

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**EFEITOS DO PROCESSAMENTO À ALTA PRESSÃO NAS
PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA PROTEÍNA DE SOJA E SUAS
MISTURAS COM POLISSACARÍDEOS**

RENATA TORREZAN
Engenheira de Alimentos
Mestre em Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. MARCELO CRISTIANINI
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, SP.
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

T636e Torrezan, Renata
 Efeito do processamento à alta pressão nas propriedades
funcionais da proteína de soja e suas misturas com
polissacarídeos / Renata Torrezan. – Campinas, SP: [s.n.],
2007.

Orientador: Marcelo Cristianini
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas de soja. 2. Pectina. 3. Kappa-Carragena.
4. Pressão alta (Tecnologia). I. Cristianini, Marcelo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: Effects of high pressure on functional properties of soy protein
alone and mixed with polysaccharides

Palavras-chave em inglês (Keywords): Soy protein isolate, Pectin, Kappa-Carrageenan,
High pressure (Technology)

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Cristianini

Valdomiro Carlos Sgarbieri

Flávia Maria Netto

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Alfredo de Almeida Vitali

Amauri Rosenthal

Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

RENATA TORREZAN

EFEITOS DO PROCESSAMENTO À ALTA PRESSÃO NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA PROTEÍNA DE SOJA E SUAS MISTURAS COM POLISSACARÍDEOS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: _____

Campinas, 13 de Fevereiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Orientador

Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri
Membro

Profa. Dra. Flávia Maria Netto
Membro

Pesquisadora Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Membro

Pesquisador Dr. Alfredo de Almeida Vitali
Membro

Pesquisador Dr. Amauri Rosenthal
Membro

Lembre-se da minha ordem: "Seja forte e corajoso! Não fique desanimado nem tenha medo porque eu, o Eterno, o seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!"

Josué 1:9

Ao meu amado Deus, Eterno Senhor, força minha e amigo fiel de todas as horas; a Ele, somente, toda a honra e glória.

Aos meus amores eternos: pais: Antonieta e Décio; irmãs: Denise, Bernadete e Fernanda; e sobrinhos: Virgínia, Jônatas, Tiago e Daniel, com carinho e profunda gratidão.

À memória dos meus queridos avós Victória e Sebastião, Theodolinda e César e aos meus queridos tios das famílias Godoy Moreira e Torresan, cujo carinho e estímulo sempre me fizeram prosseguir.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e em especial à Embrapa Agroindústria de Alimentos, por todo o suporte financeiro e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Cristianini, pela orientação, confiança e comprometimento na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Richard A. Frazier pela orientação, atenção e incentivo durante o meu período de trabalho na Inglaterra e todo o acompanhamento posterior.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri, Profa. Dra. Flávia Maria Netto, Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Dr. Alfredo de Almeida Vitali e Dr. Amauri Rosenthal pelas valiosas sugestões, colaboração e correções da tese.

Ao conselheiro acadêmico e amigo Dr. Amauri Rosenthal pelo apoio, acompanhamento e incentivo.

À Universidade de Reading em especial ao Departamento de Alimentos pela facilidade concedida para a viabilização deste trabalho e todo o suporte oferecido.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e seus funcionários por toda a ajuda e suporte.

A Capes (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Educação) pela concessão de bolsa durante um ano de estágio no exterior (The University of Reading, Reino Unido) viabilizando assim grande parte deste trabalho.

Ao Dr. Alfredo de Almeida Vitali pelo auxílio técnico em momentos difíceis deste trabalho e pela inspiração e exemplo de comprometimento técnico.

À Eliana M. Pettrossi Motta, Dra. Sônia de Souza, Adriana Muniz (DEPAN), Dra. Judite e José Roberto (DTA) pelo eficiente apoio técnico, ajuda, orientações e incentivo, imprescindíveis na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Allan E. Bell pela orientação nas análises reológicas e toda a atenção dispensada.

Ao Eng. Whye Pin Tham pela realização das análises cromatográficas e de eletroforese das amostras do processamento isostático que compõem este trabalho.

À Dra. Renata M. dos Santos Celeghini, do Laboratório de Apoio Instrumentação (DTA), pela amizade, empréstimo de equipamentos e orientação das análises cromatográficas das amostras do processamento dinâmico.

Ao Laboratório de Bioquímica Nutricional (DEPAN), em especial à Profa. Dra. Flávia Maria Netto e Eliana M. Pettirossi Motta pelas facilidades concedidas, apoio técnico e realização das análises de eletroforese das amostras do processamento dinâmico que compõem este trabalho.

Ao Laboratório de Frutas em especial ao Prof. Dr. Flávio Schmidt, Ana, Priscila e Adauto pelas facilidades concedidas para a liofilização da proteína de soja e suporte técnico.

Ao Sr. Luiz B. Pompeo Neto e Prof. Dr. Denis J. Schiozer do Laboratório de Engenharia de Petróleo da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp pela colaboração nas análises reológicas das amostras do processamento dinâmico.

À Profa. Dra. Lireny A. Gonçalves, Dr. Renato Grimaldi e Miluska do Laboratório de Óleos (DTA) pelas facilidades concedidas para a execução das análises de DSC das amostras do processamento dinâmico.

Ao Laboratório de Higiene (DTA) e Laboratório Geral do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA/DEPAN) pelo empréstimo da centrífuga.

Ao Mark, Aline, Claudia Pinho e Michele pelo apoio técnico e colaboração.

À Embrapa Informática Agropecuária em especial ao Dr. Jardine, Aparecido, Helenice e Marta pela amizade e facilidades concedidas.

À Empresa CP Kelco pela doação das amostras de pectina e κ -carragena utilizadas neste estudo.

A todos os meus queridos e inumeráveis amigos de fé, Unicamp, Universidade de Reading e Embrapa, sempre presentes e que fazem a minha vida melhor, agradeço todas as orações, amizade, incentivo e carinho. Em especial agradeço Andrea Barreto, Alaíse, Cida Vieira, Vergílio, Davi, Juliana, Beth, Verity, Edward, Yemisi, Bridget, Rosamond, Haíssa, Jenny, Ken, Janet, Martin, Vione, Caroline, Ana Rodriguez, Kob, Wongs, Telmo, Murillo, Lourdes, Marcos, Virgínia, João, Silvana, Isaías, Maristela, Cristina, Fátima Borges, Deyse, Carol, Eduardo, Janai, Guilherme, Marcelo Pedras, Elen Lacerda, Carlos, Rosa, Denize e Sayonara.

Aos irmãos da Igreja do Nazareno de Campinas, em especial aos Pastores Joel, Edson Cordeiro, André e Alex e “St. Saviours” de Reading que me acolheram com carinho e sempre me sustentaram em oração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

2.2.5. Métodos analíticos.....	52
2.2.5.1. Solubilidade proteica em água.....	53
2.2.5.2. Índice de Atividade Emulsificante.....	54
2.2.5.3. Análises reológicas.....	56
2.2.5.4. Determinação do conteúdo de sulfidrina livre.....	57
2.2.5.5. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).....	57
2.2.5.6. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)...	58
2.2.5.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	58
2.2.5.8. Microscopia eletrônica de varredura.....	59
3. Resultados e Discussão.....	60
3.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS), produção do isolado proteico de soja (IPS) e sua caracterização.....	60
3.2. Ensaio experimentais.....	63
3.2.1. Solubilidade proteica.....	66
3.2.2. Índice de Atividade Emulsificante (IAE).....	71
3.2.3. Medidas reológicas.....	76
3.2.4. Resultados das análises específicas das amostras selecionadas.....	82
3.2.4.1. Conteúdo de sulfidrina livre.....	82
3.2.4.2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).....	84
3.2.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.(CLAE-FR).....	87
3.2.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	91
3.2.4.5. Microestrutura das amostras selecionadas.....	95
4. Conclusão.....	99
5. Agradecimento.....	100
6. Referências Bibliográficas.....	100
Capítulo 3 :Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre as propriedades funcionais tecnológicas das misturas proteína de soja – polissacarídeos.	107
Resumo.....	107
Summary.....	108
1. Introdução.....	109
2. Material e Métodos.....	111
2.1. Material.....	111
2.1.1. Isolado proteico de soja.....	111
2.1.2. Polissacarídeos.....	112
2.1.3. Reagentes.....	112
2.2. Métodos.....	112
2.2.1. Preparo das amostras.....	112

2.2.2. Tratamento sob alta pressão.....	112
2.2.3. Análise estatística.....	113
2.2.4. Métodos analíticos.....	115
2.2.4.1. Solubilidade proteica em água.....	116
2.2.4.2. Índice de Atividade Emulsificante.....	116
2.2.4.3. Análises reológicas.....	117
2.2.4.4. Determinação do conteúdo de sulfidril livre.....	118
2.2.4.5. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).....	118
2.2.4.6. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)...	119
2.2.4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	119
2.2.5.8. Microscopia eletrônica de varredura.....	120
3. Resultados e Discussão.....	121
3.1. Ensaio experimentais.....	121
3.1.1. Delineamentos Fracionários.....	121
3.1.2. Delineamentos Completos.....	127
3.1.2.1. Experimento III.....	127
3.1.2.2. Experimento IV.....	140
3.2. Resultados das análises específicas das amostras selecionadas.....	149
3.2.1. Conteúdo de sulfidril livre.....	150
3.2.2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).....	152
3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	155
3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	159
3.2.5. Microestrutura das amostras selecionadas.....	163
4. Conclusão.....	167
5. Agradecimento.....	168
6. Referências Bibliográficas.....	168
Capítulo 4: Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre os fatores antinutricionais das proteínas de soja.....	175
Resumo.....	175
Summary.....	175
1. Introdução.....	176
2. Material e Métodos.....	177
2.1. Material.....	177
2.1.1. Isolado proteico de soja.....	177
2.1.2. Reagentes.....	178
2.2. Métodos.....	178
2.2.1. Preparo das amostras.....	178
2.2.2. Tratamento sob alta pressão.....	178

2.2.3. Análise estatística.....	179
2.2.4. Métodos analíticos.....	179
2.2.4.1. Teor de fitato.....	179
2.2.4.2. Atividade de inibidor de tripsina.....	180
3. Resultados e Discussão.....	180
3.1. Teor de fitato.....	180
3.2. Inibidor de tripsina.....	181
4. Conclusão.....	182
5. Agradecimento.....	182
6. Referências Bibliográficas.....	183
Capítulo 5: Efeito do tratamento sob alta pressão dinâmica sobre as propriedades funcionais tecnológicas da proteína de soja.....	187
Resumo.....	187
Summary.....	188
1. Introdução.....	189
2. Material e Métodos.....	191
2.1. Material.....	191
2.1.1. Isolado proteico de soja.....	191
2.1.2. Reagentes.....	191
2.2. Métodos.....	192
2.2.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS) e do isolado proteico de soja (IPS).....	192
2.2.2. Preparo das amostras.....	192
2.2.3. Tratamento sob alta pressão.....	192
2.2.4. Análise estatística.....	194
2.2.5. Métodos analíticos.....	195
2.2.5.1. Solubilidade proteica em água.....	197
2.2.5.2. Índice de Atividade Emulsificante.....	197
2.2.5.3. Determinação do conteúdo de sulfidril livre.....	197
2.2.5.4. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).....	198
2.2.5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)...	198
2.2.5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	199
2.2.5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	200
3. Resultados e Discussão.....	200
3.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS), produção do isolado proteico de soja (IPS) e sua caracterização.....	200
3.2. Ensaio experimentais.....	203

3.2.1. Solubilidade proteica.....	203
3.2.2. Índice de Atividade Emulsificante (IAE).....	210
3.2.3. Resultados das análises específicas das amostras selecionadas.....	216
3.2.3.1. Conteúdo de sulfidril livre.....	216
3.2.3.2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).....	218
3.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	221
3.2.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	225
3.2.3.5. Microestrutura das amostras selecionadas.....	228
4. Conclusão.....	233
5. Referências Bibliográficas.....	234
CONCLUSÃO GERAL.....	241
ANEXO A	245
ANEXO B.....	261
ANEXO C.....	265
ANEXO D.....	269

LISTA DAS TABELAS

	PÁGINA
CAPÍTULO 2	
TABELA 2.1 Delineamento Experimental Fatorial Completo (2^3) para o sistema contendo isolado proteico de soja, processado sob alta pressão isostática.	52
TABELA 2.2 Amostras selecionadas a partir dos experimentos completos I e II para a execução das análises de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese, análises cromatográficas e microscopia eletrônica de varredura.	53
TABELA 2.3 Preparo do isolado proteico de soja.	61
TABELA 2.4 Composição centesimal média da farinha desengordurada de soja e do isolado proteico de soja.	62
TABELA 2.5 Comparação entre os métodos de determinação de proteína solúvel.	63
TABELA 2.6 Resultados do Experimento I (Delineamento Composto Central).	64
TABELA 2.7 Resultados do Experimento II (Delineamento Composto Central).	65
TABELA 2.8 Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	68
TABELA 2.9 Análise de variância (ANOVA) do Experimento I do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	68
TABELA 2.10 Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	69
TABELA 2.11 Análise de variância (ANOVA) do Experimento II do modelo estatisticamente válido (erro puro) para a resposta solubilidade proteica.	70
TABELA 2.12 Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).	73
TABELA 2.13 Análise de variância (Anova) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento I.	73
TABELA 2.14 Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).	75
TABELA 2.15 Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento II.	75
TABELA 2.16 Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta G”.	80

TABELA 2.17	Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta G'' para o Experimento I.	80
TABELA 2.18	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta G''.	81
TABELA 2.19	Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta G'' para o Experimento II.	81
TABELA 2.20	Conteúdo de sulfidril livre (μ moles/ g de proteína) do IPS e das amostras selecionadas dos delineamentos completos, antes e após a pressurização.	83
TABELA 2.21	Temperatura (Td) e entalpia (Δ H) de desnaturação das amostras selecionadas antes e depois do tratamento sob alta pressão.	86

CAPÍTULO 3

TABELA 3.1	Delineamento Experimental Fatorial Fracionário (2^{4-1}) para os sistemas proteína-polissacarídeo (pectina ou κ -carragena).	114
TABELA 3.2	Delineamento Experimental Fatorial Completo (2^3) para o sistema modelo contendo concentração fixa de isolado proteico de soja (1%) e polissacarídeo (pectina ou κ -carragena).	114
TABELA 3.3	Amostras selecionadas a partir dos delineamentos completos III e IV para a execução das análises de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, análises cromatográficas, eletroforese e microscopia eletrônica de varredura.	116
TABELA 3.4	Resultados do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}).	122
TABELA 3.5	Efeitos principais do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta solubilidade proteica.	122
TABELA 3.6	Efeitos principais do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).	123
TABELA 3.7	Efeitos principais do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta G''.	124
TABELA 3.8	Resultados do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}).	125
TABELA 3.9	Efeitos principais do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta solubilidade proteica.	126
TABELA 3.10	Efeitos principais do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta Índice de Atividade Emulsificante.	127
TABELA 3.11	Efeitos principais do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta G''.	127
TABELA 3.12	Resultados do Experimento III (Delineamento Composto Central).	129
TABELA 3.13	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento III) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	131

TABELA 3.14	Análise de variância (ANOVA) do Experimento III do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	131
TABELA 3.15	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento III) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).	135
TABELA 3.16	Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento III.	135
TABELA 3.17	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento III) calculados pelo erro puro para a resposta G”.	139
TABELA 3.18	Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta G” para o Experimento III.	139
TABELA 3.19	Resultados do Experimento IV (Delineamento Composto Central).	141
TABELA 3.20	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento IV) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	143
TABELA 3.21	Análise de variância (ANOVA) do Experimento IV do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	143
TABELA 3.22	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento IV) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante.	147
TABELA 3.23	Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (Experimento IV).	147
TABELA 3.24	Análise dos efeitos para a resposta G” do Delineamento Composto Central Rotacional (Experimento IV).	149
TABELA 3.25	Conteúdo de sulfidril livre (μ moles/g de proteína) do IPS e das amostras selecionadas dos delineamentos completos, antes e após a pressurização.	152
TABELA 3.26	Temperatura (Td) e entalpia (Δ H) de desnaturação das amostras selecionadas antes e depois do tratamento sob alta pressão.	155

CAPÍTULO 4

TABELA 4.1	Conteúdo de fitato (mg/g de proteína) em amostras de isolado proteico de soja (IPS) original e amostras de IPS tratadas sob alta pressão isostática (200 a 700 MPa), por 20 minutos, à temperatura ambiente.	181
TABELA 4.2	Conteúdo de Inibidor de Tripsina (UTI/mg de proteína) das amostras com isolado proteico de soja (IPS) e IPS tratados sob alta pressão isostática (200 a 700 MPa), por 20 minutos, à temperatura ambiente.	182

CAPÍTULO 5

TABELA 5.1	Delineamento Experimental Fatorial Completo (2^2) para o sistema contendo 1% de isolado proteico de soja, processado sob alta pressão dinâmica.	195
TABELA 5.2	Amostras selecionadas a partir dos experimentos completos I e II para a execução das análises de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese, análises cromatográficas e microscopia eletrônica de varredura.	196
TABELA 5.3	Preparo do isolado proteico de soja.	201
TABELA 5.4	Composição centesimal média da farinha desengordurada de soja e do isolado proteico de soja.	201
TABELA 5.5	Comparação entre os métodos de determinação de proteína solúvel.	203
TABELA 5.6	Resultados do Experimento I (Delineamento Composto Central).	204
TABELA 5.7	Resultados do Experimento II (Delineamento Composto Central).	205
TABELA 5.8	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	208
TABELA 5.9	Análise de variância (ANOVA) do Experimento I do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	208
TABELA 5.10	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.	209
TABELA 5.11	Análise de variância (ANOVA) do Experimento II do modelo estatisticamente válido (erro puro) para a resposta solubilidade proteica.	209
TABELA 5.12	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).	213
TABELA 5.13	Análise de variância (Anova) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento I.	213
TABELA 5.14	Coefficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).	215
TABELA 5.15	Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento II.	215
TABELA 5.16	Conteúdo de sulfidril livre (μ moles/ g de proteína) do IPS e das amostras selecionadas dos delineamentos completos, antes e após o tratamento sob alta pressão dinâmica.	217
TABELA 5.17	Temperatura (T_d) e entalpia (ΔH) de desnaturação das amostras selecionadas antes e depois do tratamento sob alta pressão.	220

ANEXO A

TABELA A1	Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento I do Capítulo 2.	247
TABELA A2	Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento II do Capítulo 2.	248
TABELA A3	Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento I do Capítulo 3.	249
TABELA A4	Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento II do Capítulo 3.	250
TABELA A5	Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento III do Capítulo 3.	251
TABELA A6	Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento IV do Capítulo 3.	252
TABELA A7	Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 2) e Experimentos III e IV (Capítulo 3) - 1º lote - – para as análises de teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese e cromatografia.	253
TABELA A8	Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 2) e Experimentos III e IV (Capítulo 3) - 2º lote – para as análises de teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese e cromatografia.	254
TABELA A9	Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 2) e Experimentos III e IV (Capítulo 3) - 3º lote – para as análises de microscopia eletrônica de varredura.	255
TABELA A10	Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para a execução das análises de teor de fitato e de inibidor de tripsina (Capítulo 4).	256
TABELA A11	Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para o Experimento I do Capítulo 5.	257
TABELA A12	Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para o Experimento II do Capítulo 5.	258
TABELA A13	Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 5) - 1º lote – para as análises de teor de sulfidril livre e eletroforese.	259
TABELA A14	Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II do Capítulo 5 - 2º lote – para as análises de calorimetria diferencial de varredura, microscopia eletrônica de varredura e cromatografia.	260

ANEXO B

TABELA B1	Dados levantados para a construção de curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA utilizada nos Experimentos sob alta pressão isostática (Capítulos 2 e 3).	263
TABELA B2	Dados levantados para a construção de curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA, utilizada nos Experimentos sob alta pressão dinâmica (Capítulo 5).	264

ANEXO C

TABELA C1	Levantamento da curva de calibração de fitato.	267
-----------	--	-----

