tratamento térmico não resultaram em diferentes redes formadoras do gel. Os resultados de solubilidade do gel do isolado comercial, ao contrário, indicam que a rede de gel formada foi estabilizada especialmente pelas interações hidrofóbicas.

A **Figura 29** mostra os valores de solubilidade dos géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente, preparados com a adição de 15 mM de CaCl_2 , em diferentes meios (AG, TRIS/GLI, T/U-SDS e solução salina de 15 mM CaCl_2).

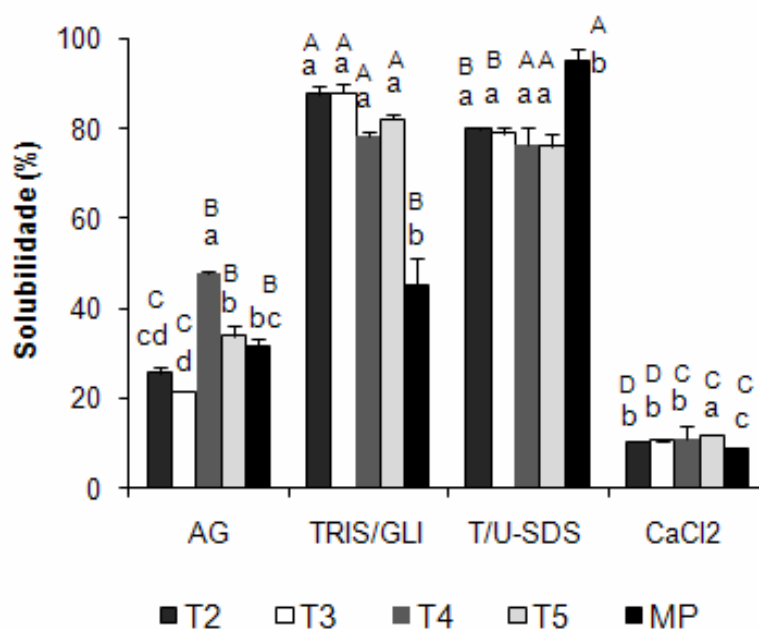


Figura 29. Solubilidade dos géis protéicos de soja (12% p/p), induzidos a frio com a presença de CaCl_2 (15 mM), em: água destilada (AG); solução tampão Tris-HCl/Glicina/ Na_2EDTA (pH 8,0) (TRIS/GLI) e solução tampão HCl/Glicina/ Na_2EDTA , contendo 6 M uréia e 0,5% SDS (T/U-SDS) e solução de 15 mM CaCl_2 . Os géis dos isolados de soja tratados termicamente (proteína, temperatura, tempo), correspondem aos: T2 (3%, 80°C, 15'); T3 (3%, 80°C, 30'); T4 (5%, 80°C, 15'); T5 (5%, 80°C, 30') e IPS MP (comercial). Letras minúsculas diferentes em cada meio de extração e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$).

A solubilidade dos géis, dos diferentes IPSs, em AG foi significativamente menor que em TRIS/GLI e T/U-SDS ($p < 0,05$), indicando que os íons Ca^{2+} adicionados no preparo do gel foram efetivos na diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas protéicas. A matriz de gel formada nestas condições foi possivelmente estabilizada por interações eletrostáticas (pontes de cálcio), pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Em solução 15 mM CaCl_2 a solubilidade dos géis foi menor que em água. Como a concentração da solução salina foi igual à utilizada para obtenção dos géis de forma que a estrutura dos géis não sofresse nenhum tipo de desestabilização de rede, sugere-se que apenas uma pequena fração das proteínas não estava participando da matriz do gel.

Nos géis obtidos pela adição de CaCl_2 houve diferenças entre a solubilidade em diferentes meios de extração. Isto mostra uma efetiva estruturação do gel, ao contrário do que foi observado nos géis obtidos sem CaCl_2 . Portanto, a solubilidade dos géis obtidos com adição de CaCl_2 apresentou comportamento distinto dos géis formados sem adição de sal, indicando que a presença de Ca^{2+} teve papel importante na formação da rede de gel.

A solubilidade dos géis com 12% de proteína, preparados com CaCl_2 , nos diferentes meios de extração foi também influenciada pelas condições (concentração de proteína, temperatura e tempo de aquecimento) utilizadas na obtenção dos isolados de soja (**Figura 29**). A solubilidade dos géis em AG, por exemplo, foi diferente para os géis de T2 e T3 comparada a de T4 e T5.

Os resultados indicaram que todos os géis induzidos por Ca^{2+} estão estabilizados principalmente por ligações não covalentes, sobretudo por interações eletrostáticas (pontes de cálcio). Esta estruturação da rede do gel pode explicar a maior dureza dos géis com Ca^{2+} (**Figura 23**). Géis protéicos de soro de leite obtidos a frio também apresentaram maior dureza quando o CaCl_2 foi adicionado à solução de proteína pré-aquecida numa determinada faixa de concentração do sal (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998; BARBUT; FOEGEDING, 1993; ALTING et al., 2002). Bryant e McClements (2000) verificaram que o aumento da concentração de CaCl_2 promoveu o aumento da força dos géis protéicos de soro de leite induzidos por íons Ca^{2+} . Este resultado foi atribuído a formação de pontes de cálcio e diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína por efeito da adição de íons cálcio.

5.2.4 Perfil eletroforético das frações protéicas solúveis nas diferentes soluções aquosas

As frações protéicas, que poderiam estar envolvidas na formação e/ou estabilização da estrutura dos géis, foram caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE, com e sem agente redutor β -mercaptoetanol (β -ME). A **Figura 30** mostra os perfis eletroforéticos, sem ambiente não redutor, das frações solúveis em AG, TRIS/GLI e T/U-SDS dos géis formados a frio sem adição do CaCl_2 (0 mM CaCl_2). O perfil das

frações solúveis em AG, TRIS/GLI e T/U-SDS observado foi semelhante para os isolados de soja obtidos no laboratório (T2, T3, T4 e T5) com agregados protéicos de alta massa molecular, sendo que alguns não conseguiram penetrar no gel, além das subunidades α' (89 ± 7 KDa), α (81 ± 8 KDa) e β -7S (51 ± 4 KDa), a subunidade AB (54 ± 6 KDa), o polipeptídeo A (34 ± 2 KDa) e o polipeptídeo B-11S (21 ± 1 KDa). O isolado comercial MP apresentou perfil diferente: além dos agregados protéicos de alta massa molecular, apenas as subunidades α' , α , e β -7S e os polipeptídeos A e B-11S foram detectados.

A concentração relativa das frações solúveis em TRIS/GLI dos géis dos isolados T4 e T5 diferiu da dos géis obtidos com T2 e T3. A subunidade α' -7S não foi detectada entre as frações solúveis dos géis de T4 e T5, mas foi observada entre as frações solúveis em T/U-SDS, sugerindo que a subunidade α' -7S foi mantida na estrutura desses géis principalmente por interações hidrofóbicas.

Quando a eletroforese foi conduzida em ambiente redutor, observou-se o mesmo perfil eletroforético das frações solúveis dos géis nos três meios de extração, independente do tratamento térmico aplicado aos isolados de soja (**Figura 32**). Houve também o desaparecimento dos agregados protéicos de alta massa molecular presentes no topo do gel de eletroforese, indicando que os agregados de alta massa molecular eram formados principalmente por pontes dissulfeto.

O perfil eletroforético das proteínas solúveis em diferentes meios dos géis obtidos com os diferentes IPSs e 15 mM CaCl_2 , em ambiente não redutor, está apresentado na **Figura 31**.