LISTA DAS FIGURAS

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1.1	Curva de solubilidade da proteína de soja em função do pH. 10
FIGURA 1.2	Ilustração de cadeia de pectina. 21
FIGURA 1.3	Estruturas da carragena: (a) κ -carragena; (b) ι -carragena e (c) λ -carragena. 22
CAPÍTULO 2	
FIGURA 2.1	Fluxograma de produção do isolado proteico de soja. 49
FIGURA 2.2	Superfícies de resposta para a solubilidade proteica em função das variáveis pH e concentração de IPS (a e c) e pH e alta pressão (b e d) para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d). 67
FIGURA 2.3	Superfícies de resposta para o IAE em função das variáveis pH e concentração de IPS (a e c) e pH e alta pressão (b e d) para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d). 72
FIGURA 2.4	Módulos G' (linhas tracejadas) e G'' (linhas cheias) em função da frequência para amostras selecionadas (a) Experimento I (Ensaio 3= 1% de IPS, pH=4,00, 300 MPa; Ensaio 11= 2% de IPS, pH=2,66, 450 MPa; Ensaio 14= 2% IPS, pH=3,50, 702 MPa. e (b) Experimento II (Ensaio 5= 1% de IPS, pH=5,50, 600 MPa; Ensaio 9= 0,32% de IPS, pH=6,00, 450 MPa; Ensaio 12= 2% IPS, pH=6,84, 450 MPa). 77
FIGURA 2.5	Superfícies de resposta para G'' em função das variáveis pH e concentração de IPS (a e c) e pH e alta pressão (b e d) para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d). 78
FIGURA 2.6	Cromatogramas de CLAE-FR do isolado proteico de soja original (pH=6,60), mostrando os picos mais bem definidos 1, 2 e 3. 88
FIGURA 2.7	Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento I. 89
FIGURA 2.8	Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento II. 90
FIGURA 2.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras selecionadas dos Experimentos I e II, antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo (1) número do ensaio; (2) concentração de IPS (%); (3) pH da amostra e (4) nível de pressão aplicada. 93
FIGURA 2.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE), em condições redutoras das amostras selecionadas dos Experimentos I e II antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo MC=marcadores de peso molecular comercial, (1) número do ensaio; (2) concentração de IPS (%); (3) pH da amostra e (4) nível de pressão aplicada. 94
FIGURA 2.11	Microestrutura do IPS original liofilizado (pH=6,6), sem tratamento, com aumento de 540 vezes 96

FIGURA 2.12	Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento I, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 3 (1% IPS, pH=4,0); (b) Ensaio 3 (1% IPS, pH=4,0, 300 MPa); (c) Ensaio 11 (2% IPS, pH=2,66) e (d) Ensaio 11 (2% IPS, pH=2,66, 450 MPa); (e) Ensaio 14 (2% IPS, pH=3,5) e (f) Ensaio 14 (2% IPS, pH=3,5, 702 MPa).	97
FIGURA 2.13	Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento II, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 5 (1% IPS, pH=5,50); (b) Ensaio 5 (1% IPS, pH=5,50, 600 MPa); (c) Ensaio 9 (0,32% IPS, pH=6,00) e (d) Ensaio 9 (0,32% IPS, pH=6,00, 450 MPa); (e) Ensaio 12 (2% IPS, pH=6,84) e (f) Ensaio 12 (2% IPS, pH=6,84, 450 MPa).	98
 CAPÍTULO 3		
FIGURA 3.1	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a solubilidade proteica em função das variáveis pH e concentração de pectina (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento III.	130
FIGURA 3.2	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta IAE em função das variáveis pH e concentração de pectina (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento III.	134
FIGURA 3.3	Módulos G' (linhas tracejadas) e G'' (linhas cheias) em função da frequência para as amostras selecionadas do Experimento III com 1% de IPS, sendo: Ensaio 5 (0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00 e Pressão=600 MPa); Ensaio 8 (0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00 e Pressão=600 MPa); Ensaio 14 (0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50 e Pressão=702 MPa).	136
FIGURA 3.4	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta G'' em função das variáveis pH e concentração de pectina (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento III.	138
FIGURA 3.5	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta solubilidade proteica em função das variáveis pH e concentração de κ -carragena (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento IV.	142
FIGURA 3.6	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) em função das variáveis pH e concentração de κ -carragena (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento IV.	146
FIGURA 3.7	Módulos G' (linha cheia) e G'' (linhas tracejadas) em função da frequência para as amostras selecionadas do Experimento IV com 1% de IPS, sendo : Ensaio 3 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, Pressão=300 MPa); Ensaio 7 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50 e Pressão=600 MPa); Ensaio 9 (0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00 e Pressão=450 MPa).	148

FIGURA 3.8	Cromatogramas de CLAE-FR do IPS original (pH=6,60), sem tratamento, mostrando os picos mais bem definidos (1, 2 e 3).	156
FIGURA 3.9	Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento III, contendo 1% de IPS.	157
FIGURA 3.10	Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento IV, contendo 1% de IPS.	158
FIGURA 3.11	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras selecionadas dos Experimentos III e IV, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) nível de pressão aplicada; (4) concentração de pectina (g/g de IPS) e (5) concentração de κ -carragena (g/g de IPS).	161
FIGURA 3.12	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE), em condições redutoras das amostras selecionadas dos Experimentos III e IV, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo MC=marcadores de peso molecular comercial, (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) nível de pressão aplicada e (4) concentração do polissacarídeo (g/g de IPS): pectina (Experimento III) e κ -carragena (Experimento IV). Sendo que no Experimento IV as amostras 3 e 7 possuem a mesma composição diferindo apenas no tratamento sob alta pressão.	162
FIGURA 3.13	Microestruturas antes do tratamento sob alta pressão de: a) IPS original (pH=6,60), b) pectina comercial e c) κ -carragena comercial, aumento de 540 vezes.	164
FIGURA 3.14	Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento III (1% IPS), antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 5 (0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00); (b) Ensaio 5 (0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00, 600 MPa); (c) Ensaio 8 (0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00) e (d) Ensaio 8 (0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00, 600 MPa); (e) Ensaio 14 (0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50) e (f) Ensaio 14 (0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50, 702 MPa).	165
FIGURA 3.15	Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento IV (1% IPS), antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 3 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50); (b) Ensaio 3 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 300 MPa); (c) Ensaio 7 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50) e (d) Ensaio 7 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 600 MPa); (e) Ensaio 9 (0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00) e (f) Ensaio 9 (0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00, 450 MPa).	166

CAPÍTULO 5

FIGURA 5.1	Fluxograma de produção do isolado proteico de soja.	193
FIGURA 5.2	Superfícies de resposta (a e c) e curvas de contorno (b e d) para a solubilidade proteica em função das variáveis pH e alta pressão para o	206

	Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d).	
FIGURA 5.3	Superfícies de resposta (a e c) e curvas de contorno (b e d) para o IAE em função das variáveis pH e alta pressão para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d).	211
FIGURA 5.4	Cromatogramas de CLAE-FR do isolado proteico de soja.	222
FIGURA 5.5	Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento I.	223
FIGURA 5.6	Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento II.	224
FIGURA 5.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras com 1% de IPS selecionadas dos Experimentos I e II, antes (A) e após o tratamento sob alta pressão (D), sendo (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) pressão aplicada.	227
FIGURA 5.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE), em condições redutoras das amostras selecionadas dos Experimentos I e II antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo MC=marcadores de peso molecular comercial, (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) pressão aplicada.	228
FIGURA 5.9	Microestrutura do IPS original, sem tratamento, liofilizado, pH=6,80, aumento de 550 vezes	230
FIGURA 5.10	Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento I, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 550 vezes: a) Ensaio 5 (pH=2,80); (b) Ensaio 5 (pH=2,80, 150 MPa); (c) Ensaio 6 (pH=4,20) e (d) Ensaio 6 (pH=4,20, 150 MPa); (e) Ensaio 11 (pH=3,50) e (f) Ensaio 11 (pH=3,50, 150 MPa).	231
FIGURA 5.11	Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento II, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 550 vezes: a) Ensaio 2 (pH=6,50); (b) Ensaio 2 (pH=6,50, 100 MPa); (c) Ensaio 3 (pH=5,50) e (d) Ensaio 3 (pH=5,50, 200 MPa); (e) Ensaio 6 (pH=6,70) e (f) Ensaio 6 (pH=6,70, 150 MPa).	232
 ANEXO B		
FIGURA B1	Curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA, utilizada nos Experimentos sob alta pressão isostática (Capítulos 2 e 3).	263
FIGURA B2	Curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA, utilizada nos Experimentos sob alta pressão dinâmica (Capítulo 5).	264
 ANEXO C		
FIGURA C1	Curva padrão para a determinação do teor de fitato (Capítulo 4).	267

ANEXO D

FIGURA D1	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 3 (1% de IPS, pH=4,00 e 300 MPa de pressão) do Experimento I (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	271
FIGURA D2	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 11 (2% de IPS, pH=2,66 e 450 MPa de pressão) do Experimento I (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	272
FIGURA D3	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 14 (2% de IPS, pH=3,50 e 702 MPa de pressão) do Experimento I (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	272
FIGURA D4	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 5 (1% de IPS, pH=5,50 e 600 MPa de pressão) do Experimento II (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	273
FIGURA D5	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 9 (0,32% de IPS, pH=6,00 e 450 MPa de pressão) do Experimento II (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	273
FIGURA D6	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 12 (2% de IPS, pH=6,84 e 450 MPa de pressão) do Experimento II (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	274
FIGURA D7	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 5 (1% de IPS, pH=3,00, 0,1 g de pectina e 450 MPa de pressão) do Experimento III (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	274
FIGURA D8	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 8 (1% de IPS, pH=4,00, 0,3 g de pectina e 600 MPa de pressão) do Experimento III (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	275
FIGURA D9	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 14 (1% de IPS, pH=3,50, 0,2 g de pectina e 702 MPa de pressão) do Experimento III (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	275
FIGURA D10	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 3 (1% de IPS, pH=6,50, 0,1 g de κ -carragena e 300 MPa de pressão) do Experimento IV (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	276
FIGURA D11	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 7 (1% de IPS, pH=6,50, 0,1 g de κ -carragena e 600 MPa de pressão) do Experimento IV (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	276

FIGURA D12	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 9 (1% de IPS, pH=6,00, 0,032 g de κ -carragena e 450 MPa de pressão) do Experimento IV (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	277
FIGURA D13	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 5 do Experimento I (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	278
FIGURA D14	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 6 do Experimento I (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	279
FIGURA D15	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 11 do Experimento I (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	279
FIGURA D16	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 2 do Experimento II (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	280
FIGURA D17	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 3 do Experimento II (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	280
FIGURA D18	Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 6 do Experimento II (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.	281

RESUMO GERAL

O isolado proteico de soja (IPS) é um produto com pelo menos 90% de proteínas que, devido às suas características físico-químicas, possui certas propriedades funcionais tecnológicas que influenciam a sua aceitação e utilização como ingrediente em produtos cárneos, alimentos infantis, bebidas e produtos de panificação. Os polissacarídeos, pectina e κ -carragena são utilizados em alimentos como espessantes, geleificantes e estabilizantes de emulsões. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento sob alta pressão, utilizando-se os dois tipos de equipamentos existentes no mercado: isostático e dinâmico, sobre as características funcionais tecnológicas (solubilidade e índice de atividade emulsificante - IAE) do isolado proteico de soja, como também da mistura de isolado proteico de soja com pectina e κ -carragena, com o equipamento isostático. No caso do equipamento isostático, foram também analisadas as propriedades reológicas – G' e G'' . Para a análise dos efeitos do tratamento sob alta pressão isostática sobre o isolado proteico de soja foi utilizado o planejamento fatorial completo (2^3), cujas variáveis independentes foram a concentração de proteína, pH e nível de pressão. Para o equipamento dinâmico as variáveis foram o pH e o nível de pressão aplicado. Um planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) foi utilizado inicialmente, para os sistemas proteína de soja-polissacarídeos para avaliar os efeitos das variáveis independentes (concentração de isolado de soja, concentração de polissacarídeo utilizado - pectina ou κ -carragena, pH e nível de pressão isostática) e posteriormente foi realizado um planejamento fatorial completo (2^3) fixando-se a concentração de IPS em 1%, obtendo-se as superfícies de resposta. De cada planejamento fatorial completo foram selecionados os ensaios que apresentaram as maiores respostas em cada característica funcional (solubilidade, índice de atividade emulsificante e conforme o caso, G'') e avaliadas também o teor de sulfidril livre, comportamento eletroforético, grau de desnaturação das proteínas (calorimetria diferencial de varredura), perfil cromatográfico e documentação da microestrutura (microscopia eletrônica de varredura). A solubilidade proteica foi fortemente influenciada pela variável pH em

todas as faixas de pH estudadas, tanto quando se utilizou apenas a proteína de soja quanto da sua utilização adicionada de pectina e κ -carragena, para ambos os equipamentos de alta pressão utilizados: isostático e dinâmico. Quando se trabalhou apenas com a proteína de soja, utilizando-se o equipamento de alta pressão isostática na faixa de pH mais baixa (2,66 – 4,34) o valor de IAE foi máximo nos tratamentos sob baixa pressão. Na faixa de pH de 5,16 a 6,84 os valores mais altos de IAE foram obtidos na região de valores centrais de pressão e de baixo pH. Quando se adicionou pectina ou κ -carragena à proteína de soja o IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos sob pressão isostática nos pontos extremos (mais baixos ou nos mais altos). Quando se utilizou o equipamento sob alta pressão dinâmica os maiores valores de IAE estão próximos aos ponto isoelétrico da proteína de soja. Em todos os experimentos realizados no equipamento isostático o módulo de perda ou componente viscoso (G'') foi o componente dominante, exibindo um comportamento predominantemente viscoso. A análise das amostras selecionadas em cada experimento com os maiores valores de solubilidade proteica, IAE e quando foi o caso G'' utilizando apenas a proteína de soja ou misturas da proteína de soja com pectina ou κ -carragena mostraram que o tratamento sob alta pressão isostática e dinâmica diminuíram em maior ou menor grau o teor de sulfidrila livre de todas as amostras analisadas, evidenciando uma mudança na molécula da proteína confirmada pelas alterações observadas através das análises de calorimetria diferencial de varredura, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica.

Foi realizada também uma avaliação sobre os efeitos do tratamento sob alta pressão isostática (200-700 MPa) sobre os fatores antinutricionais teor de fitato e inibidor de tripsina, constatando-se que a alta pressão não alterou os teores do inibidor de tripsina; porém, não foram detectadas concentrações de fitato após este tratamento.

Palavras-chave: proteína de soja, pectina, κ -carragena, alta pressão isostática, alta pressão dinâmica, propriedades funcionais tecnológicas.

GENERAL SUMMARY

Soy protein isolate (SPI) contains at least 90% protein and its physics and chemical properties define some functional properties that influence its use and acceptance as an ingredient in meat products, baby foods, beverages and bread products. The polysaccharides pectin and κ -carrageenan are used as a thickening, gelation and emulsion stabilising agent in some food products. The effects of isostatic and dynamic high pressure on functional properties (solubility and emulsifying activity index – EAI) of SPI alone as well of SPI mixed with pectin and κ -carrageenan (only for isostatic high pressure treatment) were evaluated in this work. For isostatic high pressure processing the rheological properties G' and G'' were also evaluated. To analyse the effects of isostatic high-pressure treatment on SPI a complete factorial design 2^3 was applied with protein concentration, pH and pressure as independent variables. For dynamic high-pressure treatment the variables were the pH and the pressure. Initially, to analyse the effects of independent variables (protein concentration, polysaccharide concentration –pectin or κ -carrageenan, pH and pressure level) in mixed protein-polysaccharide systems a fractional factorial design 2^{4-1} was applied and the protein concentration was fixed at 1% for the next complete designs. The samples with the highest effect on protein solubility, EAI and in some cases also G'' value were evaluated as well by electrophoresis (Native and SDS-Page), free sulphhydryl determination, reversed phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC), differential scanning calorimetry (DSC) and having their microstructure documented. The pH was the main factor that affecting protein solubility in all studied pH ranges, for SPI alone and SPI mixed with polysaccharides and for both high-pressure equipments. The EAI was maximum in low high-pressure treatments (200-300 MPa) with isostatic equipment for pH 2.66-4.34 range, when the system was only SPI. In pH 5.16-6.84 range the highest EAI values was in middle high-pressure values (450 MPa) and low pH. When SPI was mixed with pectin and κ -carrageenan the highest values of EAI was in the extreme points of isostatic high pressure (the highest or the lower).

When dynamic high-pressure equipment was used the region of the highest values of EAI was near by the soy protein isoelectric point (pI). Loss modulus (G'') was the dominant compound in all the isostatic experiments done and exhibited a predominantly viscous behaviour. The selected samples analysis with SPI alone as well SPI mixed with pectin or κ -carrageenan samples showed that isostatic or dynamic high pressure treatment decreased in some degree the free sulphhydryl content of all analysed samples showing that some change occurred in soy protein molecule as confirmed by DSC, RP-HPLC, electrophoresis and scanning electronic microscopy.

The evaluation of isostatic high pressure treatment (200-700 MPa) on antinutritional factors such as phytate content and trypsin inhibitor showed that high pressure did not change the trypsin inhibitor activity but was effective in eliminating the phytate content.

Keywords: soy protein isolate (SPI); pectin; κ -carrageenan, isostatic high pressure; dynamic high pressure; functional properties.

Introdução Geral

Introdução Geral

É inegável a importância do papel do complexo soja na economia nacional. O Brasil é o segundo produtor (28% da produção mundial) e exportador mundial de soja em grão, farelo e óleo. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2006) o complexo soja é um dos principais itens da Balança Comercial Brasileira, tendo sido exportados em 2005 cerca de US\$ 9,5 bilhões, colocando o país na liderança mundial nas exportações do setor em valor.

As proteínas, em geral, representam uma importante classe de ingredientes tecnológicos funcionais por possuir uma grande gama de propriedades dinâmicas que abrangem desde características sensoriais (cor, sabor, aroma, textura, maciez, etc.) até propriedades de hidratação (solubilidade, geleificação, sinérese, viscosidade, sorção de água, etc.), de superfície (emulsificação, capacidade de formação de espuma e de filmes) e outras ligadas a características reológicas e de textura (elasticidade, coesão, formação de gomas, adesividade, agregação, formação de massa, formação de redes, etc.) (KINSELLA; RECTOR; PHILLIPS, 1994). A soja, rica em proteínas, é uma leguminosa extremamente consumida por razões econômicas, funcionais e nutricionais. Além de ser uma importante fonte de proteínas de baixo custo, minerais e vitaminas, a soja desempenha importante propriedade funcional tecnológica nos alimentos aos quais é adicionada. Estas propriedades estão ligadas a sua capacidade de retenção de água, retenção ou melhoria da textura, capacidade de ligamento e coesão, melhoria do rendimento final, retenção de atributos de qualidade em geral, melhoria do teor proteico, cor agradável, aumento do tempo de vida-de-prateleira, aumento da palatabilidade e melhoria da aparência visual.

O uso da proteína de soja como um ingrediente tecnológico funcional depende primariamente das propriedades físico-químicas que governam a estrutura e os atributos conformacionais da proteína. No caso dos alimentos, os sistemas são multicomponentes, sendo que proteínas e polissacarídeos contribuem

conjuntamente para a sua estrutura, textura e estabilidade, através de suas propriedades espessantes, geleificantes ou de superfície. Portanto, é necessário entender a natureza estrutural destes componentes e suas interações quanto a sua funcionalidade tecnológica quando estes componentes são misturados e submetidos a processos ainda pouco estudados como os de alta pressão.

O processamento sob alta pressão é um tratamento não térmico que está sendo utilizado para a preservação de alimentos e que tem sido estudado tanto pelo seu menor dano térmico quanto pelo seu poder de promover mudanças estruturais em proteínas e nas interações proteínas-polissacarídeos.

Até o momento não há estudos realizados nos quais os efeitos das variáveis pH, concentração de proteína e pressão sobre as propriedades funcionais da proteína de soja são analisados conjuntamente, tanto na proteína dispersa em água em diferentes faixas de pH, quanto na sua adição aos polissacarídeos pectina e κ -carragena.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito do processamento sob alta pressão (isostático e dinâmico) no isolado proteico de soja e suas interações com pectina e κ -carragena (processamento sob alta pressão isostática). Assim, buscou-se avaliar através de planejamentos fatoriais completos 2^3 o efeito das variáveis (concentração de isolado proteico de soja, pH e nível de pressão isostática aplicada) nas propriedades funcionais (solubilidade, capacidade de emulsificação e características reológicas), obtendo-se as superfícies de resposta em duas faixas de pH (2,66 a 4,34 e 5,16 a 6,84) para o processamento sob alta pressão isostática (198 a 702 MPa). No caso do processamento sob alta pressão dinâmica, foram utilizadas igualmente duas faixas de pH (2,80 a 4,20 e 5,30 a 6,70) e planejamentos fatoriais completos 2^2 , tendo como variáveis o pH (2,80 a 4,20 e 5,30 a 6,70) e o nível de pressão aplicada (80 a 220 MPa). Selecionaram-se em cada um destes planejamentos as amostras com o efeito mais intenso destas características e avaliaram-se também outras características físico-químicas (teor de sulfidril livre e comportamento eletroforético), grau de

desnaturação das proteínas, alterações do perfil cromatográfico e microestruturas obtidas.

Avaliaram-se, também secundariamente, no caso do processamento sob alta pressão isostática, as interações proteína de soja-pectina e proteína de soja- κ -carragena. Nas avaliações destas interações foi utilizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , e posteriormente, um planejamento completo 2^3 . Foi avaliado o efeito das variáveis (concentração de isolado proteico de soja, concentração de polissacarídeos, pH e nível de pressão) nas mesmas propriedades funcionais avaliadas anteriormente para a proteína de soja (solubilidade, capacidade de emulsificação e comportamento reológico), quando submetidas à alta pressão isostática. As amostras com o efeito mais intenso destas características foram selecionadas e avaliadas também quanto às outras características físico-químicas (teor de sulfidril livre e comportamento eletroforético), grau de desnaturação das proteínas, alterações do perfil cromatográfico e microestruturas obtidas.

Os efeitos do processamento sob pressão isostática sobre os fatores anti-nutricionais da proteína de soja, como o teor de fitato e fator anti-tripsina também foram avaliados.