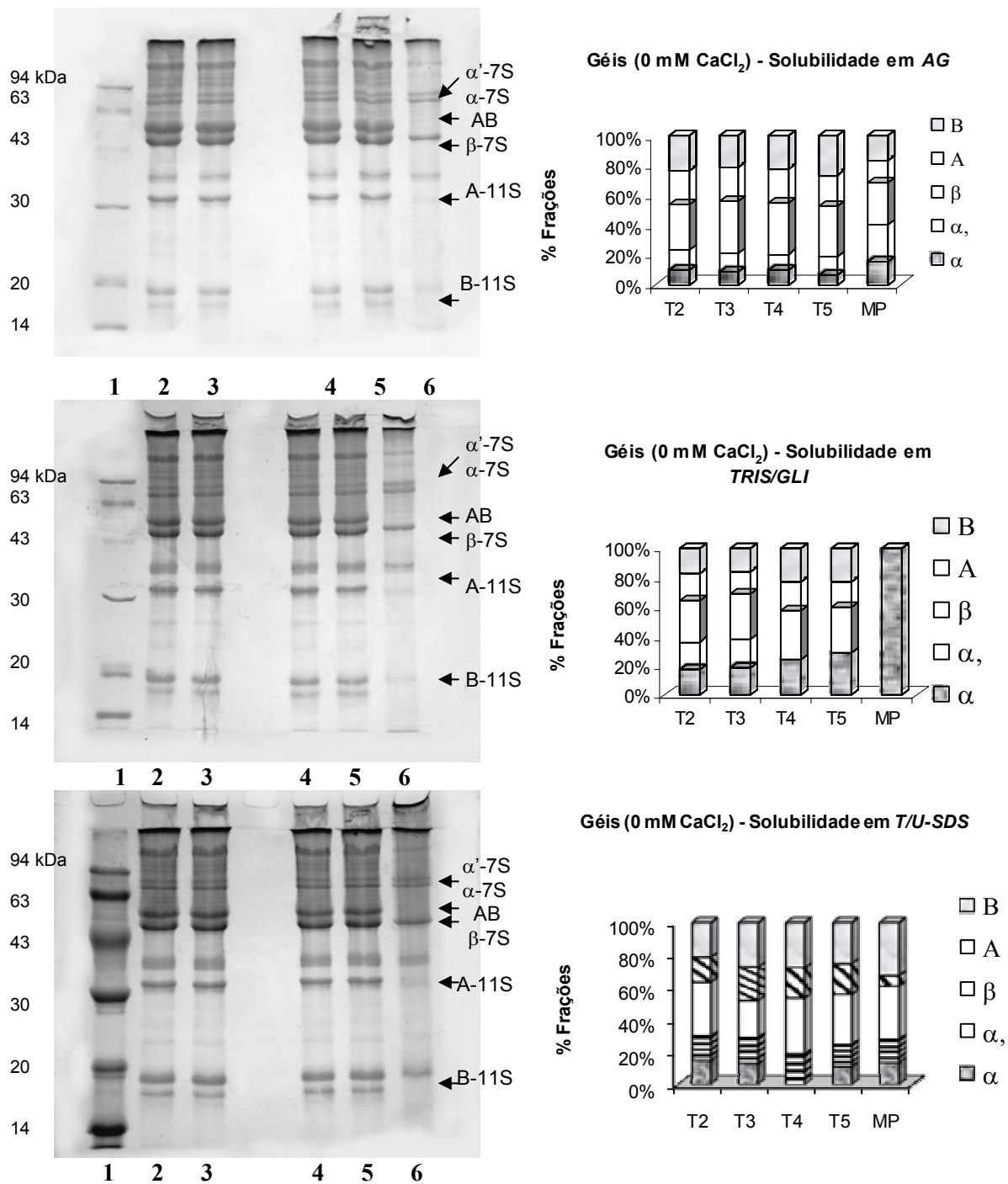


Figura 30. Eletroforese SDS-PAGE, em ambiente não redutor, das frações solúveis em AG, TRIS/GLI e T/U-SDS dos géis protéicos de soja (12% p/p) formados a frio sem adição do CaCl₂. Os géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos (proteína, temperatura, tempo): T2 (3%, 80°C, 15') (2); T3 (3%, 80°C, 30') (3); T4 (5%, 80°C, 15') (4); T5 (5%, 80°C, 30') (5) e IPS MP (comercial) (6). Padrão de baixa massa molecular (1).

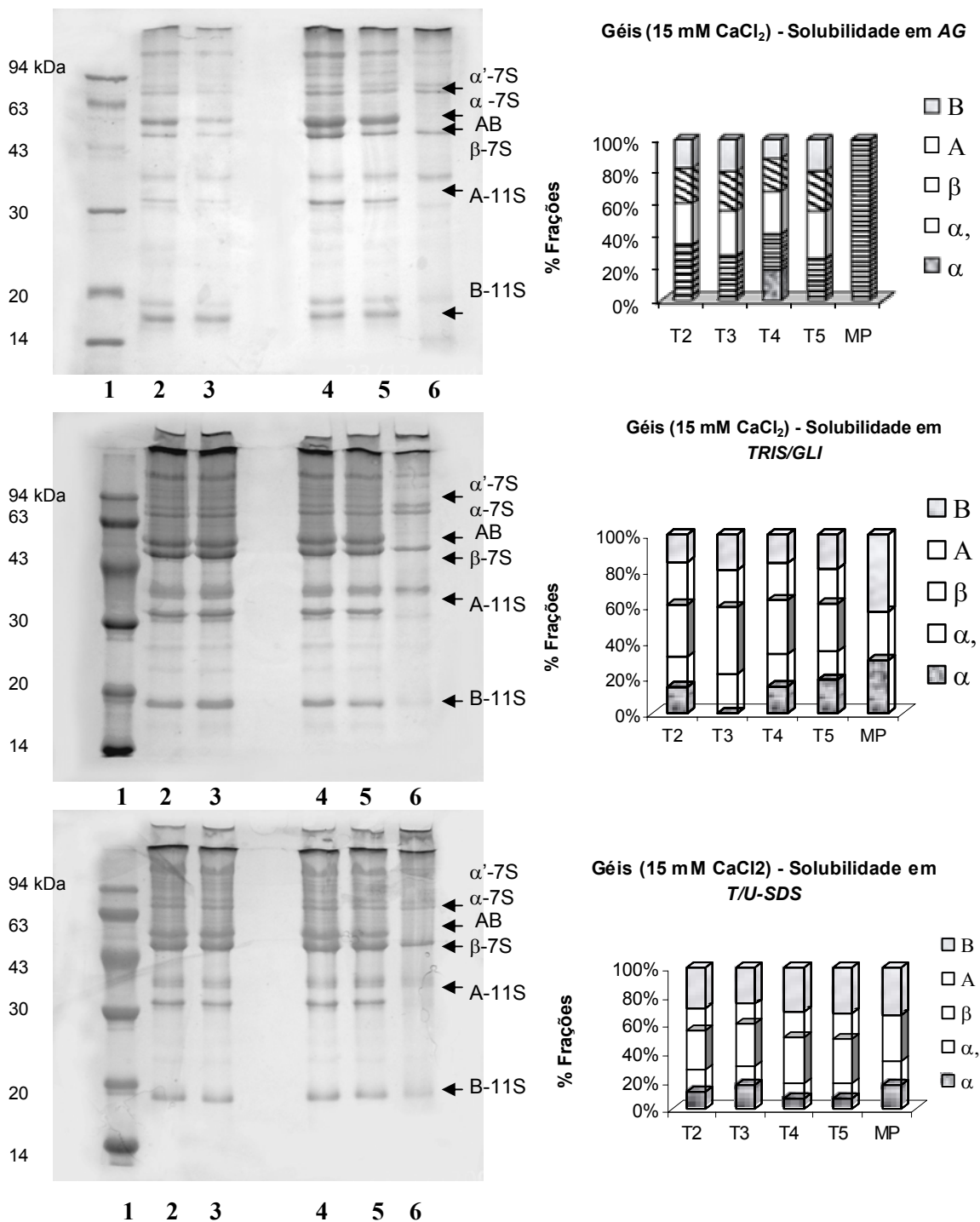


Figura 31. Eletroforese SDS-PAGE, em ambiente não redutor, das frações solúveis em AG, TRIS/GLI e T/U-SDS dos géis protéicos de soja (12% p/p) formados a frio com adição de CaCl₂ (15 mM CaCl₂). Os géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos (proteína, temperatura, tempo): T2 (3%,80°C,15') (2); T3 (3%,80°C,30') (3); T4 (5%,80°C,15') (4); T5 (5%,80°C,30') (5) e IPS MP (comercial) (6). Padrão de baixa massa molecular (1).

Verificou-se ausência ou menor intensidade relativa da subunidade α -7S em TRIS/GLI e T/U-SDS, no caso dos géis preparados com os isolados T2, T3 e T5, o que indica que a subunidade α -7S foi mantida na estrutura dos géis principalmente por interação eletrostáticas e hidrofóbicas. A diminuição da intensidade das bandas das frações solúveis em AG dos géis preparados com 15 mM CaCl_2 , em relação à dos géis sem CaCl_2 , confirma o efeito da agregação protéica promovida pela presença do sal. Isto pode ser devido à sua eficiência em reduzir a repulsão eletrostática e à sua capacidade de formar pontes salinas. Os íons Ca^{2+} acarretaram a agregação protéica entre os grupos carboxílicos carregados negativamente de moléculas de proteína vizinhas (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1997 b; FOEGEDING et al., 2002).