Referências Bibliográficas:

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Complexo soja no Brasil. Disponível <http://www.abiove.com.br/export.html> [capturado em 12/04/2006].

KINSELLA, J. E.; RECTOR, D. J.; PHILLIPS, L. G. Physico-chemical properties of proteins: texturization via gelation, glass and film formation. In: YADA, R. Y.; JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. (ed.) **Protein structure-function relationships in foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional. 1994. p. 1-21.

Capítulo 1:

Revisão Bibliográfica

Revisão Bibliográfica¹

A busca por novos processos e equipamentos para a preservação de alimentos deve levar em consideração o interesse cada vez maior dos consumidores por alimentos nutritivos, seguros, convenientes, econômicos e altamente aceitáveis do ponto de vista sensorial (SLOAN, 1999).

O cultivo de soja para consumo humano tem sido considerado um bom negócio para os próximos anos. Conforme relato de especialista em mercado internacional veiculado pela empresa Ecirtec (2003), o consumo de produtos de soja deverá crescer 300% até 2008. Segundo a empresa Nutrisoy (2003), o consumo de soja para uso humano quadruplicou nos últimos cinco anos, atingindo atualmente cerca de 4% do total de soja produzido no país. O mercado brasileiro de bebidas não-alcoólicas também está em plena expansão. No primeiro semestre de 2002, as vendas de bebidas à base de soja cresceram 104% em volume (SOY...,2002; KRONES, 2002). Em entrevista à empresa Nutrisoy (2003), o pesquisador da Embrapa Soja, José Marcos Mandarino, comentou que a divulgação na mídia dos benefícios da soja à saúde está ocasionando uma mudança no conceito dos consumidores em relação às bebidas à base de soja. O fato do alimento conter soja, passou a ser indicado com destaque no rótulo, agregando valor à mercadoria. Essa informação foi confirmada pela gerência de Marketing da Unilever, ao afirmar que o aumento do crescimento das vendas de bebidas à base de soja de 40% em 2002 em relação a 2001 está ligado ao desejo dos consumidores em comprar um suco que também seja nutritivo (MELLO, 2002).

Vários processadores de alimentos nos Estados Unidos têm procurado incluir a proteína de soja em suas formulações como forma de atrair os consumidores, pois o “Food and Drug Administration (FDA)” permite a veiculação do emprego da proteína de soja como redutor de riscos de doenças cardíacas (SOY..., 2002).

¹ A maioria das informações constantes neste capítulo foram anteriormente publicadas no artigo:
- Torrezan, R.; Cristianini, M. Revisão: efeito do tratamento sob alta pressão sobre as propriedades funcionais da proteína de soja e interação proteína-polissacarídeos. **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v.23, n.2, p. 201-220, 2005.

Segundo Anthony et al. (1996), o consumo de proteína de soja tem sido associado com a redução do risco de doenças cardíacas, sintomas da menopausa, osteoporose e câncer de mama e próstata.

1.1. Proteína de soja

Os grãos de soja se caracterizam por conter cerca de 20% de óleo e 40% de proteína. O óleo e grande parte da proteína se encontram em corpúsculos especiais contidos nas células do cotilédone. A maior parte das proteínas da soja são classificadas como globulinas. Essas proteínas são insolúveis em água no seu ponto isoelétrico, mas dissolvem-se em água ou soluções salinas diluídas em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico (pH 4,5) (Figura 1.1). As proteínas de soja, quando em solução, mostram-se sensíveis ao tratamento térmico (SGARBIERI, 1996).

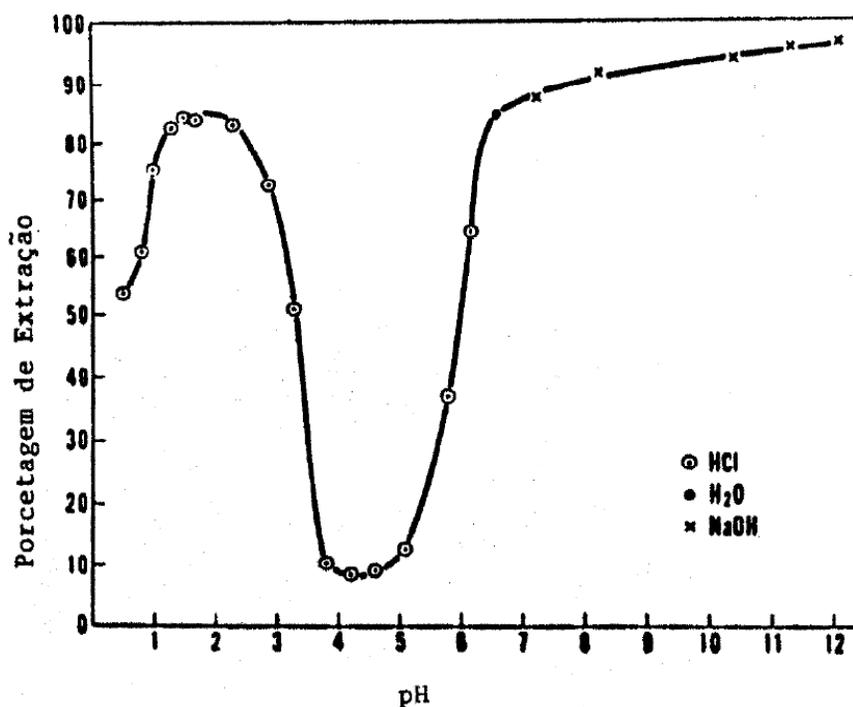


FIGURA 1.1 – Curva de solubilidade da proteína de soja em função do pH.

Fonte: SGARBIERI (1996), reproduzido com autorização do autor e da Livraria Varela Ltda.

As proteínas de soja constituem uma mistura de macromoléculas de tamanhos, densidades de carga e estruturas diferentes. Os pesos moleculares das proteínas de soja variam de 8.000 a 600.000 Da, com maior concentração na faixa de 110.000 a 350.000 Da. A separação das proteínas por ultracentrifugação apresenta frações cujos coeficientes de sedimentação S (unidades Svedburg, a 20°C em água) são 2, 7, 11 e 15 (PEARSON, 1983; CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989; LIU, 1999). Essa análise tem mostrado que as frações 11S e 15S são constituídas de proteínas puras (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989; LIU, 1999). A fração 2S, que representa cerca de 20% das proteínas, é composta por proteínas biologicamente ativas, inibidores de tripsina e globulinas 2S. As frações 7S e 11S representam juntas cerca de 70% das proteínas contidas no grão de soja. A fração 7S é composta pelas enzimas β -amilase e lipoxigenase, hemaglutinina e citocromo C e pela globulina conhecida como β -conglucina (glicoproteína de reserva). A globulina 11S, também conhecida como glicina, é proteína de reserva, constituindo cerca de 37% da proteína da soja. A fração 15S (globulina 15S) perfaz cerca de 10% do total de proteínas (SGARBIERI, 1996; CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

A β -conglucina, glicoproteína trimérica com peso molecular médio de 180 kDa que representa 91% da fração 7S, é constituída de três subunidades α' (57-83 kDa), α (57-76 kDa) e β (42-53 kDa), que interagem para formar cerca de 6 isômeros conhecidos (designados como B1 a B6). Outra subunidade β' já foi observada em algumas variedades de soja. As subunidades α , α' e β são ricas em asparagina, glutamina, leucina e arginina. As subunidades α e α' , similares na composição de aminoácidos, são ricas em cisteína e pobres em metionina. A subunidade β não contém metionina, sendo uma glicoproteína, formada por polipeptídeos, contém 4-5% de carboidratos e não apresenta metionina (LIU, 1999).

A fração 11S (glicina), de estrutura hexamérica, tem peso molecular de 360 kDa. As subunidades monoméricas têm uma estrutura A-S-S-B, na qual A representa

polipeptídeo ácido de 33 - 44 kDa, B um polipeptídeo básico de cerca de 20 kDa e S-S são as pontes dissulfídicas que unem os polipeptídeos, formando a subunidade AB. Sua estrutura quaternária é ainda estabilizada por interações eletrostáticas e hidrofóbicas (LIU, 1999).

Em geral, a fração 11S contém 3 ou 4 vezes mais metionina e cisteína por unidade de proteína do que a fração 7S (KITAMURA, 1995). Sob o ponto de vista nutricional a fração 11S é bastante valiosa visto que a soja é deficiente em aminoácidos sulfurados. Furukawa, Ohta e Yamamoto (1979) e Voutsinas, Nakai e Harwalkar (1983) relataram a importância dos grupos SH e SS para as propriedades funcionais das proteínas, fundamentais no processo de geleificação e coagulação das proteínas. A fração 11S têm melhor habilidade para a formação de gel quando comparada com a fração 7S, sendo que esta última mostra maior capacidade e estabilidade de emulsão.

O isolado proteico de soja (IPS), que contém pelo menos 90% de proteína, é preparado a partir de flocos ou farinha de soja desengordurada que recebe tratamento térmico brando para inativar os fatores antinutricionais. O IPS, produto livre de carboidratos e de lipídios é bastante utilizado como ingrediente em produtos cárneos, bebidas, produtos de panificação, alimentos infantis e em formulações especiais para nutrição clínica. Segundo Sgarbieri (1996), o processo de preparo do IPS envolve: extração da proteína de soja da farinha ou flocos desengordurados com solução alcalina diluída (pH ~ 9,0), centrifugação para eliminar o resíduo insolúvel e obter o extrato alcalino, adição de ácido até pH isoelétrico (pH 4,5), centrifugação para obtenção do precipitado (isolado isoelétrico) e do sobrenadante “soro”, lavagem do precipitado com água fria para eliminar o resíduo do ácido, tratamento com álcali até pH 7-8 para dispersão do precipitado e secagem da proteína isolada por atomização (“Spray Dryer”).

Os fatores que dificultam a expansão do uso dos produtos de soja são o sabor característico da soja crua e os fatores antinutricionais. O grão de soja cru possui naturalmente inibidores de proteases como o inibidor de tripsina que inibe a ação da tripsina intestinal, estimulando a maior secreção de proteínas e enzimas

digestivas como a tripsina, quimotripsina e elastase que são eliminadas nas fezes, representando uma perda endógena importante de aminoácidos sulfurados e produzindo alterações metabólicas que resultam até mesmo em redução de crescimento, hipertrofia e hiperplasia pancreática (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; LIENER, 1994; PEARSON, 1983). Os grãos de soja contêm dois tipos de inibidores de tripsina: o de Kunitz e o de Bowman-Birk. Estes inibidores são sensíveis ao tratamento térmico, devido à presença de duas pontes dissulfeto na molécula do inibidor de Kunitz e de sete no inibidor de Bowman-Birk (VEN; MATSER; BERG, 2005). Estes fatores antinutricionais são eliminados normalmente pelo tratamento térmico e sua presença é controlada nos produtos industrializados (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998).

Os fitatos representam uma complexa classe de componentes naturais que ocorrem principalmente em cereais e leguminosas e que afetam as suas propriedades funcionais e nutricionais. A maior parte dos grãos de leguminosas contém de 0,5 a 5,0 % de fitato ou ácido fítico, constituindo-se na principal fonte de fósforo. Nutricionalmente, a presença de fitato é desfavorável pela formação de complexos insolúveis com minerais e proteínas, diminuindo a biodisponibilidade destes nutrientes, sendo recomendado a sua remoção ou redução em produtos de soja (MAGA, 1982; KNUCKLES; KUZMICKY; BETSCHART 1985). O fitato pode ser eliminado utilizando-se métodos químicos ou físicos, porém estes tratamentos podem afetar as propriedades físico-químicas das proteínas (RHAM; JOST, 1979; BROOKS; MORR, 1985). Não há na literatura trabalhos avaliando o efeito do tratamento sob pressão sobre o teor de fitato.

1.2. Propriedades funcionais das proteínas

A conformação das proteínas na natureza é dividida em quatro níveis estruturais (primária, secundária, terciária e quaternária) que refletem a sua função biológica, mas não necessariamente a sua aplicação. A estrutura primária é a seqüência da cadeia linear dos aminoácidos. Os aminoácidos podem ser classificados em não polares, polares neutros, carregados positiva ou negativamente. A proporção de cada classe de aminoácido e sua distribuição ao longo da cadeia é que irá

determinar as propriedades de solubilidade, hidrofobicidade e habilidade para formar e estabilizar emulsões e espumas. A estrutura secundária é mantida pelas ligações ou pontes de hidrogênio que podem ser intramoleculares (α -hélice) ou intermolecular (folha pregueada). A estrutura terciária se refere a um arranjo espacial da cadeia polipeptídica (dobramento ou formação de laços), já dotada ou não de estrutura secundária, estabilizadas por ligações dissulfeto (covalentes) e ligações salinas ou interações eletrostáticas, pontes ou ligações de hidrogênio, interações dipolares e interações hidrofóbicas ou de Van der Waals. A estrutura quaternária está ligada ao grau de estruturação das proteínas que é formada por polipeptídeos (que apresentam o seu próprio grau de estruturação, primário, secundário e terciário) ligados por ligações não covalentes. O complexo nível de estrutura das proteínas na natureza, a grande variedade de formas e funções e a retenção ou perda desta estrutura é que irá determinar as aplicações funcionais tecnológicas das proteínas (HALL, 1996; SGARBIERI, 1996).

Segundo as definições compiladas por Messens, Van Camp e Huyghebaert (1997), os fenômenos que afetam o grau de dispersão das proteínas em solução são a desnaturação, associação, agregação e geleificação. A desnaturação proteica é definida como qualquer modificação na estrutura secundária, terciária ou quaternária que não envolva ruptura de ligações covalentes em geral, não afetando assim a estrutura primária. A conformação após a desnaturação pode ser uma estrutura peptídica total ou parcialmente desdobrada. A associação se refere a mudanças que ocorrem em nível molecular (exemplo: dimerização) que são caracterizadas pelas fracas ligações em lugares específicos de interações. Já os termos agregação ou polimerização, precipitação, coagulação e floculação referem-se a interações não específicas proteína-proteína que resultam na formação de grandes complexos de alto peso molecular. A geleificação é uma agregação ordenada de proteínas nativas ou parcialmente desnaturadas, formando uma estrutura tridimensional na qual as interações proteína-proteína e proteína-solvente são balanceadas para produzir uma matriz bem organizada, capaz de reter considerável quantidade de água.

As propriedades funcionais tecnológicas têm sido definidas como qualquer propriedade dos alimentos ou de seus componentes, excetuando-se as nutricionais, que influencie a sua aceitação e utilização (SGARBIERI, 1996). Essas dependem das propriedades físicas e químicas das proteínas, que são muito importantes para o preparo de determinados alimentos, afetando sua conservação, estocagem e aceitação pelos consumidores. Segundo Cheftel, Cuq e Lorient (1989), as propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas em hidrofílicas, intermoleculares e interfásicas. As propriedades hidrofílicas dependem das interações proteína-água (solubilidade, capacidade de hidratação e de retenção de água, adesividade, dispersibilidade e viscosidade). As propriedades intermoleculares dependem da capacidade das interações proteína-proteína ou das moléculas de proteína com outros componentes (precipitação, geleificação, formação de fibras e pastas proteicas). Já as propriedades interfásicas ou de superfície dependem da capacidade de união das moléculas de proteínas para formarem película entre duas fases imiscíveis (tensão superficial, emulsificação e capacidade de formação de espuma).

O índice de solubilidade é uma propriedade funcional importante, pois se relaciona diretamente com outras características funcionais, como capacidade de formação de espuma, capacidade de geleificação, poder de emulsificação e viscosidade (MATTIL, 1971). Segundo Vojdani (1996), as proteínas utilizadas por razões funcionais devem ter de maneira geral uma alta solubilidade para proporcionar uma boa emulsão, capacidade de formação de espuma, geleificação e de dispersão. Os fatores que influenciam a solubilidade proteica podem ser intrínsecos (hidrofobicidade, hidrofiliidade, tamanho, carga, propriedades estéricas e concentração proteica) ou extrínsecos (pH, temperatura, força iônica, presença e tipos de outros componentes, interações com outros componentes e parâmetros físicos). O grau de solubilidade de uma proteína é matematicamente a quantidade de proteína no líquido e fase sólida no equilíbrio, mas tecnicamente a solubilidade proteica é um parâmetro operacional determinado pela retenção de proteína no sobrenadante após a centrifugação de uma solução a um determinado tempo e força centrífuga (VOJDANI, 1996).

Wagner e Guéguem (1999) afirmaram que as propriedades emulsificantes das proteínas dependem basicamente de dois efeitos: (a) decréscimo substancial da tensão superficial devido à adsorção da proteína na interface água-óleo e (b) formação de barreira estrutural, eletrostática e mecânica capaz de opor-se à desestabilização das gotículas emulsionadas. A capacidade de emulsificação das proteínas depende de características físico-químicas como tamanho molecular, composição e seqüência de aminoácidos, conformação espacial, densidade das cargas e hidrofobicidade superficial (KESTER; RICHARDSON, 1984).

Segundo Liu (1999) as pontes dissulfeto desempenham importante papel na manutenção da estrutura nativa da proteína e sua estabilidade, diminuindo a sua reatividade. A redução das pontes dissulfeto pode levar ao aumento da susceptibilidade das proteínas às reações proteolíticas catalisadas pelas enzimas. A baixas concentrações proteicas, a quebra das ligações dissulfídicas reduzem a capacidade de geleificação, enquanto que a altas concentrações proteicas esta capacidade é intensificada.

As proteínas são susceptíveis à desnaturação tanto pelo frio como pelo calor ou ainda por tratamentos alcalinos brandos. A etapa inicial, importante no processo de geleificação das proteínas globulares, consiste no aquecimento da solução proteica acima da temperatura de desnaturação. Após o resfriamento, os grupamentos expostos do polipeptídeo desnaturado interagem, conduzindo a formação de complexa rede que atua como matriz capaz de reter água e outros componentes (DAMODARAN, 1988).

A desnaturação das proteínas geralmente resulta em perda de solubilidade, aumento da viscosidade, perda da atividade biológica, aumento na susceptibilidade à proteólise e outras modificações enzimáticas e químicas, mudanças nas interações proteína-proteína e interações com outras substâncias (água, lipídeos, carboidratos e minerais). As mudanças estruturais decorrentes da desnaturação proteica incluem o decréscimo no conteúdo de α -hélice, exposição de triptofano e tirosina e dos grupos tiol e dissulfídicos. A taxa e extensão da

desnaturação proteica dependem da composição, concentração, conteúdo de umidade e força iônica. A desnaturação por acidificação leva a agregação e concomitante precipitação das proteínas de soja, limitando o seu uso em bebidas. Por outro lado, a desnaturação em pH alcalino causa a dissociação e o desdobramento das proteínas afetando as soluções viscosas e géis dependendo da concentração proteica. As condições alcalinas aumentam as repulsões eletrostáticas e podem levar à quebra de algumas pontes dissulfídicas causando a desestabilização da conformação proteica (LIU, 1999).

A Calorimetria Diferencial de Varredura (CDV) é uma técnica na qual a diferença de energia imposta a uma substância e ao material de referência é avaliada em função da temperatura programada. A desnaturação da proteína, assim como algumas outras mudanças de estrutura e conformação da mesma que possam ocorrer pela ação da temperatura são registradas através de um fluxo de diferencial térmico na forma de um pico em um termograma (MA; HARWALKAR, 1991), sendo possível determinar a temperatura de desnaturação, entalpia e grau de desnaturação da proteína.

O pH exerce forte influência sobre a funcionalidade das proteínas, visto que várias propriedades funcionais dependem do estado de ionização de grupos ionizáveis na molécula proteica e deveria ser sempre indicado em todas as descrições de métodos utilizados (HALL, 1996).

Os alimentos são sistemas multicomponentes e multifásicos que exibem comportamento reológico devido às interações de estruturas que ocorrem, geralmente, em meio aquoso. As propriedades hidrodinâmicas das proteínas influenciam a sua viscosidade e capacidade de formar gel e são afetadas pelo formato e tamanho da molécula de proteína, sendo relativamente independentes da composição de aminoácidos e distribuição (VOJDANI, 1996). Segundo Schenz e Morr (1996), as variáveis concentração, condições de dispersão, pH, força iônica, processamento e composição do sistema podem afetar a viscosidade de soluções proteicas. Medidas dinâmicas oscilatórias podem ser realizadas em viscosímetros de placas paralelas onde a energia transmitida para a placa inferior

é medida em função da frequência e torque e traduzida em termos dos módulos G' (componente elástico), G'' (componente viscoso) e viscosidade dinâmica (η^*). O módulo de estocagem ou componente elástico (G') é a medida da energia estocada em um material e recuperada em cada ciclo, sendo um indicativo do comportamento sólido ou elástico do material testado e é dependente dos rearranjos que ocorrerem durante o período de oscilação. O módulo de perda ou componente viscoso (G'') é a medida da energia dissipada ou perdida (como o calor) por ciclo de deformação e representa o comportamento líquido ou viscoso do material testado. A viscosidade dinâmica mede a fricção interna de um líquido ou sua tendência de resistir ao fluxo (SOLORZA; BELL, 1995; BOURNE, 2002).

1.3. Propriedades funcionais das proteínas de soja

As frações proteicas da soja β -conglucina e glicina mostram consideráveis diferenças funcionais no que se refere à habilidade de formação de gel, estabilidade térmica e capacidade de emulsificação (YAMAUCHI; YAMAGISHI; IWABUCHI, 1991). Em geral, a fração 11S exibe melhor habilidade para a formação de gel, principalmente quando a subunidade $A_5A_4B_3$ está ausente e permite a formação de tofu de textura firme. Por outro lado, a fração 7S demonstra melhor capacidade de formar emulsão e de mantê-la estável. Ambas as frações 7S e 11S formam gel quando aquecidas e pelo uso de agentes coagulantes (sulfato de cálcio ou cloreto de magnésio), como no preparo do tofu. A fração 11S requer tratamento térmico mais intenso do que a fração 7S para a formação do gel. Na presença de sulfato de cálcio, a fração 11S coagula mais rapidamente e forma agregados maiores do que a fração 7S. O gel formado pela fração 11S é mais rígido do que o formado pela fração 7S, tendo maior capacidade de retenção de água e valores de tensão maiores, se expandindo mais durante o aquecimento. (HASHIZUME; NAKAMURA; WATANABE, 1975; LIU, 1999).

Diferindo na composição e estrutura, as globulinas β -conglucina e glicina exibem também diferenças nutricionais e funcionais, cujo estado de associação-dissociação e estabilidade térmica são altamente dependentes do pH e da força

iônica (PETRUCCELLI; AÑON, 1996). Assim, torna-se difícil prever as mudanças estruturais e funcionais que podem ocorrer quando os isolados são submetidos a tratamentos diferentes. A capacidade de formação do gel e o tipo do gel formado dependem da concentração da proteína, da temperatura, do pH, da formação e ruptura das pontes dissulfídicas e das interações eletrostáticas e hidrofóbicas (GARCÍA et al., 1997). Além disso, os tipos de interações proteína-proteína e proteína-água diferem conforme as preparações de proteína de soja (UTSUMI; KINSELLA, 1985).

As proteínas de soja contêm regiões polares ao longo de suas moléculas, o que facilita a absorção de água, mantendo-a no produto final, característica esta importante em produtos como iogurte e análogos de carnes. As proteínas de soja são tensoativas, agrupam-se nas interfaces óleo-água reduzindo a tensão superficial promovendo e estabilizando emulsões. Na absorção de gordura, as proteínas de soja permitem a sua retenção, reduzindo perdas em diversas etapas do processamento e consumo e ajudam a manter as dimensões originais dos alimentos evitando o seu encolhimento (SOUZA; VALLE; MORENO, 2000).

Como já mostrado na Figura 1.1 as proteínas de soja são menos solúveis na sua região isoelétrica (pH 4,2-4.6) aumentando muito a sua solubilidade em valores de pH acima ou abaixo desta região. Segundo Wolf (1970), os índices de solubilidade de proteína de soja para aplicação em emulsões, espumas e géis deve ser de mais de 90%, 60% para absorção de água em produtos de panificação, 30% em molhos, sopas, embutidos e alimentos infantis e de 15% para bebidas, cereais e biscoitos.

De modo geral, a capacidade de emulsificação das proteínas de soja aumentam com o aumento da solubilidade proteica e diminui com o aumento da concentração de proteína, enquanto a estabilidade da emulsão aumenta com o aumento da concentração proteica. As propriedades de emulsificação são ótimas em condições alcalinas e pobres na faixa de pH entre 5 e 6 (LIU, 1999).

1.4. Uso de polissacarídeos: pectina e carragena

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais de alto peso molecular que ocorrem em quase todos os organismos vivos onde exercem várias funções. São formados pela condensação de monossacarídeos ou seus derivados, unidos entre si por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos de menor peso molecular são na sua grande maioria solúveis em água e designados como hidrocolóides. Sua solubilidade se deve à sua facilidade de hidratação, com transferência das ligações de hidrogênio intermoleculares entre cadeias de polissacarídeos para ligações de hidrogênio polissacarídeo-água. Os hidrocolóides têm a capacidade de reter moléculas de água, formando géis ou soluções viscosas, isto é, têm a função de agentes espessantes ou geleificantes e estabilizadores de emulsões, além de efeitos secundários como a suspensão de partículas, controle da cristalização, inibição de sinérese, encapsulação e formação de filmes. As emulsões em alimentos são constituídas de partículas cujos tamanhos variam de 1 a 500 μ e formam dispersões e soluções que poderiam ser denominadas “dispersões grosseiras”, nas quais as partículas tendem a se separar e depositar, alterando assim a aparência, textura e, às vezes, o sabor dos alimentos. Estas dispersões e soluções podem ser estabilizadas pela adição de polissacarídeos adequados a cada caso (BOBBIO; BOBBIO, 1992; PENNA, 2003).

Os hidrocolóides podem ser extraídos de plantas marinhas (como é o caso da carragena), sementes, exsudados de árvores, colágeno animal, tecido de plantas (exemplo: pectina) ou serem produzidos por síntese microbiana, modificação química de polissacarídeos naturais e por síntese química. A Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (“FDA - Food and Drug Administration”), designa estes compostos como reconhecidos amplamente como seguros, GRAS (“generally recognized as safe”) (PENNA, 2003).

A pectina, polissacarídeo aniônico carboxilado de alto peso molecular, é constituído principalmente do metil éster de ácido poligalacturônico que contém proporção variável de grupos metoxila (Figura 1.2). É extraída comercialmente da

casca de citrus e maçã. As pectinas podem ter alto ou baixo teor de metoxilação. O grau de metoxilação (ou grau de esterificação) é a medida da proporção de grupos de ácido galacturônico metilados em relação ao total de grupos de ácido galacturônicos presentes na molécula de pectina, determinando assim, o tempo e as condições de geleificação e a força do gel de pectina. As de alto apresentam grau de metoxilação (GM) maior que 50%, geleificando em concentrações de 60 a 80% de sólidos solúveis e pH de 2,8 a 3,8. Podem ser utilizadas como estabilizante de proteínas em produtos a base de soja, como as misturas de proteínas de soja com sucos de frutas. As pectinas de baixa metoxilação apresentam GM inferiores a 50%, podendo formar gel em concentrações de sólidos solúveis de 10 a 70% e pH de 2,8 a 6,0, somente em presença de íons polivalentes como o cálcio e magnésio. Dentre essas pectinas encontram-se as amidadas, que contêm o grupo amida (TORREZAN, 2003).

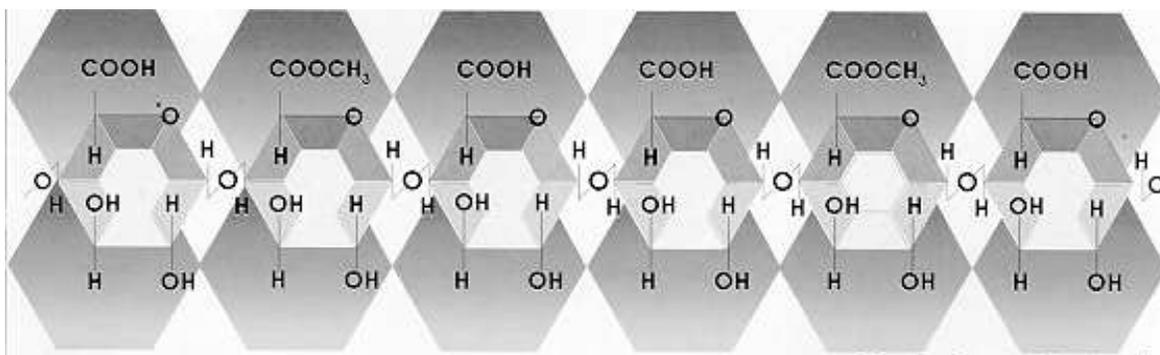


FIGURA 1.2. Ilustração de cadeia de pectina.

Fonte: Catálogo da CP Kelco Brasil S.A.

A carragena, polissacarídeo aniônico sulfatado extraído de certas espécies de algas vermelhas (*Rhodophyceae*), é amplamente utilizada pela indústria de alimentos como agente espessante, geleificante e estabilizante. Segundo Penna (2003) trata-se de galactana contendo D e L-galactose e 3,6 anidro-galactose. É constituída por três frações principais que se diferenciam pelo conteúdo e distribuição de grupos sulfato-éster e são designadas como: iota (ι), kappa (κ) e lambda (λ) carragena (Figura 1.3). O peso molecular e a estrutura dessas frações

determinam suas propriedades funcionais. A ι e κ -carragena apresentam capacidade para a formação de gel, já a λ -carragena atua apenas como espessante. A viscosidade da solução alcançada depende da concentração, temperatura, presença de outros sólidos, tipo da carragena e de seu peso molecular. A ι -carragena geleifica mais fortemente na presença de íons cálcio, formando gel elástico, claro e livre de sinérese que se recompõe depois de cisalhado. O pH não constitui fator importante para a geleificação da κ -carragena, no entanto, em pH abaixo de 4,0 pode não ocorrer a geleificação devido a hidrólise ácida (ELEYA; TURGEON, 2000). As proteínas com caráter anfótero precipitam com carragena se o pH da solução estiver abaixo do ponto isoelétrico. Em soluções que apresentam valores de pH acima do ponto isoelétrico ocorre forte interação entre as proteínas e a carragena.

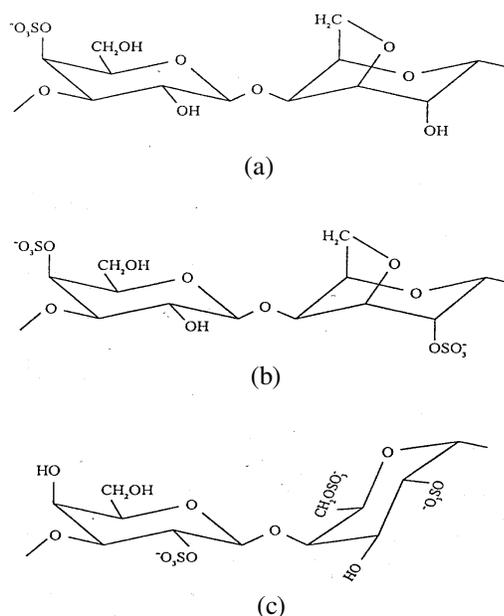


FIGURA 1.3 – Estruturas da carragena: (a) κ -carragena; (b) ι -carragena e (c) λ -carragena.

O interesse por hidrocolóides está baseado no seu comportamento reológico, isto é, na sua viscosidade que determina a sua habilidade de formar gel e seus efeitos estabilizantes. Estas propriedades podem ser obtidas somente depois da

solubilização completa da molécula, quando então, é capaz de se reorganizar através da retenção de moléculas de água (efeito de espessamento) ou pela construção de redes envolvendo zonas de ligação (efeito de geleificação). Todos os hidrocolóides podem ter estas duas propriedades desenvolvidas em maior ou menor extensão, dependendo de certas propriedades moleculares como o peso, espaço e presença ou não de grupos funcionais e outras condições do meio como a temperatura e interações com outros ingredientes: outros hidrocolóides e cátions. Estes parâmetros têm um efeito diferente em cada tipo de hidrocolóide e podem afetar fortemente a textura do produto final (PENNA, 2003).

1.5. A tecnologia de alta pressão

Segundo Anstine (2003), as pesquisas utilizando alta pressão para a preservação de alimentos começaram no final do século XIX. Os primeiros testes realizados já indicavam que o leite “in natura” tratado sob alta pressão mantinha-se fresco por mais tempo. No entanto, os primeiros produtos comerciais tratados sob alta pressão somente surgiram por volta de 1990 no Japão. A tecnologia de alta pressão que promove a eliminação de microrganismos e inativa enzimas, sem expor o alimento a altas temperaturas, mostrou-se viável e tem sido cada vez mais utilizada em todo o mundo para prolongar a vida-de-prateleira dos alimentos, afetando pouco o seu conteúdo de vitaminas, sabor, textura e cor. Essa tecnologia já foi aplicada com sucesso para a preservação de geléias, iogurtes, molhos, sobremesas prontas, sucos e polpas de frutas. No Japão é utilizada também para o descongelamento de peixe, estabilização de presunto e outros produtos de pescado (GRANT; PATTERSON; LEDWARD, 2000). Cheftel (1998) citou algumas empresas que têm utilizado comercialmente esta tecnologia no Japão no processamento de frutas, produtos cárneos, bebidas e produtos de arroz. Apenas para citar algumas das muitas possibilidades de aplicações da tecnologia de alta pressão, estudos têm avaliado a sua utilização para prolongar a vida-de-prateleira e controlar o amadurecimento de “kimchi” - um vegetal coreano (LEE; SOHN, 1998), reduzir a taxa de degradação de antioxidantes em suco de laranja em relação ao produto convencional (POLYDERA; STOFOROS; TAOUKIS, 2004),

alterar os açúcares que causam flatulência nas proteínas de leguminosas (PORZUCEK et al., 2005) e alterar a textura de bacalhau (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998).

O fator limitante do uso da tecnologia de alta pressão é o custo envolvido na aquisição dos equipamentos e do processamento. Avanços têm sido realizados no desenho e construção desses equipamentos para tornar os custos de processamento mais competitivos em relação à esterilização e ao congelamento. Estima-se que os custos para modificar a linha de processamento já existente para alta pressão esteja em torno de US\$ 0,0455 / libra, considerando-se a depreciação dos equipamentos como sendo de 10 anos (MEYER et al., 2000).

Há dois métodos de processamento sob alta pressão: o isostático e o de homogeneização ou dinâmico. O método isostático, denominado também como processamento a pressão ultra alta, concentra a maior parte dos estudos já realizados. O processo de alta pressão hidrostática (APH), como o próprio nome sugere, submete alimentos líquidos ou sólidos pré-embalados e selados em uma câmara contendo água a pressões acima de 100 MPa ($\cong 1.000$ atm). Nos sistemas comerciais, as pressões utilizadas estão na faixa de 400 a 700 MPa. A pressurização é realizada em espaço confinado contendo fluido (no caso da hidrostática é a água) que atua como o meio de transferência da pressão. A pressão é aplicada igualmente em todas as direções o que permite aos sólidos reterem o seu formato original. Uma das vantagens desse processo sobre os processos convencionais é que a compressão isostática independe do tamanho e geometria do produto. A pressão aplicada e o tempo de aplicação irão depender do tipo do produto a ser tratado e do produto final desejado. Normalmente, a inativação enzimática requer o uso de pressões mais elevadas do que a inativação microbiana (SAN MARTÍN; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 2002). O processo de pressão dinâmico (APD) ou contínuo (fluxo) é o sistema no qual dois pistões operam simultaneamente, sendo que enquanto um é preenchido com o alimento o outro o empurra contra a válvula de homogeneização. Esse processo baseia-se na movimentação dos fluídos e na ação de forças instantâneas que agem sobre os

sólidos imersos nesses líquidos. A destruição dos microrganismos ocorre pela ruptura da célula causada pelo aumento da pressão e tensão de cisalhamento. O processo é instantâneo, ocorrendo em mili-segundos. As pressões utilizadas estão na faixa de 30 a 350MPa. O alimento deve ser embalado ao final do processo em embalagem asséptica (WILLIAMS-CAMPBELL; SOLOMON, 2002; GRANT; PATTERSON; LEDWARD, 2000).

Segundo Smelt (1998), há dois princípios gerais que regem os efeitos do processamento sob alta pressão: Le Chatelier e isostático. O princípio de Le Chatelier diz que qualquer fenômeno (transição de fase, reatividade química, mudança de configuração molecular e reação química) que for acompanhado por uma redução de volume será favorecido pelo aumento da pressão. O princípio isostático indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através de um alimento, independentemente do seu tamanho ou geometria.

No caso do processamento de homogeneização sob alta pressão ou processo dinâmico a tensão é transmitida ao produto antes da etapa de homogeneização, a seguir, o produto passa através de um orifício concêntrico em altíssima velocidade onde a pressão é extremamente baixa, causando a evaporação do fluido e começando o processo de cavitação. A pressão de trabalho é atingida entre o intensificador de pressão e a válvula primária de homogeneização (após a qual ocorre a maior despressurização) (POPPER; KNORR, 1990).

1.6. A tecnologia de alta pressão e as proteínas da soja

O uso da alta pressão para modificar a funcionalidade das proteínas foi revisado por Messens, Van Camp e Huyghebaert (1997) e Galazka, Dickinson e Ledward (2000b). Segundo estes autores, a alta pressão pode afetar a conformação das proteínas levando a sua desnaturação, agregação ou geleificação, dependendo do sistema proteico (tipo de proteína, pH, força iônica), pressão aplicada, temperatura e duração do tratamento. Os efeitos do tratamento sob alta pressão sobre as proteínas estão relacionados com a ruptura das interações não-covalentes na

estrutura das moléculas de proteínas e a subsequente nova formação de pontes internamente ou entre moléculas de proteínas. A alta pressão pode romper interações eletrostáticas. As pontes de hidrogênio não são afetadas pela alta pressão. As estruturas terciárias e quaternárias podem ser modificadas em pressões maiores que 200 MPa. As proteínas oligoméricas podem ser dissociadas em sub-unidades usando pressões moderadas (< 150 MPa) (MESSENS; VAN CAMP; HUYGHEBAERT, 1997).

Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) comprovaram que o uso da alta pressão pode melhorar a atividade emulsionante das proteínas de soja. Estes autores estudaram a influência do tratamento sob alta pressão (200 - 600 MPa) no índice de atividade emulsificante (IAE) e a do índice de estabilidade da emulsão (IEE) sobre as frações 7S, 11S e isolados de soja em valores de pH de 6,5 e 7,5 em diferentes concentrações (0,25-0,75%). A fração 7S exibiu o maior valor de IAE e hidrofobicidade superficial após o tratamento a 400 MPa, enquanto que a fração 11S mostrou o mais alto IAE e hidrofobicidade superficial após o tratamento a 200MPa. O isolado de soja revelou maior valor de IAE após o tratamento a 400MPa, embora tenha apresentado baixa hidrofobicidade superficial.

Molina, Defaye e Ledward (2002) estudaram as propriedades de textura e capacidade de retenção de água em géis formados sob alta pressão (300-700MPa/15 minutos). A 20% de concentração, isolado de soja e suas maiores frações de globulinas 7S e 11S produziram géis auto-estáveis. Os géis induzidos sob alta pressão apresentaram menores valores de adesividade e dureza quando comparados com os géis formados pelo tratamento térmico (95°C/ 15 ou 30 minutos). O tratamento sob alta pressão melhorou a capacidade de retenção de água dos géis formados pela fração 7S e em alguns casos do isolado de soja. As análises por calorimetria diferencial de varredura e eletroforese em gel de poliácridamida mostraram evidências da desnaturação e agregação das proteínas durante a formação do gel, sendo intensificadas com o aumento da pressão.

Roesch e Corredig (2003) estudaram emulsões de óleo em água, contendo diferentes porções de concentrado de soja, e analisaram suas características de estabilidade, tamanho das partículas, absorção superficial, microestrutura e propriedades reológicas. Observaram que o tratamento térmico à 82°C por 2 minutos, seguido de tratamento sob pressão de homogeneização à 80 MPa, resultou em emulsões com certas propriedades de geleificação que permaneceram estáveis ao armazenamento por 20 dias a 4°C.

Apichartsrangkoon (2003) submeteu concentrado hidratado de soja (80% de umidade) ao tratamento sob pressão de 200, 400, 600 e 800 MPa, a 20 e 60°C por 20 e 50 minutos. Após os tratamentos foram analisados o comportamento viscoelástico, solubilidade do nitrogênio e seus perfis eletroforéticos; verificando-se que as características reológicas são mais afetadas pela temperatura do que pelo tratamento sob pressão e que há limitadas formações de pontes dissulfídicas nos sistemas induzidos de formação de gel pela temperatura e pressão.

Molina e Ledward (2003) investigaram os efeitos da combinação dos tratamentos térmico (90°C/15 minutos) e sob alta pressão (300-700 MPa) nas propriedades de textura dos géis de isolado de soja e das frações 7S e 11S a 12% de concentração de proteína (p/v) em pH neutro. Evidenciaram que somente a fração 11S forma gel quando tratada termicamente. Quando o tratamento térmico foi realizado antes do tratamento sob alta pressão, apenas a fração 11S formou gel auto-estável. No entanto, quando o tratamento sob pressão foi realizado antes do térmico, todas as proteínas analisadas formaram géis auto-estáveis. As análises das características da textura e da capacidade de retenção de água dos géis formados comprovaram que a combinação do tratamento térmico e alta pressão oferece a possibilidade de desenvolver novos produtos com novas texturas, indicando a necessidade de outros estudos para investigar as causas dessas diferenças.

Puppo et al. (2004) estudaram as mudanças físico-químicas induzidas pelo tratamento sob alta pressão isostática (200-600 MPa) em isolados de soja em pH

3,0 (IS3) e pH 8,0 (IS8). No IS8 foi observado aumento na hidrofobicidade superficial e agregação da proteína, redução do conteúdo de sulfidril livre, desdobramento parcial das frações 7S e 11S e mudanças na estrutura secundária (tornando-a mais desordenada). O IS3 foi parcialmente desnaturado, apresentando agregados insolúveis e maior desdobramento molecular. Esse isolado revelou decréscimo na estabilidade térmica, aumento da solubilidade proteica e da hidrofobicidade, decréscimo do conteúdo de sulfidril livre e total desnaturação nos tratamentos de 400 – 600 MPa.