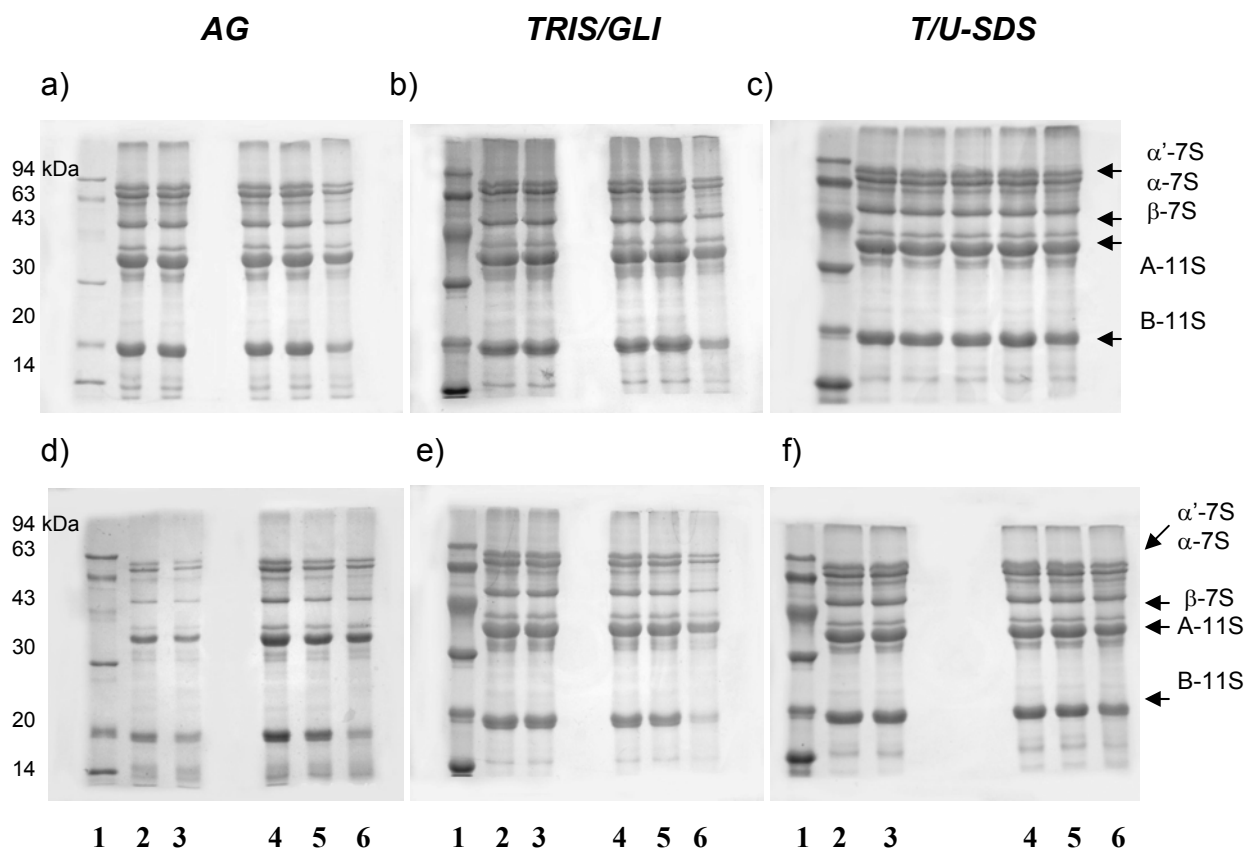


Figura 32. Eletroforese SDS-PAGE das frações solúveis em AG (a, d), TRIS/GLI (b, e) e T/U-SDS (c, f) dos géis protéicos de soja (12% p/p) formados a frio sem (a, b, c) e com adição de 15 mM CaCl_2 (d, e, f). Os géis obtidos dos isolados de soja tratados termicamente correspondem aos (proteína, temperatura, tempo): T2 (3%, 80°C, 15') (2); T3 (3%, 80°C, 30') (3); T4 (5%, 80°C, 15') (4); T5 (5%, 80°C, 30') (5) e IPS MP (comercial) (6). Padrão de baixa massa molecular (1).

A eletroforese SDS-PAGE, realizada com β -ME, para todos os meios de extração das frações solúveis dos géis induzidos com CaCl_2 , revelou que os agregados observados no topo dos géis, desapareceram do perfil (**Figura 32**) das frações solúveis, assim como nos géis obtidos sem a adição de CaCl_2 .

5.2.5 Capacidade de retenção de água

A água retida está fisicamente imobilizada pela rede protéica e não pode ser expelida por pressão. Outra hipótese, também discutida, é que os poros da rede protéica retenham a água por fenômenos de capilaridade (CHEFTEL et al., 1993). A **Figura 33** mostra a capacidade de retenção de água dos géis de isolados de soja tratados termicamente, induzidos a frio, sem e com adição de CaCl_2 (5 e 15 mM).

Os géis formados sem a adição de sal apresentaram valores médios de água retida (81,9 – 85,0%) similares aos obtidos com adição de 5 mM de CaCl_2 (77,3 – 82,9%) e maiores do que os obtidos com 15 mM de CaCl_2 (51,2 – 76,1%). Quanto maior foi a concentração da proteína, utilizada na produção do IPS, menor foram estas diferenças. Contudo, os valores de retenção de água diferiram significativamente ($p < 0,05$), na mesma amostra de IPS e entre eles, apenas quando os géis foram preparados com adição de 15 mM de CaCl_2 . Os géis do isolado MP não apresentaram diferenças significativa em função da adição do sal. No entanto, diferiu significativamente ($p < 0,05$), na presença de 15 mM CaCl_2 , dos géis dos IPSs obtidos e tratados termicamente em laboratório. Estes resultados podem estar associados à forte agregação proteína-proteína provocada pela adição do sal, promovendo a contração da rede protéica e expulsão da água para fora da estrutura.

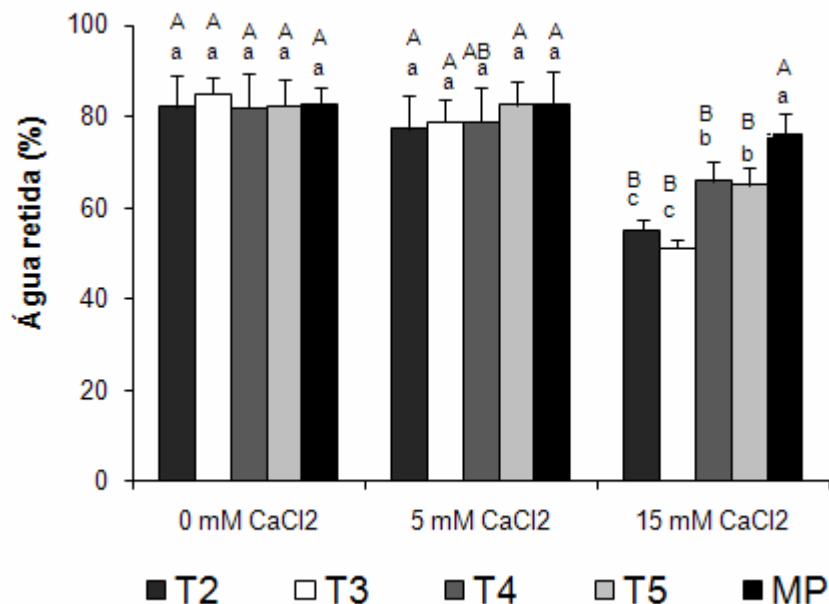


Figura 33. Capacidade de retenção de água dos géis protéicos de soja (12% p/p), tratados termicamente, preparados sem a presença de CaCl₂ e com adição de CaCl₂ (5 e 15 mM). Os isolados correspondem as seguintes condições de tratamento (proteína, temperatura, tempo): T2 (3%,80°C,15'); T3 (3%,80°C,30'); T4 (5%,80°C,15') e T5 (5%,80°C,30'). Letras minúsculas diferentes em cada concentração de CaCl₂ e letras maiúsculas diferentes na mesma amostra de isolado de soja indicam que os valores diferem significativamente (p<0,05).

O efeito dos íons cálcio na conformação da proteína pode se dar por meio de interações eletrostáticas com os grupos carregados e os grupos polares da proteína, ou por modificação da estrutura da água por interações hidrofóbicas entre as moléculas protéicas (DAMODARAN; KINSELLA, 1982). Neste último caso, a alteração da estrutura da água (desestabilização das pontes de hidrogênio) pela presença do sal, devido à interação íon-dipolo, poderia alterar o grau de hidratação assim como a orientação das moléculas de água ao redor dos resíduos não polares das cadeias peptídicas (DAMODARAN; KINSELLA, 1982).

Os géis obtidos com adição de 15 mM de CaCl₂ apresentaram aparência esbranquiçada e opaca, indicando a formação de agregados maiores devido, ao efeito de *salting out*. A capacidade de retenção de água pode estar relacionada, também, ao tamanho do espaço interno da estrutura, o qual determina a força capilar (MALTAIS et

al., 2005). No presente trabalho, os géis (12%) preparados com 15 mM CaCl_2 dos isolados T2 e T3, cuja coesividade foi menor que as dos isolados T4 e T5, apresentaram menor capacidade de retenção de água.