O homogeneizador de alta pressão (20 a 350 MPa) foi utilizado por Flourey, Desrumaux e Legrand (2002) para avaliar como a pressão dinâmica poderia afetar a conformação da globulina da soja, analisando-se a estrutura das emulsões e reologia. Foi observado que a alta pressão dinâmica causa a desnaturação das proteínas devido à forte força mecânica do tratamento e aumento da temperatura que o material sofre ao passar pela válvula. Os tamanhos das gotículas das emulsões foram reduzidos e o comportamento Newtoniano das emulsões foi modificado para um tipo de gel nos tratamentos acima de 250 MPa.

Há também na literatura, relatos sobre o efeito da alta pressão na indução da geleificação em extrato hidrossolúvel de soja, utilizando o sistema isostático. De acordo com os estudos realizados por Kajiyama et al. (1995), o extrato hidrossolúvel de soja mudou do estado líquido para sólido após o tratamento a 500 MPa por 30 minutos. Quando submetido a pressões menores ou iguais a 500 MPa, por 10 minutos, o extrato hidrossolúvel de soja permaneceu em estado líquido e melhorou sua estabilidade. Entretanto, ocorreu redução na sua capacidade emulsificante. A solubilidade da proteína foi afetada pelo tratamento sob pressão, alterando o ponto isoelétrico de pH 4,1-4,3 para 4,5-4,7. O extrato hidrossolúvel de soja original apresentou maior solubilidade em pH abaixo de 3,0 e moderada solubilidade em pH 5,7-6,7. O tratamento sob pressão reduziu a solubilidade abaixo de pH 3,0 e aumentou a solubilidade acima de pH 5,6.

Zhang et al. (2005) avaliaram os efeitos da alta pressão sobre as proteínas em extrato hidrossolúvel de soja utilizando várias técnicas analíticas. Os resultados da

espectrofluorimetria revelaram que as proteínas de soja exibem mais regiões hidrofóbicas após o tratamento sob alta pressão. Análises de eletroforese mostraram que as proteínas de soja são dissociadas pela alta pressão em subunidades, que sofrem agregação, formando compostos insolúveis. A alta pressão induziu a formação de gel de tofu.

1.7. Interações entre proteínas e os polissacarídeos pectina e carragena

A interação entre proteínas e polissacarídeos exerce influência direta sobre as propriedades macroscópicas dos alimentos, tais como fluidez, estabilidade e textura. Segundo Tolstoguzov (1991), as interações entre proteínas e polissacarídeos podem resultar em três conseqüências: 1) co-solubilidade; 2) incompatibilidade e 3) complexação. Doublier et al. (2000) revisaram as interações entre proteínas e polissacarídeos sob o ponto de vista dos fenômenos segregativos e associativos de separação de fases com ênfase no mecanismo envolvido e na estrutura final dos sistemas terciários. Kruif e Tuinier (2001) revisaram as interações entre proteínas e polissacarídeos sob o ponto de vista termodinâmico, discutindo as situações nas quais esses biopolímeros interagem em soluções e citando alguns exemplos.

Benichou, Aserin e Garti (2002) afirmaram que sob condições específicas de proporções adequadas de proteína e polissacarídeos (pH, força iônica, temperatura e processo de mistura), as proteínas e polissacarídeos formam complexos com propriedades funcionais melhores em comparação às proteínas e polissacarídeos utilizados separadamente. Segundo Grinberg e Tolstoguzov (1997) e Syrbe, Bauer e Klostermeyer (1998), os efeitos do pH no comportamento da mistura proteína-polissacarídeo diferem dependendo da natureza do polissacarídeos (neutro, carboxilado ou sulfatado). Para as misturas proteína-polissacarídeos neutros, o pH afeta somente a auto-associação da proteína. A incompatibilidade da proteína-polissacarídeo aumenta em pH próximo ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, no qual há a tendência da proteína auto-associar-se. Para os sistemas proteína e polissacarídeos aniônicos (carboxilados ou

sulfatados), o pH exerce efeito de auto-associação da proteína e de associação cruzada da proteína e polissacarídeos. Uma complexa coacervação é observada em pH inferior ao pI da proteína, em que os dois polímeros apresentam cargas opostas. Em valores de pH acima do pI da proteína, ambos os polímeros têm cargas negativas, a complexação é inibida e pode ocorrer a incompatibilidade. Para os polissacarídeos sulfatados, um complexo solúvel proteína-polissacarídeo pode ocorrer em pH acima do pI resultando na atração entre os resíduos de proteína (NH_3^+) com os do hidrocolóide (OSO_3^-). Essa atração é particularmente intensa quando ambos proteína e polissacarídeo sulfatado estão carregados negativamente.

Maroziane e Kruif (2000) estudaram a influência da pectina (baixo teor de metoxila-BTM; baixo teor de metoxila amidada-BTMA e alto teor de metoxila – ATM) sobre a estabilidade do leite. Em pH 6,7 com concentração 0,2% de BTMA ou ATM foi observada diminuição na capacidade de floculação das micelas de caseína, fato também observado no caso da pectina BTM em concentração de 0,1%. Esse mecanismo envolve a exclusão das cadeias do polímero de pectina do espaço entre as partículas coloidais que induzem atração efetiva entre as micelas de caseína, o que pode causar a separação de fases se a atração for suficientemente forte. Em pH 5,3 as moléculas de pectina são adsorvidas pelas micelas de caseína. Em concentração de pectina não suficiente para cobrir as micelas de caseína foi observado o aparecimento de pontes de floculação. Com o aumento da concentração de pectina o sistema torna-se estável.

A formação de complexos entre a pectina de maçã e a proteína isolada de soro de leite foram avaliados por Zaleska, Ring e Tomasik (2000). A formação dos complexos seguiu modelo cinético de primeira ordem. As interações mais fortes entre a pectina e a proteína envolveram os grupos carboxílicos da pectina e as ligações peptídicas da proteína. Os complexos não formaram filmes.

O efeito de diferentes concentrações de κ -carragena sobre a força do gel, cinética de geleificação e microestrutura do gel de albumina de soro bovino (ASB) em

diferentes condições de pH e força iônica, com ou sem adição de cloreto de potássio, foi pesquisado por Neiser, Draget e Smidsrød (2000). Dois tipos distintos de efeitos foram observados: alta força de gel nas condições do ponto isoelétrico da ASB ou ligeiramente acima deste, baixa força iônica e alta concentração de carragena (~0,4-1,0% p/v) e menor força de gel em pH mais alto, força iônica total e baixa concentração de carragena (~0,2-0,4 % p/v). O líquido removido do gel por centrifugação apresentou concentração de carragena mais baixa do que o gel original em baixo pH e força iônica, indicando separação de fase associativa. A cinética de geleificação desses géis diferem do gel puro de ASB ou de carragena, sugerindo forte interação entre os polímeros.

Park, Cho e Rhee (2001) estudaram o efeito da adição das gomas guar e carragena sobre as propriedades funcionais da proteína isolada de soja (PIS). A incorporação de ar e a estabilidade da espuma foram melhoradas nos sistemas contendo PIS pela adição crescente dessas gomas, sendo sempre superiores quando comparados aos sistemas sem a adição de guar ou carragena. O melhor valor de incorporação de ar e estabilidade da espuma foram alcançados quando foi utilizada a adição de uma dessas gomas na concentração de 0,5%.

Hua, Cui e Wang (2003) investigaram as propriedades de formação de gel da proteína de soja quando utilizadas em misturas com gomas (carragena, xantana, alginato e locusta). A força do gel formado entre a proteína de soja e a carragena alcançou os limites mais altos e os mais baixos conforme a concentração dos constituintes da mistura, indicando a ocorrência de mudança de fase.

1.8. Efeito da alta pressão sobre as interações proteína-polissacarídeos

O tratamento sob alta pressão além de preservar os alimentos pode modificar as propriedades funcionais dos seus constituintes (MONTERO; FERNÁNDEZ-DIAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002). Ao contrário do que ocorre no tratamento térmico, as moléculas pequenas como os aminoácidos, vitaminas e os componentes do sabor permanecem inalterados após o tratamento sob alta pressão. No entanto, as ligações não-covalentes das proteínas e moléculas maiores podem ser alteradas

(O'REILLY et al., 2001). Em alta pressão (acima de 200 MPa) muitas proteínas tendem a sofrer desdobramentos e podem ocorrer re-associações de subunidades dissociadas de oligossacarídeos (PUPPO et al., 2004).

Galazka, Dickinson e Ledward (1999a) compararam o efeito do tratamento térmico (> 80°C por 2 min) e do tratamento sob alta pressão isostática (> 250MPa, por 20 min) sobre as propriedades de emulsificação da globulina 11S de *Vicia faba* (pH=8,0) adicionada de ι ou κ -carragena. Na medida em que se aumentou a temperatura do tratamento ou a pressão, houve tendência à diminuição da eficiência de emulsificação e de estabilidade da emulsão. A adição de ι ou κ -carragena (3:3-7:1 por peso) à proteína nativa sob baixa força iônica levou à obtenção de gotículas menores, cujo tamanho decresceu com o aumento da concentração desses polissacarídeos e da pressão aplicada (> 200 MPa). A presença de ι -carragena levou à obtenção das menores gotículas na emulsão fresca e a melhor estabilidade em relação ao comportamento visual da emulsão já preparada. Em todos os casos, a presença de ι -carragena melhorou a estabilidade da emulsão. No entanto, a presença de κ -carragena nas amostras tratadas (<75°C) e não-tratadas termicamente causou rápida separação de soro, provavelmente devido à floculação depletiva. A força de interação da globulina 11S com ι ou κ -carragena dependem da densidade de carga do polissacarídeo. A presença de polissacarídeos nas amostras submetidas ao tratamento térmico e sob alta pressão inibiram a formação de agregados.

Soluções de albumina de soro bovino (ASB) (5 mg/ml) submetidas ao processo de alta pressão (600 MPa por 20 minutos) adicionadas de ι ou κ -carragena (2,5:1), em pH neutro e baixa força iônica mostraram a redução da hidrofobicidade superficial da proteína (GALAZKA et al., 1999b). A adição de ι ou κ -carragena reduziram tanto a entalpia total calorimétrica (ΔH) quanto a temperatura de desnaturação da proteína (T_d). Os resultados da cromatografia de exclusão molecular à baixa força iônica indicaram que uma fraca interação eletrostática para ASB - ι ou κ -carragena a pH 7, torna-se mais intensa a pH 6,5. A

complexação de ASB com polissacarídeos em condições de baixa força iônica parece proteger a proteína globular da agregação proteica induzida pela pressão.

Dickinson e James (2000) estudaram a influência do tratamento sob alta pressão sobre as associações de β -lactoglobulina e pectina de baixo teor de metoxila em emulsões e géis. Estes autores observaram mudanças reológicas na emulsão causadas pela floculação das gotículas que foram mais evidentes em baixo pH, particularmente próximo ao ponto isoelétrico. Mudanças no comportamento da emulsão indicaram a complexação da proteína e pectina induzida pelo tratamento sob pressão. Em pH neutro, a presença de pectina durante o tratamento sob alta pressão contribuiu para o fortalecimento do gel.

A influência do tratamento sob alta pressão (200 MPa, 20 minutos) sobre as interações da globulina 11S de *Vicia faba* com a ι -carragena em solução, na interface e propriedades de emulsão, em condições de baixa força iônica e pH 8,0 foram avaliadas por Galazka, Dickinson e Ledward (2000a). A adição de ι -carragena à globulina 11S reduziu a temperatura de desnaturação, o valor da entalpia e a hidrofobicidade superficial e protegeu a globulina contra a agregação induzida pela alta pressão.

Referências Bibliográficas

ANGSUPANICH, K.; LEDWARD, D. A. High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. **Food Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 39-50, 1998.

ANSTINE, T. T. High-pressure processing for safe, quality foods. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 48, n. 1, p. 5,7-8, 2003.

ANTHONY, M. S.; POTTER, S. M.; SCHONFELD, G.; SCOTT, L. W.; WILLIAMS, C. L. **Soy protein and health: discovering a role for soy protein in the fight against coronary heart disease**, St. Louis: Protein Technologies International. 1996. 24 p.

APICHARTSRANGKOON, A. Effects of high pressure on rheological properties of soy protein gels. **Food Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 55-60, 2003.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Protein polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 23, n. 1-3, p. 93-123, 2002.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2^a ed. 1^a reimpressão. São Paulo: Livraria Varela Ltda. 1992. 223 p.

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. 2^a ed. London: Academic Press. 2002. 427 p.

BROOKS, J. R.; MORR, C. V. Effect of phytate removal treatments upon the molecular weight and subunit composition of major soy protein fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1128-1132, 1985.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional e modificaciones químicas**. Zaragoza: Editorial Acribia S. A. 1989. 346 p.

CHEFTEL, J. C. Commercial pressurized foods in Japan. In: ISAACS, N. S. (ed.). **High pressure food science, bioscience and chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1998. p. 506 - 507.

DAMODARAN, S. Refolding of thermally unfolded 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.

DICKINSON, E.; JAMES, J. D. Influence of high-pressure treatment on β -lactoglobulin-pectin associations in emulsions and gels. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 4, p. 365-376, 2000.

DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, n. 3-4, p. 202-214, 2000.

ECIRTEC. Notícias sobre agro-business e tecnologia. Disponível <http://br.groups.yahoo.com/group/ecirtec/message/19> [capturado em 05/09/2003].

ELEYA, M. M. O.; TURGEON, S. L. The effects of pH on the rheology of β -lactoglobulin/ κ -carrageenan mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 245-251, 2000.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LEGRAND, J. Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 9, p. 3388-3395, 2002.

FURUKAWA, T.; OHTA, S.; YAMAMOTO, A. Texture-structure relationship in heat-induced soy protein gels. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 10, n.4, p. 333-346, 1979.

GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A. Emulsifying behaviour of 11S globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure treatments. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 425-435, 1999a.

GALAZKA, V. B.; SMITH, D.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. **Food Chemistry**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 303-310, 1999b.

GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A. Influence of high pressure on interactions of 11S globulin *Vicia faba* with ι -carrageenan in bulk solution and at interfaces. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 551-560, 2000a.

GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A. Influence of high pressure on protein solutions and emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.5, n. 3-4, p. 182-187, 2000b.

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

GRANT, S.; PATTERSON, M.; LEDWARD, D. Food processing gets freshly squeezed. **Chemistry & Industry**, Londres, v. 2, p. 55-58, 2000.

GRINBERG, V. Ya.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 145-158, 1997.

HALL, G. M. Basic concepts. In: HALL, G. M. (ed.) **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 1-10.

HASHIZUME, K.; NAKAMURA, N.; WATANABE, T. Influence of ionic strength on conformation changes of soybean proteins caused by heating, and relationship of its conformation changes to gel formation. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 39, n. 7, p. 1339-1347, 1975.

HUA, Y.; CUI, S. W.; WANG, Q. Gelling property of soy protein - gum mixtures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 889-894, 2003.

KAJIYAMA, N.; ISOBE, S.; UEMURA, K.; NOGUCHI, A. Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 147-158, 1995.

KESTER, J. J.; RICHARDSON, T. Modification of whey proteins to improve functionality. **Journal of Dairy Sciences**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 2757-2774, 1984.

- KITAMURA, K. Genetic improvement of nutritional and food processing quality in soybean. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 1-8, 1995.
- KNUCKLES, B. E. ; KUZMICKY, D. D.; BETSCHART, A. A. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on *in vitro* protein digestibility. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 4, p. 1080-1082, 1985.
- KRONES. Sucos: consumo da bebida a base de soja aumenta no Brasil. **Boletim Eletrônico da Kronos S/A**, n.6, setembro de 2002. Disponível <http://www.krones.com.br/Boletim/Edicao6/materia6.htm> [acesso em 05/09/2003].
- KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 4-6, p. 555-563, 2001.
- LAJOLO, F. M.; TIRAPGUI, J. Proteínas e aminoácidos. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. (org.) **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. p.40-69.
- LEE, H. J; SOHN, K. H. Effects of high pressure treatment on the quality and storage of kimchi. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 359-365, 1998.
- LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc. 1999. 532p.
- MA, C. Y.; HARWALKAR, V. R. Thermal analysis of food proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 35, p. 317-366, 1991.
- MAGA, J. A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, n. 1, p. 1-9, 1982.

MAROZIENE, A.; KRUIF, C. G. Interaction of pectin and casein micelles. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 391-394, 2000.

MATTIL, K. F. The functional requirements of proteins for foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 48, n. 9, p. 477-480, 1971.

MELLO, P. C. Brasileiro já não abre mão de supérfluos. **O estado de São Paulo/Economia**, Terça-feira, 10 de setembro de 2002. Disponível: <http://www5.estado.com.br/editorias/2002/09/10/eco029.html> [capturado em 05/09/2003].

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.

MEYER, R. S.; COOPER, K. L.; KNORR, D.; LELIEVELD, H. L. M. High-pressure sterilization of foods. **Food Technology**, Chicago, v. 54, n. 11, p. 67,68,70,72, 2000.

MOLINA, E.; DEFAYE, A. B.; LEDWARD, D. A. Soy protein pressure-induced gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 625-632, 2002.

MOLINA, E.; LEDWARD, D. A. Effects of combined high-pressure and heat treatment on the textural properties of soya gels. **Food Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 3, p. 367-370, 2003.

MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 263-269, 2001.

MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 197-205, 2002.

NEISER, S.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Gel formation in heat-treated bovine serum albumin - κ -carrageenan systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 95-110, 2000.

NUTRISOY. Benefícios à saúde quadruplicam consumo de soja no Brasil. Disponível: <http://www.nutrisoy.com.br/noticias/noticias.asp?nt=58> [capturado em 05/09/2003].

O'REILLY, C. E.; KELLY, A. L.; MURPHY, P. M.; BERESFORD, T. P. High-pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 12, n. 2, 51-59, 2001.

PARK, S. K.; CHO, J.M.; RHEE, C. O. Effect of guar gum, carrageenan and calcium chloride on foaming properties of soy protein isolate. **Food Science Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 257-260, 2001.

PEARSON, A. M. Soy proteins. In: HUDSON, B. J. F. (ed.). **Developments in food proteins** – vol 2. London: Applied Science Publishers Ltd, p. 67-108. 1983.

PENNA, A. L. B. **Hidrocolóides**: usos em alimentos. Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas. Disponível: http://www.revistafi.com.br/Main/revistas/ed_17/pdf/p&da.pdf. [acesso em 06/12/2003].

PETRUCELLI, S.; AÑON, M. C. pH induced modifications in the thermal stability of soybeans protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3005-3009, 1996.

POLYDERA, A. C.; STOFOROS, N. G.; TAOUKIS, P. S. The effect of storage on the antioxidant activity of reconstituted orange juice which had been pasteurized by high pressure or heat. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 783-791, 2004.

POPPER, L.; KNORR, D. Application of high-pressure homogenization for food preservation. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 7, p. 84, 86-89, 1990.

PORZUCEK, H.; DUSZKIEWICZ-REINHARD, W.; PIECYK, M.; KLEPACKA, M.; GNIEWOSZ, M. Changes to flatulence-causing sugar in legume proteins by High pressure treatment. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 5, n. 2 (disponível: <http://www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/food/art-07.html> acessado em 18/08/2005)

PUPPO, C.; CHAPLEAU, N.; SPERONI, F.; LAMBALLERIE-ANTON, M. de; MICHEL, F.; AÑON, C.; ANTON, M. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 6, p. 1564-1571, 2004.

RHAM, O. de; JOST, T. Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 596-600, 1979.

ROESCH, R.; CORREDIG, M. Texture and microstructure of emulsions prepared with soy protein concentrate by high-pressure homogenization. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 113-124, 2003.

SAN MARTÍN, M. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 42, n. 6, p. 627-645, 2002.

SCHENZ, T. W.; MORR, C. V. Viscosity. In: HALL, G. M. (ed.). **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 61-75.

SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 152-158, 1998.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

- SLOAN, E. Top ten trends to watch and work on for the millennium. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 8, p. 40-58, 60, 1999.
- SOLORZA, F. J.; BELL, A. E. Effect of calcium, fat and total solids on the rheology of a model soft cheese system. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 48, n. 4, p. 133-139, 1995.
- SOUZA, G. de; VALLE, J. L. E. do; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 61-69, 2000.
- SOY proteins. Disponível em:
<<http://www.dairyfoods.com/articles/2000/1200/0012it.htm>> Acesso: 15/06/2002.
- SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems – an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 3, p. 179-193, 1998.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 429-468, 1991.
- TORREZAN, R. Geléia de fruta. In: EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: frutas em calda, geléias e doces**. Brasília, 2003. p. 31-46.
- 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**, Chicago, v. 50, n. 5, p. 1278-1282, 1985.
- VEN, C. van der; MATSER, A. M.; BERG, R. W. van den. Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1087-1092, 2005.

- VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. (ed.). **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 11-60.
- VOUTSINAS, L. P.; NAKAI, S.; HARWALKAR, V. R. Relationships between protein hydrophobicity and thermal functional properties of food proteins. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, Ontario, v. 16, n. 3, p. 185-190, 1983.
- WAGNER, J. R. ; GUÉGUEM, J. Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 1. Emulsifying properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 6, p. 2181-2187, 1999.
- WILLIAMS-CAMPBELL, A. M.; SOLOMON, M. B. Reduction of spoilage microorganisms in fresh beef using hydrodynamic pressure processing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 3, p. 571-574, 2002.
- WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical, and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.
- YAMAUCHI, F.; YAMAGISHI, T.; IWABUCHI, S. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 7, n. 3, 283-322, 1991.
- ZALESKA, H.; RING, S. G.; TOMASIK, P. Apple pectin complexes with whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 377-382, 2000.
- ZHANG, H.; LI, L.; TATSUMI, E.; ISOBE, S. High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 7-14, 2005.

Capítulo 2

Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre as propriedades funcionais tecnológicas da proteína de soja

Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre as propriedades funcionais tecnológicas da proteína de soja

RESUMO

O isolado proteico de soja (IPS) é um produto com pelo menos 90% de proteínas, que devido às suas características físico-químicas, possui certas propriedades funcionais tecnológicas, que influenciam a sua aceitação e utilização como ingrediente em produtos cárneos, alimentos infantis, bebidas e produtos de panificação. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento sob alta pressão isostática sobre as características funcionais (solubilidade, índice de atividade emulsificante e características reológicas) do IPS. Foram utilizados dois planejamentos fatoriais completos (2^3), um em cada faixa de pH estudada (2,66-4,34 e 5,16-6,84). As variáveis independentes foram a concentração de proteína (0,32 a 3,68%), pH e nível de pressão aplicada (198 a 702 MPa), obtendo-se as superfícies de respostas. De cada planejamento fatorial completo foram selecionados os ensaios que apresentaram as maiores respostas em cada característica funcional estudada (solubilidade, índice de atividade emulsificante e G''). Foram avaliadas também o teor de sulfidril livre, comportamento eletroforético, grau de desnaturação das proteínas (calorimetria diferencial de varredura - CDV), perfil cromatográfico e documentação da microestrutura. A solubilidade proteica foi fortemente influenciada pela variável pH em ambas as faixas de pH estudadas. O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi influenciado pelas variáveis estudadas, sendo que a concentração de IPS influenciou negativamente o IAE em ambas as faixas de pH estudadas. Nos experimentos realizados, o módulo de perda ou componente viscoso (G'') foi o componente dominante, exibindo um comportamento predominantemente viscoso, sendo influenciado por todas as variáveis estudadas. A análise das amostras selecionadas mostrou que o tratamento sob alta pressão diminuiu em maior ou menor grau o teor de sulfidril livre de todas as amostras analisadas, evidenciando uma mudança na molécula da proteína, confirmada pelas alterações observadas

nas demais análises realizadas (CDV, cromatografia, eletroforese e microscopia eletrônica).

Palavras-chave: proteína isolada de soja; alta pressão isostática, solubilidade proteica; índice de atividade emulsificante; módulo de perda.

SUMMARY

Soy protein isolate (SPI) contains at least 90% protein and its physico-chemical characteristics define some functional properties that influences its use as an ingredient in meat products, baby foods, beverages and baking products. Simultaneous measurement of the effects of soy protein concentration, pH and high pressure treatment at room temperature on protein solubility, emulsifying activity index (EAI) and rheological properties (loss modulus, G'') of soy protein isolate (SPI) were evaluated. Central composite rotatable designs (2^3) were employed over two pH ranges (2.66 to 4.34 and 5.16 to 6.84) with SPI concentration (0.32 to 3.68%) and pressure (198 to 702 MPa) as the other independent variables. The surface responses were obtained for protein solubility, emulsifying activity index (EAI) and G'' . The samples with the highest effect on protein solubility, EAI and G'' value were evaluated as well by electrophoresis, differential scanning calorimetry (DSC), chromatography (HPLC), free sulphhydryl groups determination and scanning electronic microscopy (SEM). The pH was the main factor that affected protein solubility in both pH ranges. The studied variables influence the EAI. SPI concentration influenced negatively the EAI in both pH ranges. Loss modulus (G'') was found as the main component and it has been influenced by all studied variables. The selected samples analysis showed that high pressure treatment decreased in larger or minor degree the free sulphhydryl content of all analyzed samples standing out a structural change confirmed by means of the other analyses (DSC, HPLC, electrophoresis and SEM).

Keywords: soy protein isolate; isostatic high pressure; protein solubility; emulsifying activity index; loss modulus.

1. Introdução

A tecnologia de alta pressão, que promove a eliminação de microrganismos e inativa enzimas sem expor o alimento a altas temperaturas, mostra-se uma tecnologia viável e cada vez mais utilizada em todo o mundo para prolongar a vida-de-prateleira dos alimentos, afetando pouco o seu conteúdo de vitaminas, sabor, textura e cor. O tratamento sob alta pressão pode afetar também a funcionalidade tecnológica das proteínas, alterando a sua conformação, levando assim à desnaturação, agregação ou geleificação, dependendo do sistema proteico (tipo de proteína, pH, força iônica), pressão aplicada, temperatura e duração deste tratamento (MESSENS; VAN CAMP; HUYGHEBAERT, 1997).

As propriedades funcionais tecnológicas têm sido definidas como qualquer propriedade dos alimentos ou de seus componentes, excetuando-se as nutricionais, que influenciem a sua aceitação e utilização (SGARBIERI, 1996). Essas dependem das propriedades físicas e químicas das proteínas, que são muito importantes para o preparo de determinados alimentos, afetando sua conservação, estocagem e aceitação pelos consumidores. Segundo Cheftel, Cuq e Lorient (1989), as propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas em hidrofílicas, intermoleculares e interfásicas. As propriedades hidrofílicas dependem das interações proteína-água (solubilidade, capacidade de hidratação e de retenção de água, adesividade, dispersibilidade e viscosidade). As propriedades intermoleculares dependem da capacidade das interações proteína-proteína ou das moléculas de proteína com outros componentes (precipitação, geleificação, formação de fibras e pastas proteicas). Já as propriedades interfásicas ou de superfície dependem da capacidade de união das moléculas de proteínas para formarem película entre duas fases imiscíveis (tensão superficial, emulsificação e capacidade de formação de espuma).

O pH exerce forte influência sobre a funcionalidade das proteínas, visto que várias propriedades funcionais dependem do estado de ionização de grupos ionizáveis na molécula proteica e deveria ser sempre indicado em todas as descrições de métodos utilizados (HALL, 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento sob alta pressão isostática sobre as características funcionais (solubilidade proteica, Índice de Atividade Emulsificante - IAE e valor de G") do isolado proteico de soja em valores de pH na faixa de 2,66 a 4,34 e de 5,16 a 6,84. Para esta avaliação foi utilizada a metodologia de superfície de resposta em planejamentos fatoriais completos 2^3 , tendo como variáveis a concentração de isolado proteico de soja (%IPS), pH e nível de pressão aplicada. Os ensaios que apresentaram as maiores respostas em cada característica funcional estudada (solubilidade, índice de atividade emulsificante e G") foram avaliados também quanto ao teor de sulfidril livre, comportamento eletroforético, grau de desnaturação das proteínas (calorimetria diferencial de varredura), perfil cromatográfico e documentação da microestrutura.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Isolado proteico de soja

O isolado proteico de soja (IPS) foi obtido a partir da farinha desengordurada de soja (ProsamR®, Bunge Alimentos Ltda.), por extração alcalina (pH 8,0) seguido por precipitação em pH 4,5 e neutralização, conforme o descrito por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001), com modificações mostradas na Figura 2.1. A mistura de farinha desengordurada de soja e água foi agitada por duas horas em agitador magnético. As etapas de centrifugação foram realizadas em centrífuga mantida à 4°C (Sorvall®, RC-5C), utilizando o rotor SLA-3000, com capacidade para 6 frascos de 500 mL. A etapa de filtração foi realizada em funil revestido com algodão hidrófilo. Após o seu preparo, este produto foi acondicionado em bandejas de alumínio e mantido em câmara de congelamento à -18°C, sendo a seguir, liofilizado. Após a liofilização o material foi triturado para a granulometria de 100 mesh, em moinho de martelos Laboratory Mill 3100 (Perten, Suécia), embalado em porções de 400-500 g em sacos plásticos duplos selados e armazenados em local seco e arejado.

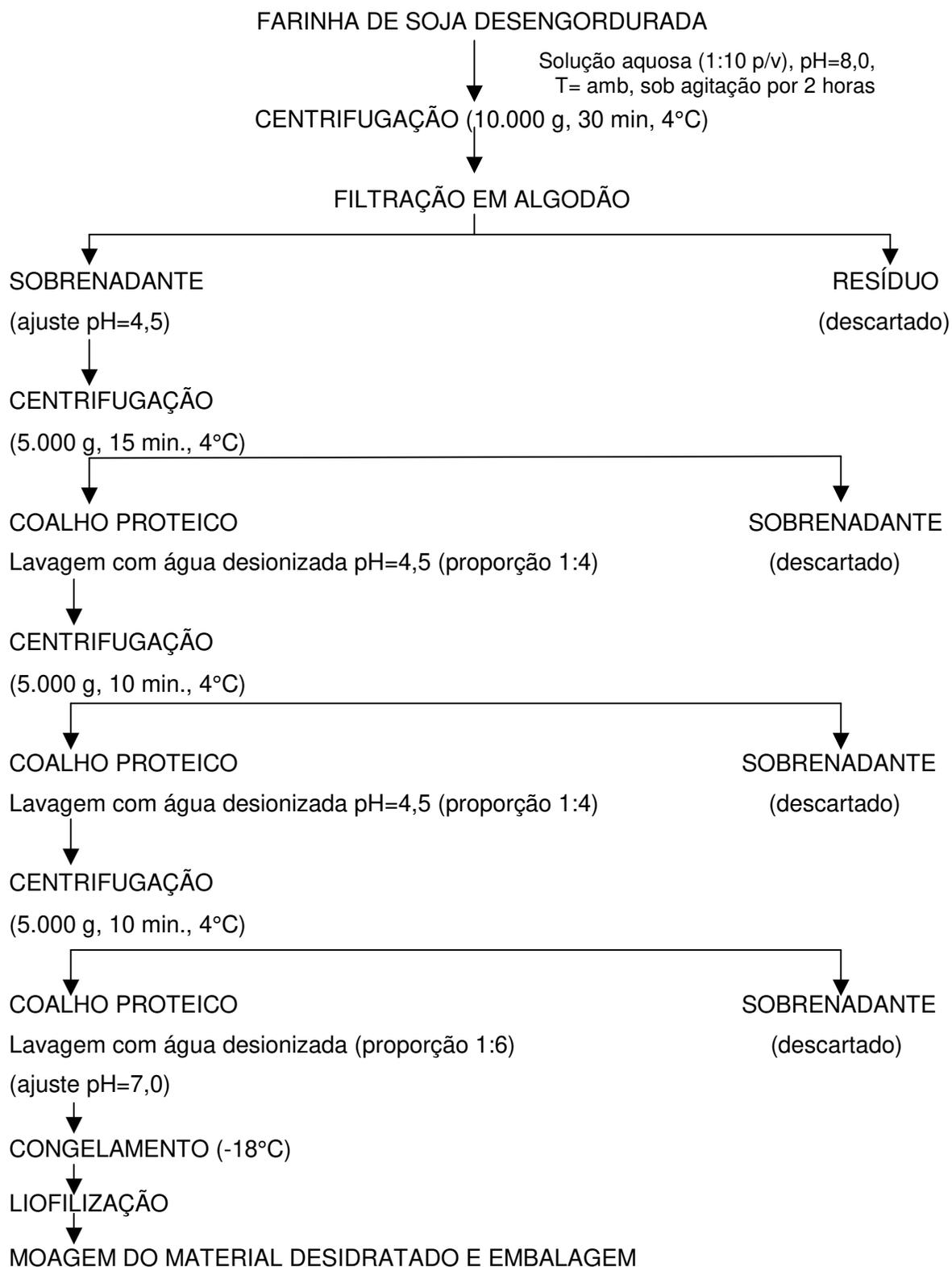


FIGURA 2.1 – Fluxograma de produção do isolado proteico de soja.

2.1.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (p.a.) de várias procedências, salvo algumas especificações mencionadas nos próprios métodos.

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS) e do isolado proteico de soja (IPS).

A FDS e o IPS foram analisados quanto a sua composição centesimal. O conteúdo proteico foi determinado pelo método Macro Kjeldahl (A.O.A.C., 1997), utilizando-se o aparato Buchi Macro Kjeldahl. Para a conversão de nitrogênio em proteína, o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25 (SMITH; CIRCLE, 1972).

O teor de gordura foi determinado pelo método de extração de Soxhlet, umidade por secagem em estufa e cinzas por incineração em mufla segundo os métodos da A.O.A.C. (1997). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.2. Preparo das amostras

Foram preparadas alíquotas de 50 g de dispersão de IPS em água desionizada (p/p) em diferentes concentrações, nas duas faixas de pH estudadas (abaixo e acima do ponto isoelétrico da proteína de soja - pI) conforme o especificado na Tabela 2.1. O pH foi ajustado pela adição de soluções 0,2 ou 2N de HCl ou NaOH, conforme o caso. As amostras preparadas foram embaladas em embalagens plásticas (Cryovac® W. R. Grace Ltd, Londres, Reino Unido), duplamente seladas e pressurizadas.

2.2.3. Tratamento sob alta pressão

O tratamento das amostras foi realizado em equipamento de alta pressão isostática destinado a pressurização de alimentos (Food Lab HP Rig, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido) utilizando como meio líquido para a

transmissão de pressão ao alimento, a mistura de óleo de rícino e etanol (20:80). As amostras foram tratadas sob alta pressão, durante 20 minutos, de acordo com a pressão requerida para cada ensaio (Tabela 2.1). O vaso de pressão foi operado via ar comprimido com mecanismo de elevação e retração do embolo, bomba de alta pressão e sistema de descompressão. A temperatura inicial do vaso de trabalho não foi alterada, sendo mantida nas condições ambientais ($\sim 20,0^{\circ}\text{C}$). O registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão está documentado nas Tabelas A1, A2, A7, A8 e A9 (Anexo A).

2.2.4. Análise estatística

Para a avaliação do tratamento sob pressão isostática sobre as proteínas da soja foram montados e executados dois delineamentos composto central rotacional (2^3), incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, em duas diferentes faixas de pH (2,66 – 4,34 e 5,16 – 6,84), totalizando 17 ensaios cada, conforme mostra a Tabela 2.1. As variáveis independentes foram a concentração de isolado proteico de soja (0,32 a 3,68%), pH e nível de pressão aplicada (198 a 702 MPa). A distância dos pontos axiais foi de $\pm 1,68$, calculada conforme o descrito por Rodrigues e lemma (2005). Em todos os experimentos realizados o tempo de processo foi fixado em 20 minutos. Foi utilizada a metodologia de superfícies de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995) para o planejamento e análise dos resultados.

Os ensaios de cada experimento foram realizados de maneira aleatória. As respostas solubilidade proteica, IAE e G'' foram descritas por um modelo de segunda ordem e examinadas em termos de ajuste do modelo através de Análise de Variância (ANOVA). Os dados levantados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 5.5 da Statsoft Inc. (3225 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). Este mesmo programa também foi utilizado para a comparação das médias de alguns resultados experimentais, por análise de variância e quando diferentes, pelo Método de Tukey (COCKRAN; COX, 1957).

TABELA 2.1 – Delineamento Experimental Fatorial Completo (2^3) para o sistema contendo isolado proteico de soja, processado sob alta pressão isostática.

Variável independente	Nível codificado				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Experimento I					
Concentração de proteína (%)	0,32	1,00	2,00	3,00	3,68
pH	2,66	3,00	3,50	4,00	4,34
Nível de pressão (MPa)	198	300	450	600	702
Experimento II					
Concentração de proteína (%)	0,32	1,00	2,00	3,00	3,68
pH	5,16	5,50	6,00	6,50	6,84
Nível de pressão (MPa)	198	300	450	600	702

2.2.5. Métodos analíticos

Todas as amostras dos ensaios tratadas sob alta pressão isostática foram analisadas quanto a solubilidade proteica, Índice de Atividade Emulsificante (IAE) e análises reológicas (determinação de G' e G''). As amostras que apresentaram em cada delineamento composto central rotacional os maiores valores de solubilidade, IAE e valor de G'' , tendo-se assim, três amostras selecionadas em cada experimento. No total, seis (6) amostras foram analisadas quanto ao teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica. As amostras selecionadas estão especificadas na Tabela 2.2 e foram armazenadas sob refrigeração após o tratamento sob alta pressão. No caso específico da análise de microscopia eletrônica, as amostras foram preparadas exclusivamente para esta finalidade, sendo logo após o tratamento sob alta pressão, congeladas e posteriormente liofilizadas e trituradas.

O IPS original também foi analisado quanto à solubilidade proteica, IAE, teor de sulfidril livre, cromatografia e microscopia eletrônica antes do tratamento sob alta pressão. As amostras de IPS foram analisadas em triplicata no mesmo dia de sua

preparação. As amostras referentes a cada ensaio experimental foram preparadas e analisadas em uma única amostra e as determinações realizadas em duplicata, triplicata ou sexplicata, conforme o caso. As amostras submetidas ao tratamento sob pressão foram armazenadas sob refrigeração e analisadas no período máximo de 2 dias após o seu processamento. As amostras selecionadas foram preparadas sempre que necessário para atender ao cronograma das análises realizadas.

TABELA 2.2 – Amostras selecionadas a partir dos experimentos completos I e II para a execução das análises de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese, análises cromatográficas e microscopia eletrônica de varredura.

Experimento/ Ensaio	Conc. Proteína (%)	pH	Nível de Pressão (MPa)
Experimento I			
3	1,00	4,00	300
11	2,00	2,66	450
14	2,00	3,50	702
Experimento II			
5	1,00	5,50	600
9	0,32	6,00	450
12	2,00	6,84	450

2.2.5.1. Solubilidade proteica em água

A porcentagem de solubilidade proteica em água foi determinada segundo o proposto por Morr et al. (1985) com modificações. A concentração de proteína na amostra a ser analisada foi padronizada e fixada em 0,01g de IPS/mL de água. No caso do IPS original, a solubilidade proteica foi determinada em 500 mg de amostra dispersa em aproximadamente 40 mL de água, sendo esta amostra agitada durante 1 hora em agitador magnético, transferindo-se logo a seguir esta dispersão para balão volumétrico e completando-se o volume para 50 mL com

água. No caso das amostras tratadas sob alta pressão isostática, a massa equivalente de amostra para atingir a concentração de IPS desejada (0,01g de IPS/mL de água) foi mensurada e transferida diretamente para o balão volumétrico adequado. Alíquotas destas dispersões foram centrifugadas em centrífuga Sorvall® RC-5B, rotor SS34 ou SA600 (20.000 g/30 min), à 4°C. Após a filtração em papel Whatman n° 1, duas alíquotas da amostra foram utilizadas para dosar o conteúdo de proteína solúvel segundo o método BCA (“Bicinchoninic acid protein assay”) proposto por Owusu-Apenten (2002), utilizando para isto o kit da Sigma® (BCA-1 e B9643) com o protocolo de 2,1 mL. A quantidade de proteína solúvel foi calculada através das curvas de calibração levantadas (Anexo B) que determinam a quantidade de proteína presente na amostra analisada e da relação entre a quantidade de proteína adicionada e presente na amostra.

2.2.5.2. Índice de Atividade Emulsificante

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi determinado pelo método espectrofotométrico de Pearce e Kinsella (1978), acrescido de informações extraídas de Hill (1996) e Molina, Papadopoulou e Ledward (2001), com modificações. A concentração de proteína na amostra a ser analisada foi padronizada e fixada em 0,005g de IPS/mL de água. No caso do IPS original, o IAE foi determinado em 0,5 g de amostra dispersa em aproximadamente 80 mL de água, sendo esta amostra agitada durante 10 minutos em agitador magnético, transferindo-se logo a seguir esta dispersão para balão volumétrico e completando-se o volume para 100 mL com água. No caso das amostras tratadas sob alta pressão isostática, a massa equivalente de amostra para atingir a concentração de IPS desejada (0,005g de IPS/mL de água) foi mensurada e transferida diretamente para o balão volumétrico adequado. Foram pesados os balões volumétricos antes e depois de colocar as dispersões para a determinação da densidade destas soluções proteicas. Foram transferidos 10 mL desta solução proteica para um béquer plástico e adicionados 30 mL de óleo de milho (marca Asda®, Reino Unido). Esta mistura foi agitada em homogeneizador Turrax® a 10.000 rpm por 30 segundos. A densidade do óleo de milho foi determinada por

diferença através de pesagem em balão volumétrico de 100 mL. Aproximadamente 5g de amostra emulsionada foram colocadas em duplicata em placas de Petri (previamente rigorosamente lavadas e secas em estufa) e deixadas para secar por 14 horas a 105°C em estufa, para compor os dados que permitem calcular a fração de volume de óleo das amostras (ϕ). Para a determinação do IAE cerca de 1 g da emulsão foi colocada em um béquer de 100mL e adicionados 50 ml de solução em água desionizada de 0,1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS – marca Sigma® e 99,5% de pureza, mantida a temperatura ambiente), misturada minuciosamente. O volume foi completado para 100 mL em balão volumétrico com a solução de SDS 0,1%. Em três tubos de ensaio foram adicionados 4 mL de solução de SDS 0,1% e 1 mL da solução da emulsão dissolvida em solução de SDS, obtendo-se assim uma diluição da amostra de 1:500. A absorvância desta solução de emulsão diluída (1:500) em relação ao branco (solução de SDS 0,1%) foram imediatamente determinadas pela leitura em espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20, controlado pelo “software” Winlab, a 500nm. A turbidez da amostra (T), fração de volume de óleo (ϕ) e o IAE foram determinados, respectivamente, pelas Equações 2.1, 2.2 e 2.3, conforme mencionadas por Hill (1996) e Molina, Papadopoulou e Ledward (2001):

$$T = \frac{2,303 \times \text{absorvância}}{\text{diâmetro da cubeta}} \quad \text{Equação 2.1}$$

onde o diâmetro da cubeta é o comprimento de luz que atravessa a amostra (1,0 cm).

$$\phi = \frac{W_d - (E \times W_1)}{W_d + W_1 \{[(1 + E) \times D_o] / D_m\} - E} \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde:

W_d = peso seco à 105°C/ peso da emulsão.