Com aumento da concentração de sal de 10 para 20 mM, Maltais et al. (2005) observaram igual efeito do CaCl_2 na capacidade de retenção de água de géis protéicos de soja induzidos a frio por adição do sal, explicada pelo aumento dos poros da estrutura. Segundo Bryant e McClements (1998), quando a concentração de sal aumenta a repulsão eletrostática entre os polipeptídeos diminui promovendo a interação proteína-proteína ao invés da união proteína-água. Resultados semelhantes ao do presente estudo também foram constatados por Roff e Foegeding (1996) e Hongsprabhas e Barbut (1998) ao analisarem géis protéicos de soro de leite induzidos a frio por adição de cálcio. O aumento da concentração de CaCl_2 de 10 para 120 mM resultou em grandes agregados e numa microestrutura porosa, que resultou redução da capacidade de retenção de água.

5.2.6 Microscopia

A **Figura 34** mostra as imagens da microscopia eletrônica de varredura dos géis (12% p/p) preparados sem e com a adição de 15 mM CaCl_2 . Quando obtidos com adição do sal, os géis apresentaram estrutura de superfície mais homogênea e mais porosa do que os géis obtidos sem adição de Ca^{2+} . Os géis dos isolados T2 e T3, obtidos por adição de CaCl_2 , mostraram estruturas semelhantes e mais porosa comparados ao dos isolados T4 e T5. Os géis dos isolados T4 e T5, também apresentaram estruturas semelhantes, porém com estrutura mais homogênea e menos porosa que a dos géis do T2 e T3, indicando o efeito dos tratamentos anteriores, em particular a concentração de proteína, na formação da microestrutura dos géis.

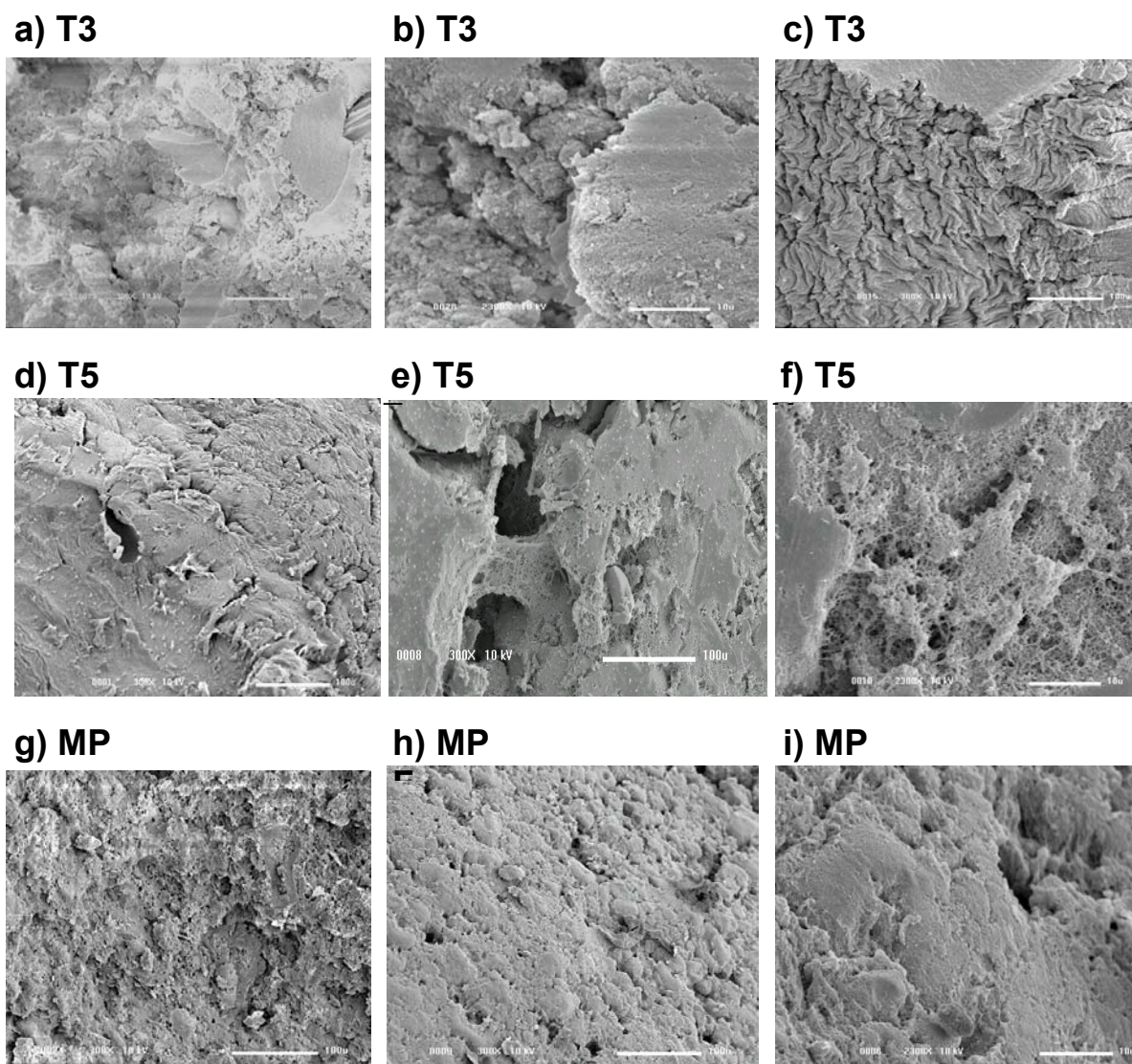


Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura (MEV), com aumento de 300x, de géis protéicos de soja induzidos a frio sem (**a**, **d**, **g**) e com presença de 15 mM CaCl_2 (**b**, **e**, **h**) e com aumento de 2300x, de géis protéicos de soja com 15 mM CaCl_2 (**c**, **f**, **i**). Os isolados tratados termicamente (prot.%, temperatura, tempo) correspondem aos: T3 (3%,80°C,30') – **a**, **b**, **c**; T5 (5%,80°C,30') – **d**, **e**, **f**; e o isolado comercial (MP) – **g**, **h**, **i**.

O gel do isolado comercial (MP) mostrou micrografias distinta dos géis dos isolados obtidos em laboratório. Com a adição de 15 mM de CaCl_2 , a estrutura do gel do isolado MP foi mais homogênea e menos porosa do que quando obtido sem CaCl_2 (**Figura 34 – g, h, i**). As diferenças observadas nas microestruturas dos géis dos IPSs podem estar relacionadas às características físico-químicas e tamanho dos agregados

formados durante a etapa de aquecimento dos isolados e após a adição dos íons cálcio. A aparência esbranquiçada e opaca dos géis formados pela adição de 15 mM CaCl_2 indica a formação de grandes agregados de proteína, ao contrário dos géis formados com 0 e 5 mM de CaCl_2 que mostraram aparência translúcida e opaca, respectivamente. Os resultados obtidos por microscopia eletrônica dos géis também foram consistentes com os resultados de retenção de água analisadas dos géis protéicos de soja.

De acordo com Renkema et al. (2000), a aparência granular deve-se à formação de agregados grandes, de uma rede mais grossa e com poros maiores. Hongsprabhas e Barbut (1998) mostraram que a microestrutura de géis de proteína de soro de leite induzidos por Ca^{2+} apresentaram agregados maiores e microestrutura mais porosa quando a concentração de CaCl_2 aumentou de 10 para 120 mM. O aumento do sal também acarretou maior opacidade do gel. Maltais et al. (2005) reportaram um aumento no diâmetro dos agregados e poros com o aumento da concentração de 10 para 20 mM de CaCl_2 . O aumento da concentração de CaCl_2 também resultou no aumento da opacidade do gel. Estes resultados foram semelhantes ao observado no presente trabalho. De acordo com os autores, a microestrutura dos géis induzidos a frio por íons cálcio mostrou que pequenos agregados são mais dispersos e preenchem todos os espaços da rede de gel, ao contrário dos agregados maiores que apresentam grandes espaços entre eles, como consequência da agregação protéica evidenciada a elevadas forças iônicas.

5.3 Discussão geral

No presente estudo, isolados de soja preparados em laboratório foram tratados termicamente sob diferentes condições de concentração protéica, temperatura e tempo de aquecimento com o objetivo de promover a desnaturação protéica seguida de agregação, sem que induzisse a formação de gel, tendo em vista a utilização destes isolados para obtenção de géis induzidos a frio por adição de CaCl_2 . As duas principais modificações do isolado protéico são representadas pela desnaturação e agregação.

A caracterização físico-química dos IPSs tratados termicamente possibilitou dividi-los, em três grupos: **I** - com menor grau de desnaturação e alta solubilidade (T1); **II** - maior grau de desnaturação e alta solubilidade (T2 e T3) e **III** - maior grau de desnaturação e baixa solubilidade (T4 e T5). A diminuição da solubilidade dos isolados em água foi atribuída à agregação protéica. O incremento da temperatura de aquecimento (de 60 para 80°C) e da concentração de proteína (de 3 para 5%), foram os parâmetros que mais influenciaram as características físico-químicas das proteínas modificadas pelo calor. Os agregados nos isolados do grupo III formaram-se, principalmente, por interações hidrofóbicas, diferentes dos demais. Os IPSs dos grupos II e III apresentaram maior capacidade de absorção de água (CAA), atribuído ao processo de desnaturação seguido pela agregação das proteínas. No entanto, os IPSs do grupo III apresentaram maior viscosidade aparente ($p < 0,05$) comparados a dos grupos I e II, indicando que as alterações estruturais ocorridas nestes isolados incrementaram o tamanho das partículas. As modificações na presença de CaCl_2 observadas tanto na CAA quanto na viscosidade aparente (η_{app}) dos IPSs mostraram a influência dos íons cálcio nas características estruturais dos isolados de soja, devido possivelmente à interação estabelecida entre as proteínas e o cálcio.

Wagner e Añón (1990) estudaram a influência do grau de desnaturação, hidrofobicidade e conteúdo de sulfidrila na solubilidade e na CAA de isolados protéicos de soja comerciais. A CAA dos isolados de soja total ou parcialmente desnaturados foi maior que a dos isolados de soja com mais proteínas nativas e dos isolados protéicos totalmente desnaturados. Semelhante aos resultados do presente trabalho, os autores observaram isolados com alta CAA apresentando baixa solubilidade em água, resultado

que foi associado à formação de agregados. Segundo os autores, a CAA está associada ao grau de desnaturação e/ou agregação das proteínas, assim como a natureza dos agregados. O aumento da hidrofobicidade superficial verificada nas proteínas mais desnaturadas promove a formação de agregados protéicos capazes de reter uma quantidade de água significativa em sua estrutura. Entretanto, a hidrofobicidade e a entalpia de desnaturação não explicaram completamente o comportamento diferenciado dentro de cada grupo de isolados de soja ou a baixa absorção de água em amostras totalmente desnaturadas (WAGNER; AÑÓN, 1990).

A estrutura tridimensional do gel resulta da relação entre a estrutura das partículas de gel, o mecanismo e os eventos primários decorrentes das modificações das partículas de proteína durante o pré-tratamento, processo de desnaturação e agregação, assim como, pelas condições do ambiente (pH, temperatura, força iônica, polaridade e tipo do solvente). O comportamento reológico dos géis protéicos induzidos a frio foi influenciado pela quantidade de proteína presente, o tamanho, morfologia e propriedades estruturais das partículas agregadas e das interações entre estas partículas, conduzindo a formação da rede protéica (MARANGONI et al., 2000).

O IPS sem tratamento térmico e o IPS (do grupo I) tratado a 60°C não formaram gel em nenhuma das condições estudadas, sem e com adição de CaCl₂. Os IPSs tratados termicamente a 80°C, formaram géis que foram avaliados em função das alterações estruturais das proteínas nos isolados de soja decorrentes do tratamento térmico e da concentração de CaCl₂ adicionada posteriormente.

Os géis protéicos de soja induzidos a frio sem a presença de sal foram mais translúcidos, de estrutura menos porosa e menos homogênea, apresentando maior capacidade de retenção de água do que os géis obtidos com 15 mM CaCl₂. Por outro lado, os géis obtidos com a adição de CaCl₂ apresentaram aparência opaca e mais esbranquiçada, com o incremento da concentração de 5 para 15 mM CaCl₂, respectivamente, indicando a formação de grandes agregados (HONGSPRABHAS e BARBUT, 1998). De uma forma geral, a dureza dos géis obtidos com CaCl₂ aumentou, possivelmente devido à capacidade dos íons Ca²⁺ em promover interações entre os agregados originalmente existentes no isolado. O aumento no tamanho dos agregados

por efeito dos íons Ca^{2+} levou a diminuição da capacidade de retenção de água dos géis em consequência do aumento da concentração do sal (15 mM CaCl_2).

As diferenças estruturais e de características físico-químicas verificadas entre os IPSs refletiram nas características e propriedades físico-químicas dos géis. Os géis obtidos sem a adição de CaCl_2 dos isolados do grupo II, por exemplo, não foram auto-sustentáveis e mostraram menor dureza quando comparados aos géis obtidos dos isolados do grupo III. Estas diferenças possivelmente resultaram do maior grau de agregação e tamanho das partículas, além das características físico-químicas desses agregados, formados em decorrência do tratamento térmico dos IPSs. No entanto, quando os géis foram obtidos com CaCl_2 , observou-se que os géis dos isolados do grupo II, tornaram-se auto-sustentáveis, embora mais moles, de estrutura mais porosa e aparência mais esbranquiçada que os géis obtidos dos isolados do grupo III. A capacidade de retenção de água dos géis obtidos com a adição de 15 mM CaCl_2 foi diferente entre os IPSs dos grupos II e III, sendo maior nos géis obtidos dos IPSs do grupo III. O aumento no tamanho dos poros dos géis, que promove a expulsão da água, é atribuído aos íons cálcio que, ao diminuírem significativamente a repulsão eletrostática entre os polipeptídeos, favorecem a interação proteína-proteína às expensas das interações proteína-água. O maior efeito dos íons Ca^{2+} na associação entre as moléculas de proteína foi verificado nos IPSs do grupo II, com menor grau de agregação das proteínas.

Todos os géis obtidos apresentaram parâmetros G' e G'' e a $\tan \delta$ característicos de um sólido viscoelástico, sugerindo que houve formação de uma matriz tridimensional estável independente da adição de cálcio. A adição de CaCl_2 resultou no aumento de G' e G'' , provavelmente devido à formação de agregados promovidos pelo Ca^{2+} . Por outro lado, os géis obtidos com 15 mM CaCl_2 apresentaram estrutura menos elástica que a dos géis formados com 0 e 5 mM CaCl_2 . De acordo com Mleko, Glibowski e Janas (2002), o aumento da concentração de CaCl_2 , até uma determinada faixa, aumenta a força do gel com o aumento da elasticidade. Os módulos elástico e viscoso tiveram aumento mais expressivo nos géis induzidos por adição de sal obtidos dos IPSs do grupo II que nos obtidos dos IPSs do grupo III.

Ju e Kilara (1998) mostraram que o aumento da concentração de proteína de 3% para 9%, durante o tratamento térmico prévio das proteínas de soro de leite, teve efeito significativo na dureza dos géis induzidos por adição de CaCl_2 . Estes resultados indicaram que a dureza dos géis induzidos a frio, formados na mesma concentração protéica de soro de leite, dependeu fortemente da concentração de proteína utilizada no aquecimento prévio da solução protéica – etapa de desnaturação. Ainda, segundo os autores, as diferenças na dureza dos géis devem ser atribuídas às diferenças nas propriedades dos agregados protéicos (tamanho e conteúdo de agregados solúveis) induzidos termicamente. Pequenas diferenças no estágio inicial de agregação das moléculas de proteína desnaturadas podem ter um grande efeito na rigidez do gel produzido por adição de sal (McCLEMENTS; KEOGH, 1995). O aumento da dureza também ocorre devido à formação de agregados moleculares pela ação dos íons cálcio (pontes de cálcio) e/ou pela estabilização das uniões não covalentes (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações eletrostáticas), as quais são responsáveis pela formação de uma rede de gel mais forte (CHRONAKIS, 1996). Em relação às proteínas de soro de leite, a concentração de CaCl_2 parece ser o maior determinante no processo de agregação molecular (HONGSPRABHAS; BARBUT, 1998).

A análise de solubilidade dos géis em diferentes meios de extração (AG, TRIS/GLI e T/U-SDS) indicou que os géis obtidos sem a presença de CaCl_2 , para todos os tratamentos, não resultaram em diferentes redes formadoras do gel. Porém, os géis obtidos com adição de CaCl_2 estariam formados por uma rede estabilizada principalmente por ligações não covalentes, sobretudo por interações eletrostáticas (pontes de cálcio). Embora, o CaCl_2 não tenha sido determinante para a formação do gel, os resultados de solubilidade mostraram a importância dos íons cálcio na estruturação da rede de gel. Hongsprabhas e Barbut (1998), analisando géis protéicos de soro de leite induzidos por Ca^{2+} , confirmaram que o processo de formação da rede de gel é conduzido pela concentração de CaCl_2 na geleificação a frio. Variando-se a concentração do sal foram obtidos diferentes mecanismos de geleificação. No mesmo estudo, as forças eletrostáticas mostraram ser mais importantes do que as ligações covalentes para formação da rede.