W_1 = perda de peso da emulsão aquecida à 105°C/ peso da emulsão.

E = concentração de soluto (massa total do concentrado/unidade de volume de solvente em g/mL).

D_0 = densidade do óleo (em g/mL), neste caso específico $D_0 = 0,9179$ g/mL – média de 2 determinações.

D_m = densidade da solução proteica a 0,5% (g/mL).

$$\text{IAE (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \times T \times \text{fator de diluição}}{\phi \times C \times 10.000} \quad \text{Equação 2.3}$$

Onde:

T = turbidez da amostra, conforme determinado através da equação 2.1.

ϕ = fração de volume de óleo, conforme determinado pela equação 2.2.

C = peso de proteína por unidade de volume de fase aquosa (g/mL).

2.2.5.3. Análises reológicas

Os módulos de armazenagem ou elástico (G') e de perda ou viscoso (G'') foram determinados em reômetro visco-elástico de tensão controlada RTI (Rheo Tech International Ltd., Reino Unido), utilizando placas paralelas de 50 mm de diâmetro, sendo a distância entre as placas de 1 mm, frequência mínima de 0,1 Hz e máxima de 10 Hz (leituras: 0,1, 0,25, 0,625, 1,667, 3,333 e 10,0), tempo para estado estacionário de 0,5 min e amplitude do torque de 0,050mNm. A temperatura da amostra foi mantida à $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, através de banho com temperatura controlada acoplado ao reômetro. As leituras de frequência das amostras foram repetidas seis vezes e as médias dos resultados foram utilizados para o cálculo matemático do módulo complexo (G^*). Como os gráficos das leituras de G' e G'' versus frequência mostraram a mesma tendência foi tomado apenas um valor de frequência (1,667) e o cálculo de G^* foi realizado para este valor. Como o valor de G'' se mostrou o mais relevante componente de G^* , o valor de G'' foi tomado como uma das respostas analisadas ao invés do valor de G^* .

2.2.5.4. Determinação do conteúdo de sulfidril livre

Os teores de sulfidril livre foram determinados no IPS original e nas amostras selecionadas (Tabela 2.2), segundo o descrito por Beveridge, Toma e Nakai (1974) com as modificações propostas por Hardham (1981). As amostras foram analisadas em duplicata e as determinações realizadas em triplicata. Foram dissolvidas 10 mg de amostra em 10 mL de tampão TRIS-glicina (pH 8.00), contendo 8M de uréia. À dispersão foi adicionado 100 µL do Reagente de Ellman (4 mg de ácido 2,2' dinitro-5,5'ditiodibenzoico – DTNB dissolvido em 1 mL de tampão TRIS-glicina). Decorridos 30 minutos, as dispersões foram filtradas em membrana Millipore® 0,45µm, sendo tomadas alíquotas para a realização da leitura de absorvância em espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20, controlado pelo “software” Winlab, a 412 nm contra o branco (10 mL do tampão TRIS-glicina (8M de uréia) e 100 µL do Reagente de Ellman). Para a determinação da quantidade de sulfidril livre nas amostras analisadas, utilizou-se a seguinte relação (Equação 2.4):

$$\mu\text{moles/g amostra} = \frac{735,3 \times \text{Abs (412 nm)}}{\text{Peso amostra(mg)}} \quad \text{Equação 2.4}$$

2.2.5.5. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)

Os termogramas foram obtidos, conforme o descrito por Molina, Defaye e Ledward (2002), utilizando um analisador Perkin Elmer DSC-7 calibrado com indium (faixa de 130 a 170°C) e zinco (faixa de 400 a 450°C). As amostras selecionadas (Tabela 2.2) nas suas concentrações próprias foram precisamente pesadas (20 a 25 mg) e colocadas diretamente em cápsulas de alumínio hermeticamente seladas. As amostras foram aquecidas de 30 a 100°C na velocidade de 5°C/minuto, utilizando uma cápsula vazia como referência. As leituras de entalpia (ΔH) e da temperatura de desnaturação (T_d) foram obtidas em triplicatas diretamente no analisador utilizado, através do “software” interno do equipamento (“7 Series Thermal Analysis System”, 1972).

2.2.5.6. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

O perfil cromatográfico foi determinado apenas para as amostras selecionadas (Tabela 2.2), utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), de acordo com Bietz (1983), utilizando-se solução aquosa de 15% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) como solvente A e 80% de acetonitrila e 0,1% de TFA como solvente B. Estes solventes foram previamente filtrados em membrana (47mm, 0,20 µm de nylon, Whatman, Maidstone, Reino Unido) e purgados com gás Hélio antes de serem bombeados.

Primeiramente, as amostras foram padronizadas para a concentração de 0,1 mg de proteína/mL com água desionizada, sendo a seguir estas soluções filtradas em filtro de 0,2 micron (Minisart high flow hydrophilic filter, Sartorius, Alemanha) e injetados 100µL em coluna C-18 (Modelo Ace 5 C18-300, com 150mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, 300Å de tamanho de partícula, Advanced Chromatography Technologies, Escócia). Os solventes foram alimentados utilizando bomba HPLC (Spectra Physics SP8800) em cromatógrafo HP com integrador (Modelo HP 3396A) e detector UV (Spectroflow 757, ABI Analytical Division). As condições da corrida obedeceram a um gradiente linear de 50 minutos de 0 a 100% do solvente B. O fluxo foi de 0,5 mL/min, com detecção a 210 nm. Após cada análise, a coluna foi retornada às condições iniciais através de um gradiente linear (100 a 0% do solvente B) por 10 minutos.

2.2.5.7. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE)

A determinação do perfil eletroforético das proteínas totais foi conduzida em gel de poli(acrilamida) adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) denominado como SDS-PAGE e sem a adição SDS denominado Native PAGE, segundo o descrito por Laemmli (1970). A concentração total do monômero (%T) no gel de empacotamento foi de 4,5% e do gel de separação de 10%, sendo a concentração do “crosslinking” (%C) nos dois casos de 2,67%. As amostras selecionadas foram padronizadas para a concentração de 0,1% de proteína em água desionizada e diluídas na proporção 1:1 com tampão Tris-HCl (1,5 g Tris, 2mg azul de

bromofenol, 10mL glicerol em 100mL de solução, sendo o pH ajustado para 6,8 com 5M HCl). As amostras diluídas foram imersas em água em ebulição por 3 minutos sendo a seguir resfriadas (somente para SDS PAGE). Alíquotas de 15µL de cada amostra foram aplicadas ao gel.

A eletroforese foi conduzida em tampão (0,025M Tris, 0,192M glicina, 0,1% SDS, pH 8.6-8.7) a 500V, 50mA até que as bandas azuis começassem a surgir no gel (aproximadamente 60 minutos). A coloração dos géis foi realizada, conforme o descrito por Puppó et al. (2004), utilizando como solução 0,05% de Comassie Brilhante G-250, 25% de etanol e 10% de ácido acético. Os géis foram descorados em solução aquosa contendo 7% de ácido acético e 40% de etanol. Foram utilizados marcadores de pesos moleculares comerciais na faixa de 6.500 a 205.000 Da da Sigma®. As imagens dos géis foram obtidas em equipamento Gene Genius, Snyoptics, Cambridge, Reino Unido, sendo manipuladas digitalmente utilizando o software Adobe® Photoshop.

2.2.5.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a observação ao MEV, as amostras selecionadas (Tabela 2.2) foram separadas em duas porções distintas, uma antes do tratamento sob pressão e outra após o tratamento sob pressão. Estas amostras foram preparadas e liofilizadas e trituradas para observação ao MEV. As amostras foram espalhadas sobre “stubs” de alumínio preparado com adesivo de carbono e revestidas com pó de ouro sob vácuo. A observação foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura submetido a alto vácuo, Cambridge Stereoscan S360, Reino Unido, equipado com sistema de dispersão de raios X, Oxford INCA, Oxford Instruments, Reino Unido e Inca software para a visualização das imagens.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS), produção do isolado proteico de soja (IPS) e sua caracterização.

A Tabela 2.3 mostrou os valores das quantidades de farinha desengordurada de soja utilizadas e o rendimento em isolado proteico de soja durante a sua preparação e liofilização. Estes valores revelam que o rendimento para o preparo de IPS a partir da FDS foi de aproximadamente 27%. Este valor está próximo ao obtido por Souza (2000) que foi de 26,57% e os mencionados por Singh, Singh e Chauhan (1994) que encontraram rendimentos de IPS em massa de farinha seca na faixa de 24,3 a 41,5%.

A composição centesimal da farinha desengordurada de soja (FDS) e do isolado proteico de soja produzido estão apresentados na Tabela 2.4.

Os valores de proteína e umidade encontrados para FDS foram inferiores aos obtidos por Souza (2000) e Takeiti (2002) que apresentaram respectivamente valores de 57,9% e 68,74% de proteína e 7,46% e 8,56% de umidade, porém os valores de proteína estão próximos aos encontrados por Souza (2006) que obteve valores de 51,34% e superiores aos encontrados por García et al. (1998) que foram de 46,5%. Os valores de lipídeos encontrados por García et al. (1998) que utilizaram o mesmo método de determinação aqui adotado foram superiores (0,84%). Os valores de cinzas foram semelhantes aos obtidos por Takeiti (2002) e Souza (2000) que encontraram respectivamente 6,29% e 5,98%.

TABELA 2.3 – Preparo do isolado proteico de soja.

Batelada	Quantidade de FDS (g)	Massa após 1ª lavagem (g)	Massa após 2ª lavagem (g)	Massa final de coalho (g)	Massa IPS após liofilização (g)
1	220,0	222,0	160,0	149,0	
2	458,9	456,0	338,0	310,0	
3	440,0	421,5	320,0	286,0	
4	440,0	452,5	317,0	287,0	
5	440,0	430,0	323,0	291,0	
6	440,0	440,0	324,0	292,0	
7	660,0	633,0	497,0	447,0	
8	660,0	638,0	484,0	439,0	1.040,0 ¹
9	440,0	447,0	333,0	295,0	
10	660,0	674,0	517,0	470,0	
11	660,0	664,0	509,0	461,0	
12	660,0	684,0	532,0	476,0	
13	440,0	444,0	337,0	302,0	
14	660,0	656,0	513,0	470,0	
15	438,0	395,0	320,0	296,0	1.020,0 ²
16	440,0	460,0	365,0	370,0	
17	660,0	678,0	510,0	458,0	
18	660,0	684,0	529,0	474,0	
19	660,0	684,0	522,0	465,0	
20	660,0	672,0	500,0	457,0	
21	660,0	678,0	500,0	458,0	
22	660,0	665,0	506,0	459,0	
23	660,0	653,0	503,0	446,0	1.410,0 ³

¹ massa obtida após a liofilização do coalho neutralizado obtido nas bateladas 1 a 8.

² massa obtida após a liofilização do coalho neutralizado obtido nas bateladas 9 a 15.

³ massa obtida após a liofilização do coalho neutralizado obtido nas bateladas 16 a 23.

TABELA 2.4 – Composição centesimal média da farinha desengordurada de soja e do isolado proteico de soja.

Determinação \ Amostra	Farinha desengordurada de soja	Isolado proteico de soja
% Proteína ^{1,2,3}	52,86 ± 0,25	94,65 ± 1,70
% Lipídeos ^{1,3}	0,34 ± 0,12	0,27 ± 0,12
% Cinzas ^{1,3}	6,64 ± 0,08	3,32 ± 0,07
% Umidade ¹	4,99 ± 0,09	2,10 ± 0,07

¹ Valores médios de três determinações ± desvio padrão.

² N x 6,25.

³ Valores expressos em Base Seca.

Os valores de proteína encontrados para o isolado proteico de soja foram semelhantes aos observados na faixa de 87,9 a 94,1% em isolados comerciais analisados por Henn e Netto (1998) e foram próximos aos obtidos por Takeiti (2002) e Souza (2000) que encontraram respectivamente 96,88% e 96,90% para o IPS nativo. Os valores de cinzas estão compatíveis com os valores obtidos por Souza (2000) e Takeiti (2002) que obtiveram respectivamente valores de 2,65% e 3,22%. Os valores de umidade foram inferiores aos obtidos por Souza (2000) e Takeiti (2002), porém esta diferença pode ser atribuída ao processo de liofilização da proteína. No caso da análise de lipídeos, o valor encontrado estava de acordo com o mencionado por García et al. (1998) que foi de 0,28%, utilizando o mesmo método de análise. Vale ressaltar que a composição centesimal tanto da FDS quanto do IPS podem ser influenciadas por outros fatores, como por exemplo, cultivar da soja utilizada, condições de cultivo da soja e clima, condições físico-químicas dos grãos de soja e tipo de processamento utilizado.

A Tabela 2.5 apresentou os valores de solubilidade proteica das amostras de IPS obtidas pelo método de determinação de proteínas por Kjeldhal e utilizando o método de BCA. Como estes valores não diferem significativamente ao nível de 5% e sendo o método de BCA mais rápido de se realizar do que o método de

Kjeldhal, adotou-se, a partir destes resultados, apenas o método de BCA para a determinação do teor de proteína solúvel (análise de solubilidade proteica) em todas as amostras analisadas. O valor de solubilidade proteica para o IPS está próximo ao citado por Liu (1999) que afirma que a solubilidade proteica para IPS produzido a partir de farinha de soja desengordurada tratada por antioxidante é de 55% e de 34% para as farinhas não tratadas.

TABELA 2.5 – Comparação entre os métodos de determinação de proteína solúvel.

Amostra de IPS	Determinação de proteína para cálculo da solubilidade	
	Método de Kjeldhal ¹	Método BCA ²
% de solubilidade proteica ³	47,50 ± 2,11 ^a	49,32 ± 1,84 ^a

¹ média de três determinações ± desvio padrão, sendo o pH da amostra de IPS=6,60.

² média de três determinações analisadas em duplicata ± desvio padrão, sendo o pH da amostra de IPS=6,60.

³ valores com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

O IPS original (pH=6,6) apresentou valor médio de IAE de 97,19 ± 3,00 m²/g (média de duas amostras, com três determinações cada), que está próximo ao encontrado por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) e Souza (2006) que foi de cerca de 100 m²/g em pH 7,0.

3.2. Ensaios experimentais

Os valores obtidos para as respostas solubilidade proteica, IAE e G'' nos Experimentos I e II foram expostos nas Tabelas 2.6 e 2.7, respectivamente.

TABELA 2.6 - Resultados do Experimento I (Delineamento Composto Central).

Ensaio	Conc. de proteína (%)	pH	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	G'' (Pa) ¹	Aspecto visual da amostra*
1	-1 (1,00)	-1 (3,00)	-1 (300)	50,30	103,02	8,796	Homogênea, ligeira translucidez, bege.
2	+1 (3,00)	-1 (3,00)	-1 (300)	48,03	118,19	9,513	Homogênea, opaca, amarelada.
3	-1 (1,00)	+1 (4,00)	-1 (300)	4,40	434,49	9,285	Pequenos precipitados.
4	+1 (3,00)	+1 (4,00)	-1 (300)	1,94	193,39	9,202	Precipitados grandes e rígidos.
5	-1 (1,00)	-1 (3,00)	+1 (600)	50,24	88,29	9,370	Homogênea, opaca, amarelada.
6	+1 (3,00)	-1 (3,00)	+1 (600)	32,33	136,43	9,464	Homogênea, opaca, amarelada.
7	-1 (1,00)	+1 (4,00)	+1 (600)	1,69	225,17	9,934	Precipitados grandes e rígidos.
8	+1 (3,00)	+1 (4,00)	+1 (600)	1,90	123,05	9,920	Precipitados grandes.
9	-1,68 (0,32)	0 (3,50)	0 (450)	4,14	162,66	9,219	Homogênea, opaca, branca.
10	+1,68 (3,68)	0 (3,50)	0 (450)	9,43	133,07	9,509	Opaca, pequenos precipitados, branca.
11	0 (2,00)	-1,68 (2,66)	0 (450)	53,00	64,91	9,064	Homogênea, translúcida, bege.
12	0 (2,00)	+1,68 (4,34)	0 (450)	1,04	273,73	9,349	Precipitados grandes e rígidos.
13	0 (2,00)	0 (3,50)	-1,68 (198)	12,35	107,31	9,619	Homogênea, opaca, branca.
14	0 (2,00)	0 (3,50)	+1,68 (702)	8,38	208,23	10,252	Cor branca, pequenos precipitados.
15	0 (2,00)	0 (3,50)	0 (450)	9,55	93,80	9,784	Cor branca, pequenos precipitados.
16	0 (2,00)	0 (3,50)	0 (450)	6,46	103,70	9,743	Cor branca, pequenos precipitados.
17	0 (2,00)	0 (3,50)	0 (450)	10,28	81,69	9,845	Cor branca, pequenos precipitados.

¹ Valores médios

* após tratamento sob alta pressão.

TABELA 2.7 - Resultados do Experimento II (Delineamento Composto Central).

Ensaio	Concentração de proteína (%)	pH	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	G'' (Pa) ¹	Aspecto visual da amostra*
1	-1 (1,00)	-1 (5,50)	-1 (300)	16,19	154,48	8,056	Homogênea, branca, opaca.
2	+1 (3,00)	-1 (5,50)	-1 (300)	14,11	106,94	8,271	Homogênea, branca, opaca.
3	-1 (1,00)	+1 (6,50)	-1 (300)	60,78	93,45	9,075	Homogênea, translúcida, bege.
4	+1 (3,00)	+1 (6,50)	-1 (300)	61,49	55,34	11,952	Homogênea, translúcida, bege.
5	-1 (1,00)	-1 (5,50)	+1 (600)	11,20	220,64	12,736	Homogênea, branca, opaca.
6	+1 (3,00)	-1 (5,50)	+1 (600)	6,24	105,38	8,869	Homogênea, branca, opaca.
7	-1 (1,00)	+1 (6,50)	+1 (600)	62,58	49,86	9,780	Homogênea, translúcida, bege.
8	+1 (3,00)	+1 (6,50)	+1 (600)	62,54	48,76	8,396	Homogênea, translúcida, bege.
9	-1,68 (0,32)	0 (6,00)	0 (450)	3,63	297,93	8,124	Homogênea, ligeira translucidez, branca.
10	+1,68 (3,68)	0 (6,00)	0 (450)	45,59	101,24	10,114	Homogênea, ligeira translucidez, bege.
11	0 (2,00)	-1,68 (5,16)	0 (450)	4,58	232,09	9,437	Precipitados macios.
12	0 (2,00)	+1,68 (6,84)	0 (450)	65,06	49,33	9,489	Homogênea, translúcida, bege.
13	0 (2,00)	0 (6,00)	-1,68 (198)	52,97	72,95	7,371	Homogênea, translúcida, bege.
14	0 (2,00)	0 (6,00)	+1,68 (702)	60,02	61,66	8,951	Homogênea, ligeira translucidez, bege.
15	0 (2,00)	0 (6,00)	0 (450)	63,83	87,36	8,346	Homogênea, ligeira translucidez, bege.
16	0 (2,00)	0 (6,00)	0 (450)	56,71	82,32	8,362	Homogênea, ligeira translucidez, bege.
17	0 (2,00)	0 (6,00)	0 (450)	52,03	78,77	7,708	Homogênea, ligeira translucidez, bege.

¹ Valores médios.

* após tratamento sob alta pressão.