Os resultados mostraram que os géis formados a frio dos IPSs tratados termicamente apresentaram características macroscópicas diferentes, atribuídas ao tipo de agregado formado na etapa de aquecimento e à quantidade de CaCl_2 adicionada posteriormente. Por sua vez, o tipo de agregado formado na etapa de aquecimento teve influência principalmente da concentração de proteína e de seu grau de desnaturação.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos dos experimentos realizados neste estudo sobre a geleificação a frio das proteínas de soja, pode-se concluir que:

- Os IPSs obtidos em laboratório e tratados termicamente sob diferentes condições (concentração de proteína, temperatura e tempo de aquecimento) apresentaram distintas características estruturais e propriedades físico-químicas, determinadas pelo seu grau de desnaturação e/ou agregação das proteínas, afetadas pelo tamanho, forma, flexibilidade molecular e suas interações com a água. O incremento da temperatura de aquecimento (de 60 para 80°C) e da concentração de proteína (de 3 para 5%), foram os parâmetros que mais influenciaram as características físico-químicas das proteínas modificadas pelo calor.
- As modificações, na presença de CaCl_2 , observadas por DSC, mostraram a influência dos íons cálcio nas características estruturais dos IPSs, e na capacidade de absorção de água assim como na viscosidade aparente dos IPSs tratados. Estes resultados indicaram que a interação estabelecida entre as proteínas dos isolados de soja e o cálcio foi mais efetiva nos isolados com menor grau de agregação molecular.
- O IPS sem tratamento térmico (nativo) e o IPS com menor grau de desnaturação não apresentaram capacidade de geleificação a frio, em nenhuma das condições de obtenção de gel estudada (sem e com a adição de CaCl_2).
- Com os IPSs de maior desnaturação e agregação houve, sem adição de CaCl_2 , formação de géis auto-sustentáveis e mais duros, ao contrário dos géis obtidos dos IPS com menor grau de agregação. O incremento da concentração de CaCl_2 resultou numa estrutura mais rígida, devido à capacidade dos íons cálcio de agregação das proteínas e de formar pontes salinas entre as moléculas de proteína.

- O cálcio não foi determinante para a formação do gel, porém teve um papel importante na sua estruturação. A rede de gel sem a adição de sal foi formada provavelmente pelas interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio, responsáveis pela agregação necessária para a geleificação, enquanto na presença do CaCl_2 a matriz de gel foi estabilizada por interações eletrostáticas (pontes de cálcio), pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.
- Os resultados obtidos, em conjunto, mostraram que as condições utilizadas no tratamento térmico dos isolados de soja obtidos em laboratório promoveram a formação de agregados estáveis que se associaram subsequente e contribuíram para a formação de uma rede de gel induzida a frio. As características macroscópicas dos géis obtidos dos isolados desnaturados pelo calor foram atribuídas às diferenças nas propriedades físico-químicas dos agregados de proteína após o aquecimento, assim como após a adição do CaCl_2 . A manipulação das condições térmicas pode conduzir a formação de agregados e géis com diferentes propriedades.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTING, A. C., JONGH, H. H. J., VISSCHERS, R. W., SIMONS, J. W. F. A. Physical and chemical interactions in cold gelation of food protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 4682-4689, 2002.

ALTING, A. C., HAMER, R. J., De KRUIF, C. G., PAQUES, M., VISSCHERS, R. W. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, N. Carolina, v.17, p. 469-479, 2003.

ALTING, A. C. **Cold gelation of globular protein**. Netherland, Thesis, Wageningen University. 2003.

AÑÓN, M.C., SORGENTINI, D.A., WAGNER, J. R. Relationships between Different Hydration Properties of Commercial and Laboratory Soybean Isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 4852-4858, 2001.

ARGOS, P., NARAYANA, S. V. L. AND NIELSEN, N. C. Structural similarity between legumin and vicilin storage from legumes. **EMBO Journal**, v. 4, p. 1111-1117. 1985.

ARRESE, E. L.; SORGENTINE, D. A.; WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Eletrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 6, p.1029-1032, 1991.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Chemistry**. 16 ed., CUNNIF, P. A., Washington, D. C., A.O.A.C., 1995. v. 2, p. 1-2, 15-16, 21-22.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Chemistry**. 15 ed., CUNNIF, P. A., Washington, D. C., A.O.A.C., 1990. v. 2, p. 1141.

BADLEY, R.A.; ATKINSON, O.; HAUSER, H.; OLDANI, D.; GREEN, J. P.; STUBBS, J. M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 412, p. 214-228. 1975.

BARBUT, S. Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. **Food Research International**, Great Britain, v. 28, p. 437-443, 1995.

BARBUT, S.; FOEGEDING, A. Ca⁺²-induced gelation of pre-heated whey protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 867-871, 1993.

BAUMANN, H. Apparatur nach Baumann zur testimmung der flüssigkeitsaufnahme von pulvigen substanzen. Glas-und instrumenten-technik. **Fachzeitschrift fur das laboratorium**. v.11, p. 540-548. 1967.

BEUSCHEL, B. C., CULBERTSON, J.D., PARTRIDGE, P.A., SMITH, D. M. Gelation and emulsification properties of partially insolubilized whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 3, p. 605-609, 1992.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH and SS groups in some food protein using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 39, p. 49-51, 1974.

BOULET, M.; BRITTEN, M.; LAMARCHE, F. Aggregation of some food proteins in aqueous dispersions: effects of concentration, pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 14, p. 135-144, 2000.

BOURNE, M. C. Texture profile of ripening pears. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 2, n. 1, p. 223-226, 1968.

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 62-66, 1978.

BOWLAND, E. I. And FOEGEDING, E. A. Effects of anions on thermally induced whey protein isolate gels. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 9, p. 47-56, 1995.

BRITTEN, M., GIROUX, H. J. Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 15, p. 609-617, 2001.

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

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

CATSIMPOOLAS N.; CAMPBELL, T. G., MEYER, E. W. Association-dissociation phenomena in glycinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 131, p. 537-586, 1969.

CHEFTEL, J. C., CUQ, J. L., LORIENT, D. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En **Química de los Alimentos**. Director O.R. Fennema, Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. Capítulo 5, p. 275-414, 1993.

CHRONAKIS, I. S. Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions: effect of heat treatment, pH and calcium ions. **Food Research International**, Great Britain, v. 29, n. 2, p.123-134, 1996.

CHRONAKIS, I. S. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain pacifica): thermal transitions, rheological properties and molecular forces involved. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 888-898, 2001.

CLARK, A. H., LEE-TUFNELL, C. D. Gelation of globular proteins. In: Functional properties of food macromolecules. (edited by J.R. Mitchell e D.A. Ledward), p. 203-272. London: Elsevier, 1986.

COCKRAN, W. G., COX, G. M. **Experimental design**. 2 ed. New York: John Wiley, 1957. 611 p.

COONEY, M.J., ROSENBERG, M., SHOEMAKER, C.F. Rheological properties of whey protein concentrate gels. **Journal of Texture Studies**, v. 24, p. 325-334, 1993.

DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. Effect of conglucinin on the thermal aggregation of glicinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, p. 812-817, 1982.

DAMODARAN, S. Refolding of thermally soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 2, p. 262-269, 1988.

DAMODARAN, S. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In **Food Proteins**, Editorial J. E. Kinsella e Soucie, W. G. The American OIL Chemists' Society, Capítulo 3, p. 21-51, 1989.

DAMODARAN, S. Structure-function relationship of food proteins. In HETTIARACHCHY, N. S. And ZIGLIER, G. R. (Eds.), **Proteins Functionality in Food Systems**, Marcel Dekker, New York, p. 1-38, 1994.

DAMODARAN, S. Functional Properties. In: NAKAI, S.; MODLER, H. W. (Ed). **Food Proteins properties and characterization**, New York, Marcel Dekker 1996, 544p.

DAMODARAN, S. Food proteins: An overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed). **Food proteins and their applications**. New York, Marcel Dekker, Inc. 1997. Cap. 1, p. 1-24.

DOI, E. Gels and gelling of globular protein. **Trends in Food Science e Technology**, Oxford, v. 4, p. 1-5, 1993.

DURAND, D. D., GIMEL, J.C., NICOLAI, T. Agregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. **Physica A**, v. 304, p. 253-265, 2002.

ELOFSSON, C.; DEJMEK, P.; PAULSSOM, M.; BURLING, H. Characterization of a cold-gelling whey protein concentrate. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 7, p. 601-608, 1997.

FAMELART, M. H.; CHAPRON, L.; PIOT, M.; BRULÉ, G.; DURIER, C. Hight pressure-induced gel formation of milk and whey concentrates. **Journal of Food Engineering**, Great Britain, v. 36, p.149-164, 1998.

FERRARI, R. A., DEMIATTI, I.M. Isoflavona de soja uma breve revisão. *Biological and Health Sciences*, v.7, n. 7, p. 39-46, 2001.

FOEGEDING, E. A.; DAYTON, W. R., ALLEN, C. E. Interactions of myosin-albumin and myosin-fibrinogen to form protein gels. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 51, p. 109-112, 1986.

FOEGEDING, E. A.; BOWLAND E. L., HARDIN, C.. Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 9, n. 4, p. 237-249, 1995.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P., DOUCET, D., MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 13, p.151-159, 2002.

FUKUSHIMA, D. Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. **Foods and Biotechnology**., v. 8, p. 83-135, 1994.

GARCIA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.37, n.4, p.361-391, 1997.

GARCÍA, M. C.; MARINA, M. L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998.

GERMAN, B., DAMODARAN, S., KINSELLA, J. E. Thermal dissociation and association behavior of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 30, p. 807-811. 1982.

GOSAL, W. S., ROSS-MURPHY, S. B. Globular protein gelation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, p.188-194, 2000.

HAAKE, information. A general introduction to the theory of forced-oscillation. **Proceedings of China-Japan International Conference on Rheology**. V. 92-27E, 1991.

HARDHAM, J. F. The determination of total and reactive sulphhydryl of whey protein concentrates. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, n.227, p. 153-155, 1981.

HARDING, S. E. The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 68, n (2-3), p. 207–262, 1997.

HAYAKAWA, S., NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 486-491, 1985.

HENN, R. L., NETTO, F. M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3009-3015, 1998.

HERMANSSON, A.M. Determination of functional properties of protein foods. In **Proteins in human nutrition**. Editado por Porter, J.W. G. Y Rolls, B.A. London, UK, Academic Press, p. 407-437. 1973.

HERMANSSON, A.M. Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. **Journal Texture Stud.**, Westport, v. 9, p.33-58, 1978.

HERMANSSON, A.M. **Agregation and denaturation involved in gel formation**. In: POUREL, A. (Ed.) **Functionality and protein structure**, Washington: American Chemical Society, 1979, p. 82-103.

HERMANSSON, A.M. Structure of soya glycinin and conglycinin gels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, p. 822-832, 1985.

HERMANSSON, A.M. Soy protein gelation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 63, p.658-666, 1986.

HETTIARACHCHY, N. S., KALAPATHY, U., MYERS, D. J. Alkali-modified soy protein with improved adhesive and hydrophobic properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 72, n. 12, p. 1461-1464, 1995.

HONGSPRABHAS, P., BARBUT, S. Effects of N-ethylmaleimide and CaCl₂ on cold gelation of whey protein isolate. **Food Research International**, Great Britain, v. 30,n. 6, p. 451-455, 1997 a.

HONGSPRABHAS, P., BARBUT, S. Effects of gelation temperature on Ca²⁺ induced gelation of whey protein isolate. **Lebensm-Wiss. Technology**, v. 30, p. 45-49, 1997 b.

HONGSPRABHAS, P., BARBUT, S. Structure-forming processes in Ca⁺²-induced whey protein isolate cold gelation. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 8, 1998.

HORNER, D. S. Formation and structure of acidified milk gels. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 9, p. 261-268, 1999.

HUANG X. L., CATIGNANI, G. L., FOEGEDING, E. A., SWAISGOOD H. E., Comparison of the gelation properties of β -lactoglobulin genetic variants A and B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, p. 1064-1070, 1994.

IWABUCHI, S., SHIBASAKI, K. Immunochemical studies of the effects of ionic strength on thermal denaturation of soybean 7S globulin. **Agriculture Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, p. 1365-1371, 1981.

IWABUCHI, S., WATANABE, H., YAMAUCHI, F. Thermal denaturation of β -conglycinin. Kinetic resolution of reaction mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 27-33, 1991.

JAUREGUI, C. A.; REGENSTEIN, J. M.; BAKER, R. R. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture, a water-binding property of muscle foods. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 46, p. 1271, 1981.

JU, Z. Y., OTTE, J.; ZACORA, M.; QVIST, K. B. Enzyme-induced gelation of whey proteins: effect of protein denaturation. **International Dairy Journal**, Great Britain, v. 7, p. 71-78, 1996.

JU, Z. Y., KILARA, A. Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3604-3608, 1998.

KALAPATHY, U.; HETTIARACHCHY, N. S.; RHEE, K. C. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign v. 74, n. 3, p. 195-199, 1997.

KATO, A., NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of soy proteins. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 624, p. 13-20, 1980.

KATO, A., MATSUDA, T., MATSUDOMI, N., KOBAYASHI, K. Determination of protein hydrophobicity using a sodium dodecyl sulfate binding method. **Journal Agric. Food Chem.**, Washington, v. 32, p. 284-288, 1984.

KILARA, S. D. **Food Proteins. Properties and Characterization**. In NAKAY, S. and MODLER, H. W. eds. New York: VCH Publishers, Weinheim, Cambridge. 1996.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 56, p.242-666258, 1979.

KINSELLA, J. E., PHILLIPS, L. **Structure-function relationships in food proteins, film, and foaming behavior**. In: Food Proteins, Edited by KINSELLA, J., Soucie, W., Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, Cap. 4, p. 52-77, 1989.

KNORR, D. **Process assessment of high pressure processing of foods: an overview.** In: OLIVEIRA, F. A. R. and OLIVEIRA, J. C., Processing Foods, eds, 1999.

KUIPERS, B. J. H., KONINGSVELD, G. A. V., ALTING, A. C., DRIEHUIS, F., GRUPPEN, H., VORAGEN, A. G. J. Enzymatic hydrolysis as means of expanding the cold gelation conditions of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1031-1038, 2005.

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

LAKEMON, C. M. M., JONGH, H. J. PAQUES, M., VLIET, T. V., GRUPPEN, H., VORAGEN, A. G. J. Gelation of soy glycinin; influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 17, p. 365-377, 2003.

LAKEMON, C. M. M., JONGH, H. H. J. HESSING, M., GRUPPEN, H., VORAGEN, A. G. J. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 6, p. 1985-1990, 2000.

LALLIGANT, A., DUMAY, E., CASAS VALENCIA, C., CUQ, J. L., CHEFTEL, J. C. Surface hydrophobicity and aggregation of β -lactoglobulin heated near neutral pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 12, p. 2147-2155, 1991.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization.** New York: Chapman and Hall, 1997, 532 p.

LUSAS, E. W., RHEE, K. Ch. Soy proteins processing and utilization. **In practical handbook of soybean processing and utilization**; editado por Erickson, D.R. AOCS Press y The United Soybean Board, St. Louis, MO. Capítulo 7, pp 117-160, 1995.

MALTAIS, A., REMONDETTO, G. E., GONZALES, R., SUBIRADE, M. Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects. **Journal of food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 67-73, 2005.

MANGINO, M. E. Gelation of whey protein concentrate. **Food Technology**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 114-115, 1992.

MARANGONI, A. G., BARBUT, S., McGAULEY, S. E., MARCONE, M., NARINE, S. S. On the structure of particulate gels-the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 14, p. 61-74, 2000.

MATA, L. SÁNCHEZ, L. HEADON, D.R., CALVO, M. Thermal denaturation of human lactoferrin and its effects on the ability to bind iron. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3964-3970. 1998.

McCLEMENTS, D. J.; KEOGH, M. K. Physical properties of cold-setting gels formed from heat-denatured whey protein isolate. **Journal of the Science and Food Agriculture**, London, v. 69, p. 7-14, 1995.

MLEKO, S.; GLIBOWSKI, P.; GUSTAW, W.; JANAS, P. Calcium ions induced gelation of double-heated whey protein isolate. **Journal of Food Science and Technology**. v.39, n. 5, p. 563-565. 2002

MOLINA, M. I., WAGNER, J. R. The effects of divalent cations in the presence of phosphate, citrate and chloride on the aggregation of soy protein isolate. **Food Research International**, Great Britain, v. 32, p.135-143, 1999.

MOLINA, E., DEFAYE, A. B., LEDWARD, D.A. Soy protein pressure-induced gels. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 16, p. 625-632, 2002.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

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

MULVIHILL, D. M., KINSELLA, J. E. Gelation of β -lactoglobulin: effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, p. 231-236, 1988.

MURRAY, E. D.; ARNTFIELD, S. D.; ISMOND, M. A. H. The influence of processing parameters on food protein functionality II. Factors affecting thermal properties as analyzed by differential scanning calorimetry. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 18(2), p. 158-162. 1985.

NAKAI, S., LI-CHAN, E., ARTEAGA, G.E. **Methods of testing protein functionality: Measurement of surface hydrophobicity**, 1. ed. London: Ed. G. M. Hall, 1996. 265p.

NAKAMURA, T.; UTSUMI, S.; MORI, T. Effects of temperature on the different stages in thermal gelling of glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, p. 1201-1203, 1985.

OOMAH, B. D.; C.; VOLDENG, H.; FREGEAU-REID, J. A. Characterization of soybean proteins by HPLC. **Plant Food for Human Nutrition**, The Netherlands, v. 45, p. 251-263, 1994.

PETTRUCCELLI, S., AÑÓN, M. C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1 Structural and hydration properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, p. 2161-2169, 1994.

PETTRUCCELLI, S., AÑÓN, M. C. Soy protein isolate components and their interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1762-1767, 1995.

PETTRUCCELLI, S., AÑÓN, M. C. Partial Reduction of Soy Protein Isolate Disulfide Bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 2001-2006, 1995.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. **Structure-function properties of food proteins**. London: Academic Press Limited, 1994, 664 p.

PILOSOFF, A. M. R. Propiedades de hidratación. In Pilosoff, A.M.R. y Bartholomai, G. B. (eds.) **Caracterización funcional y estructural de proteínas**. Buenos Aires, Argentina: Eudeba CYTED, cap. 1, p. 17-28, 2000.

PONS, M., FISZMAN, S. M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, Connecticut, v. 27, p. 597-624, 1996.

PUPPO, M. C. **Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido**. La Plata, 1997. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

PUPPO, M. C., LUPANO, C. E., AÑÓN, M.C. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of ph and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 2353-2361, 1995.

PUPPO, M. C., AÑÓN, M. C. Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strenght and pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3583-3589, 1998.

PUPPO, M. C., AÑÓN, M. C. Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybean protein gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3039-3046, 1998.

PUPPO, M. C., AÑÓN, M. C. Rheological properties of acidic soybean protein gels: Salt addition effect. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 167-176, 1999.

PUPPO, M. C., AÑÓN, M. C. Soybean protein dispersions at acidic ph. Thermal and rheological properties. **Journal of Food Science**, v. 64(1) p. 50-56. 1999.

PUPPO, M. C., SORGENTINI, D. A., AÑÓN, M. C. Rheological study of dispersions prepared with modified soybean protein isolates. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 77, p.003-011, 2000.

RENARD, D., VELDE, F., VISSCHERS, R. W. The gap between food gel structure, texture and perception. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 20, p.423-431, 2006.

RENKEMA, J. M. S., LAKEMOND, C. M. M.; JOUGH, H. H. J.; GRUPPEN, H.; VLIET, T. V. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 79, p. 223-230, 2000.

RENKEMA, J. M. S.; GRUPPEN, H.; VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy proteins gels and in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 6064-6071, 2002.

RENKEMA, J. M. S., KNABBEN, J.H.M., VLIET, T. Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 15, p.407-414, 2001.

RENKEMA, J. M. S.; VLIET, T. Heat-induced gel formation by soy proteins at neutral pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 1569-1573, 2002.

RENKEMA, J. M. S. Relations between rheological properties and network structure of soy proteins gels. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 18, p.39-47, 2004.

RHA, C. K.; PRADIPASENA, P. **Viscosity of proteins**. In Functional properties of food macromolecules; editado por Mitchell, J. R. E Ledward, K. A. Essex, UK: Applied Science Barking. Cap. 2, p. 79-120. 1986.

RODRIGUEZ, M. I. G. **Influência da qualidade da matéria prima nas propriedades funcionais dos isolados protéicos de soja**. São Paulo, 1991. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 1991

ROFF, C. F., FOEGEDING, E. A. Dicationic-induced gelation of pre-denatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, North Carolina, v. 10, p.193-198, 1996.

ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterixation of gels. **Journal of texture studies**, v. 26. p. 392-400. 1995.

SAIO, K., KAJIKAWA, M., WATANABE, T. Food processing characteristics of soybean proteins. Part II. Effect to sulphhydryl groups on physical properties of tofu-gel. **Agriculture Biological Chemistry**, Tokyo, v. 35, p. 890-898, 1971.

SAIO, K.; NIKKUNI, I.; ANDO, Y.; OTSURU, M.; TERAUCHI, Y.; KITO, M. Soybean quality changes during model storage studies. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.57, n. 2, p. 77-82, 1980.

SCILINGO, A. **Propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de soja modificados. Efecto de la presencia de calcio**. La Plata, 2000. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

SGABIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Brasil, v. 32, n. 1, p. 105-126, 1998.

SHIMADA, K., CHEFTEL, J.C. Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, p. 147-153, 1988.

SHIMADA, K., MATSUSHITA, S. Relationship between thermocoagulation and amino acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, p. 413-417, 1980.

SORGENTINI, D. A., WAGNER, J. R., AÑÓN, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 2471-2479, 1991.

SORGENTINI, D. A., WAGNER, J. R., AÑÓN, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 2471-2479, 1995.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Freeman Press, East Lansing: p. 1-93, 1996.

TANG, S., MA, Y., SHIU, C. Modelling the mechanical strength of fractal aggregates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering**, v. 180, p.7-16, 2001.

TANG, C., CHOI, S., MA, C. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 96-104, 2007

TOTOSAUS, A., MONTEJANO, J. G., SALAZAR, J. A., GUERREIRO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food and Technology**. Chester, v. 37, p. 589-601, 2002.

UTSUMI, S., DAMODARAN, S., KINSELLA, J.E. Induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and β -subunits of 7S. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 32, p. 1406-1412, 1984.

UTSUMI, S., KINSELLA, J.E. Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. **Journal of Food Science**, v. 50 p. 1278-1282. 1985.

VARDHANABHUTI, B., FOEGEDING, E. A. Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 3649-3655, 1999.

VARDHANABHUTI, B., FOEGEDING E. A., MCGUFFEY, M. K., DAUBERT, C. R., SWAISGOOD, H. E. Gelation properties of dispersions containing polymerized and native whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, N. Carolina, v. 15, p.165-175, 2001.

VISSER, A., THOMAS, A. Review: Soya protein products-their processing, functionality, and application aspects. **Food Review International**, v. 3, p. 1-32, 1987.

VOJDANI, F. Solubility. Methods of testing protein functionality; editado por G.M. Hall, Chapman e Hall, London, UK. Capítulo 2, pp. 11-60. 1996.

WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 3, p. 765-770, 1990.

WAGNER, J. R., SORGENTINI, D. A., AÑÓN, M. C. Effect of physical and chemical factors on rheological behavior of commercial soy protein isolates: protein concentration, water imbibing capacity, salt addition and thermal treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 1930-1936, 1992.

WAGNER, J. R., SORGENTINI, D. A., AÑÓN, M. C. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid treated soy isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 1881-1889. 1996.

WAGNER, J. R., SORGENTINI, D. A., AÑÓN, M. C. Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3159-3165, 2000.

WAGNER, J. R. Propiedades superficiales. In: PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. (EGS). **Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas**. Buenos Aires: Eudeba, 2000. Cap. 3, p. 41-47.

WANG, H., DAMODARAN, S. Thermal gelation of globular protein: weight-average molecular weight dependence of gel strength. **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, p. 1157-1164, 1990.

WILSON, L. A. Soy foods. In **Practical handbook of soybean processing and utilization**; edited by Erickson, D.R. Am. Oil Chem.Soc. Press e The United Soybean Board, St Louis, MO. Cap. 22, p. 428-459, 1995.

WOLF, J. W. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 18, p. 969-975, 1970.

WOLF, J. W, COWAN, J, C. **Soybean as food source uses of soybean protein**. Ed. Revisada. Cleveland: CRC Press, INC, 1975, 101p.

WOLF, J. W. Sulphydryl content of glicinin: effect of reducing agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, p. 168-176, 1993.

WOLF, J. W., NELSEN, T. C. Partial purification and characterization of the 15S globulin of soybeans, a dimer of glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 785-791, 1996.

YAMAGISHI, T., MIYAKAWA, A., NODA, N., YAMAUCHI, F. Isolation and electrophoretic analysis of heat-induced products of mixed soybean 7S and 11S globulins. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1229-1237, 1983.

YAMAUCHI, T., YAMAUCHI, F., SHIBASAKI, K. Electrophoretic and differential thermal analysis of soybean 11s globulin heated in the presence of N-ethylmaleimide. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 7, p. 1661-1668, 1981.

YAMAUCHI, F., SATO, K., SATO, W., KAMATA, Y. SHIBASAKI, K. Isolation and identification of a new type of β -conglycinin in soybean globulins. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, p. 2863-2868, 1981.

YAMAUCHI, F., YAMAGISHI, T. Y IWABUSHI, S. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. **Food Review International**, V.7, p. 283-322. 1991.

YANG, J., DUNKER, K., POWERS, J., CLARKS, S., SWANSON, G. β -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 3236-3243, 2001.

YAO, J.J., WEI, L.S., STEINBERG, M.P. Water Imbibing capacity and rheological properties of isolated soy proteins. **Journal of Food Science**, v. 53(2), p. 464-467, 1988.

YAO, J. J.; TANTEERATARM, T.; WEI, L. S. Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolates soy proteins. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. Champaign, v. 67(12), p. 974-979, 1990.

YUAN, Y. J., VELEY, O. D., CHEN, K., CAMPBELL, B. E., KALER, E. W., LENHOFF, A. M. Effect of pH and Ca^{2+} -induced associations of soybean proteins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 4953-4958, 2002.