3.2.1. Solubilidade proteica

A Figura 2.2 mostra a influência das variáveis estudadas (concentração de IPS, pH e pressão aplicada) sobre a resposta solubilidade proteica para os Experimentos I e II. Nas faixas de menores valores de pH (Figura 2.2 a, b) observou-se a forte influência da variável pH sobre a resposta solubilidade, tendo esta um efeito negativo, isto é, a medida em que se aumentou o pH diminuiu-se a solubilidade proteica. O maior valor de solubilidade proteica foi observado na faixa de $\text{pH} < 3,00$. Para o Experimento II (Figura 2.2 c, d) foi observado que os valores de solubilidade proteica aumentam a medida que aumenta o pH e atinge valores máximos quando a concentração de IPS está na sua faixa média. Se o $\text{pH} > 3,5$ ou $\text{pH} < 5,5$ a solubilidade proteica é bem baixa. Este comportamento pode ser atribuído ao conhecido fenômeno de agregação proteica próximo ao ponto isoelétrico (pH 4,2 a 4,6), sendo que a solubilidade proteica aumenta em valores de pH abaixo ou acima do pI (HETTIARACHCHY; KALAPATHY, 1999).

As Tabelas 2.8 e 2.9 mostram respectivamente os coeficientes de regressão linear e a Análise de Variância (ANOVA) para a resposta solubilidade proteica no Experimento I em função das variáveis estudadas (concentração de IPS, pH e pressão aplicada). Pelo exposto na Tabela 2.8, os termos média, pH linear e pH quadrático foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os termos que não se mostraram estatisticamente significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 2.9). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (56,63) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (13,94) não foi significativo ($p > 0,01$) e, sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 89%), pôde-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. Valores de R^2 acima de 0,90 são considerados como muito bons (BURKERT et al., 2005). O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,13%). A equação codificada (Equação 2.5) que expressa a solubilidade proteica em função das variáveis estudadas para o Experimento I foi:

$$\text{Solubilidade proteica} = 11,91 - 18,92 \text{ pH} + 7,54 \text{ pH}^2 \quad (\text{Equação 2.5})$$

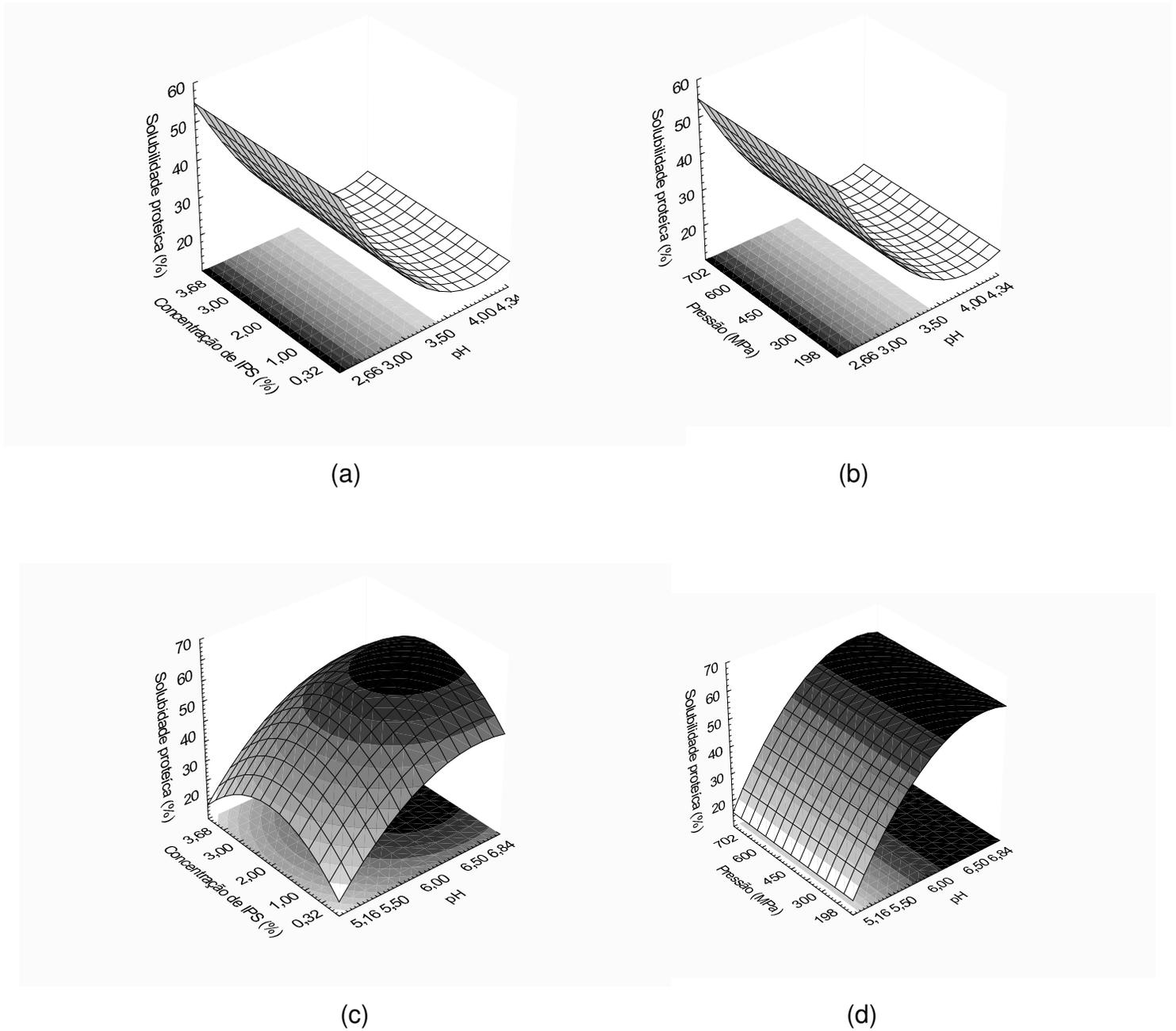


FIGURA 2.2 – Superfícies de resposta para a solubilidade proteica em função das variáveis pH e concentração de IPS (a e c) e pH e alta pressão (b e d) para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d).

TABELA 2.8 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média	8,20*	1,1685	7,0160	0,019716	3,1705	13,2258
Concentração Proteína (L)	-0,99	0,5487	-1,8059	0,212688	-3,3520	0,3701
Concentração Proteína (Q)	1,25	0,6040	2,0652	0,174917	-1,3514	0,8459
pH (L)	-18,92*	0,5487	-34,4750	0,000840	-21,2787	-16,5567
pH (Q)	8,40*	0,6040	13,9105	0,005128	5,8028	11,0001
Pressão (L)	-1,84	0,5487	-3,3609	0,078276	-4,2053	0,5168
Pressão (Q)	2,51	0,6040	4,1609	0,053194	-0,0856	5,1117
1L x 2L	2,24	0,7170	3,1261	0,088897	-0,8436	5,3261
1L x 3L	-1,62	0,7170	-2,2613	0,152155	-4,7061	1,4636
2L x 3L	1,63	0,7170	2,2683	0,151422	-1,4586	4,7111

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de proteína; 2= pH; 3= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 2.9 – Análise de variância (ANOVA) do Experimento I do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	2	5628,98	2814,49	56,63	6,51*
Resíduo	14	695,80	49,70		
Fator de ajuste	12	687,57	57,30	13,94	99,42**
Erro Puro	2	8,22	4,11		
Total	16	6324,78			

% variação explicada (R^2) = 89,00%. *F_(2, 14; 0,01) e **F_(12, 2; 0,01)

No Experimento II (Tabela 2.10) os termos média, concentração de IPS quadrática, pH linear e pH quadrático foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para a resposta solubilidade proteica. Os demais termos que não se

mostraram estatisticamente significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 2.11). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (31,42) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (2,91) não foi significativo ($p > 0,01$) e, sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 88%), semelhante à obtida no Experimento I), pôde-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,71%). A equação codificada (Equação 2.6) que expressa a solubilidade proteica em função das variáveis estudadas para o Experimento II foi:

$$\text{Solubilidade proteica} = 56,93 + 22,07(\text{pH}) - 11,62(\text{concentração de IPS})^2 - 8,01(\text{pH})^2 \quad (\text{Equação 2.6})$$

TABELA 2.10 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média	57,56*	3,4238	16,8122	0,003519	42,8307	72,2939
Concentração Proteína (L)	4,70	1,6079	2,9236	0,099787	-2,2173	11,6189
Concentração Proteína (Q)	-11,77*	1,7697	-6,6514	0,021865	-19,3853	-4,1566
pH (L)	22,07*	1,6079	13,7244	0,005267	15,1488	28,9850
pH (Q)	-8,16*	1,7697	-4,6116	0,043945	-15,7755	-0,5468
Pressão (L)	0,14	1,6079	0,0841	0,940639	-6,7829	7,0533
Pressão (Q)	-0,50	1,7697	-0,2814	0,804882	-8,1123	7,1165
1L x 2L	0,96	2,1008	0,4588	0,691438	-8,0752	10,0027
1L x 3L	-0,45	2,1008	-0,2160	0,849022	-9,4927	8,5852
2L x 3L	1,96	2,1008	0,9348	0,448586	-7,0752	11,0027

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de proteína; 2= pH; 3= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 2.11 – Análise de variância (ANOVA) do Experimento II do modelo estatisticamente válido (erro puro) para a resposta solubilidade proteica.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3	8693,81	2897,94	31,42	5,74*
Resíduo	13	1199,07	92,24		
Fator de ajuste	11	1128,46	102,59	2,91	99,41**
Erro Puro	2	70,61	35,30		
Total	16	9892,88			

% variação explicada (R^2) = 87,88%. * $F_{(3, 13; 0,01)}$ e ** $F_{(11, 2; 0,01)}$

Como o observado nas Figuras 2.2b e 2.2d e nas Equações 2.5 e 2.6, o tratamento sob pressão não teve influência sobre a resposta solubilidade proteica nas regiões estudadas, como também foi relatado por outros autores. Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) estudaram a influência do tratamento sob alta pressão nas globulinas 7S e 11S e nos IPS a pH 7,5 and pH 6,5 e relataram que o tratamento sob alta pressão não exerceu grande influência sobre a solubilidade proteica nos valores de pH estudados, com exceção da globulina 11S a pH 7,5. Apichartsrangkoon (2003) tratou concentrado de soja a 80% de umidade à pressões de 200 e 800 MPa, por 50 min à 20°C e não encontrou uma grande amplitude de valores de solubilidade entre os tratamentos aplicados. Puppo et al. (2004) trabalharam com IPS a pH 8 e a pH 3 e observaram que em pH 8 a solubilidade proteica sofre um ligeiro aumento à 200 MPa, ficando estável entre 200 e 400 MPa. Já o IPS pH 3 aumentou a solubilidade nos tratamentos à 200 e 400 MPa.

De maneira geral, os valores de solubilidade proteica foram maiores na faixa de pH próximo da neutralidade (Experimento II). Na faixa de pH ácido (Experimento I) o maior valor de solubilidade proteica observado foi 53% (Tabela 2.6) que foi cerca de 7,5% maior do que o observado para o IPS original (49,32 % – Tabela 2.5). Na faixa de pH próximo à neutralidade o maior valor de solubilidade proteica após o

tratamento sob alta pressão foi de 65,06% (Tabela 2.7), o que significa um aumento de cerca de 32% em relação à solubilidade proteica do IPS original.

3.2.2. Índice de Atividade Emulsificante (IAE)

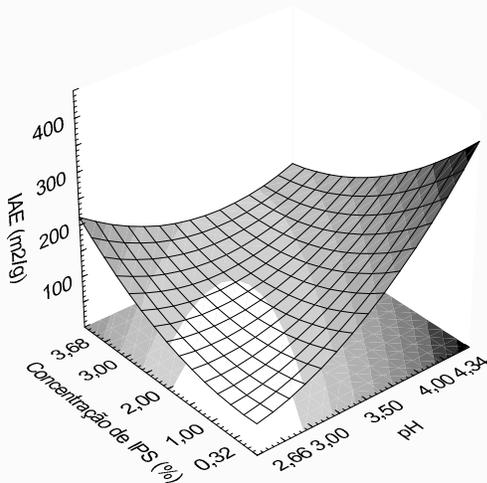
A Figura 2.3 mostrou a influência das variáveis estudadas (concentração de IPS, pH e pressão aplicada) sobre a resposta IAE para os Experimentos I e II. Em ambas as faixas de pH estudadas a concentração de IPS influenciou negativamente o IAE (Figura 2.3 a, c). Nos valores mais baixos de pH (Figura 2.3b) o IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos sob pressão mais baixas. A Tabela 2.12 exibiu os coeficientes de regressão para a resposta IAE obtida no Experimento I. Neste Experimento, apenas o termo pressão linear não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) para a resposta IAE, sendo este termo incorporado aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 2.13). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (5,92) foi significativo ($p < 0,05$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (26,25) não foi significativo ($p > 0,01$) e sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 85%), foi possível concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,18%). A equação codificada de segunda ordem (Equação 2.7) que expressa o IAE em função da concentração de IPS, pH e pressão aplicada para o Experimento I foi :

$$\begin{aligned} \text{IAE} = & 92,06 - 24,14(\text{concentração de IPS}) + 64,54(\text{pH}) + 22,81(\text{concentração de} \\ & \text{IPS})^2 + 30,40(\text{pH})^2 + 26,32(\text{pressão})^2 - 50,82(\text{concentração de IPS})(\text{pH}) \\ & + 21,49(\text{concentração de IPS})(\text{pressão}) - 35,40(\text{pH})(\text{pressão}) \end{aligned}$$

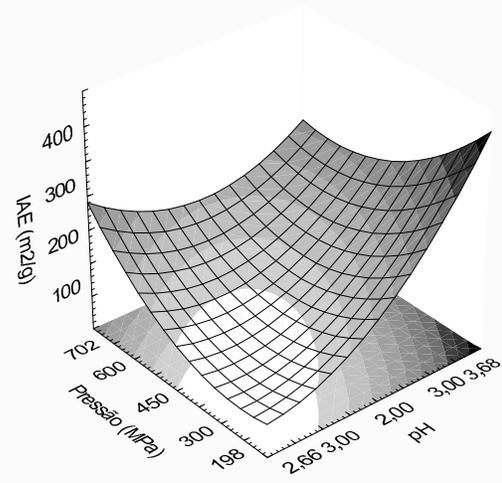
(Equação 2.7)

Observou-se pela Equação 2.7 e Figura 2.3 (a e b), que o aumento do pH favoreceu positivamente o aumento do IAE nas condições utilizadas no Experimento I. Já a concentração de IPS linear apresentou efeito negativo sobre o valor de IAE (Equação 2.7, Tabela 2.12 e Figura 2.3 a). Pelos resultados da Tabela 2.6, observou-se que o maior valor de IAE no Experimento I foi obtido no

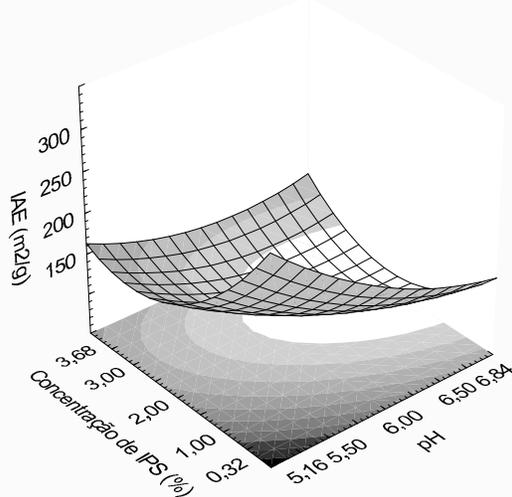
ensaio 3 (434,49 m²/g), no qual foi aplicada baixa pressão isostática (300MPa), pH (4,00 próximo do pl) e concentração de proteína de 1%, mostrando-se superior ao do IPS original (97,19 m²/g).



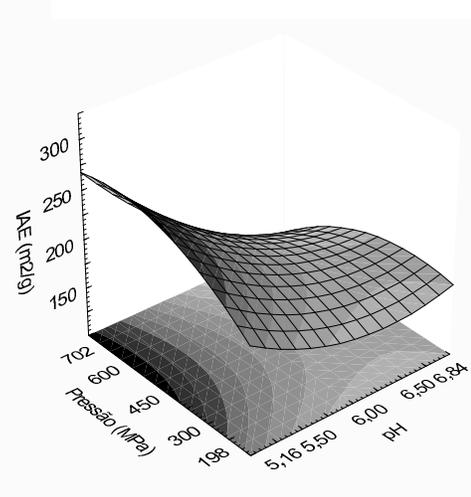
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 2.3 – Superfícies de resposta para o IAE em função das variáveis pH e concentração de IPS (a e c) e pH e alta pressão (b e d) para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d).

TABELA 2.12 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	92,06*	6,3491	14,4997	0,004723	64,7420	119,3784
Concentração Proteína (L)	-24,14*	2,9816	-8,0958	0,014917	-36,9671	-11,3095
Concentração Proteína (Q)	22,81*	3,2817	6,9518	0,020071	8,6938	36,9337
pH (L)	64,54*	2,9816	21,6450	0,002128	51,7080	77,3656
pH (Q)	30,40*	3,2817	9,2630	0,011455	16,2782	44,5182
Pressão (L)	-7,79	2,9816	-2,6134	0,120516	-20,6208	5,0368
Pressão (Q)	26,32*	3,2817	8,0187	0,015198	12,1950	40,4349
1L x 2L	-50,82*	3,8957	-13,0443	0,005826	-67,5777	-34,0544
1L x 3L	21,49*	3,8957	5,5168	0,031322	4,7298	38,2531
2L x 3L	-35,40*	3,8957	-9,0860	0,011897	-52,1577	-18,6344

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de proteína; 2= pH; 3= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 2.13 – Análise de variância (Anova) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento I.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	8	114.615,04	14.326,88	5,92	3,44*
Resíduo	8	19.367,86	2.420,98		
Fator de ajuste	6	19.125,04	3.187,51	26,25	99,33**
Erro Puro	2	242,82	121,41		
Total	16	133.982,90			

% variação explicada (R^2) = 85,54%. *F_(8, 8; 0,05) e **F_(6, 2; 0,01)

No Experimento II, o termo pressão linear e o termo interativo (concentração de IPS)(pressão) não foram significativos ($p > 0,05$) para a resposta IAE (Tabela 2.14). Esses termos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 2.15). Observou-se que o termo pressão linear também não se mostrou estatisticamente significativo ($p > 0,05$) no Experimento I, indicando que a pressão exerceu pouca influência sobre os valores de IAE nas condições estudadas. Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (10,09) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (73,15) não foi significativo ($p > 0,01$) e sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 89%), foi possível concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais em relação a soma dos quadrados foi muito baixo (cerca de 0,04%), indicando uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais. A equação codificada (Equação 2.8) que expressa o IAE em função das variáveis estudadas para o Experimento II foi:

$$\begin{aligned} \text{IAE} = & 85,06 - 39,01(\text{concentração de IPS}) - 47,40(\text{pH}) + 33,57(\text{concentração de} \\ & \text{IPS})^2 + 12,76(\text{pH})^2 - 13,19(\text{pressão})^2 + 15,45(\text{concentração de IPS})(\text{pH}) \\ & - 14,34(\text{pH})(\text{pressão}) \end{aligned} \quad (\text{Equação 2.8})$$

Para o Experimento II, tanto a concentração de IPS como o pH exerceram influência negativa sobre a resposta IAE, isto é, os maiores valores de IAE foram alcançados nas condições de baixa concentração de IPS e valores de pH mais baixos (Figura 2.3 c, d, e Equação 2.8). Embora a pressão tenha exercido pouca influência sobre os valores de IAE (Equação 2.8), pois o termo linear pressão não foi significativo ($p > 0,05$), observou-se pela Figura 2.3d que os maiores valores de IAE foram obtidos para os valores de pressão acima de 300 MPa, sendo o maior valor de IAE (297,93 m^2/g) obtido pelo ensaio 9 (Tabela 2.7), no qual foi utilizada a mais baixa concentração de proteína, pH do ponto central (6,00) e pressão mediana (450 MPa). Este comportamento foi de acordo com os resultados encontrados por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) que estudaram a influência da alta pressão nos valores de IAE do IPS a pH 7,5 e 6,5 concluindo que o tratamento sob alta pressão a pH próximo ao neutro pode melhorar a atividade emulsificante das proteínas de soja.

TABELA 2.14 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média	85,06*	2,4874	34,1947	0,000854	74,3540	95,7594
Concentração Proteína (L)	-39,01*	1,1681	-33,3971	0,000895	-44,0378	-33,9858
Concentração Proteína (Q)	33,57*	1,2857	26,1137	0,001463	28,0422	39,1059
pH (L)	-47,41*	1,1681	-40,5823	0,000607	-52,4310	-42,3789
pH (Q)	12,76*	1,2857	9,9228	0,010004	7,2257	18,2894
Pressão (L)	-0,33	1,1681	-0,2850	0,802470	-5,3589	4,6931
Pressão (Q)	-13,19*	1,2857	-10,2629	0,009361	-18,7267	-7,6630
1L x 2L	15,45*	1,5262	10,1217	0,009620	8,8811	22,0147
1L x 3L	-3,84	1,5262	-2,5150	0,128355	-10,4052	2,7284
2L x 3L	-14,34*	1,5262	-9,3989	0,011131	-20,9115	-7,7779

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de proteína; 2= pH; 3= pressão aplicada; *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 2.15 – Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento II.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	7	75.192,72	10.741,82	10,09	5,61*
Resíduo	9	9.582,06	1.064,67		
Fator de ajuste	7	9.544,79	1.363,54	73,15	99,36**
Erro Puro	2	37,27	18,64		
Total	16	84.774,78			

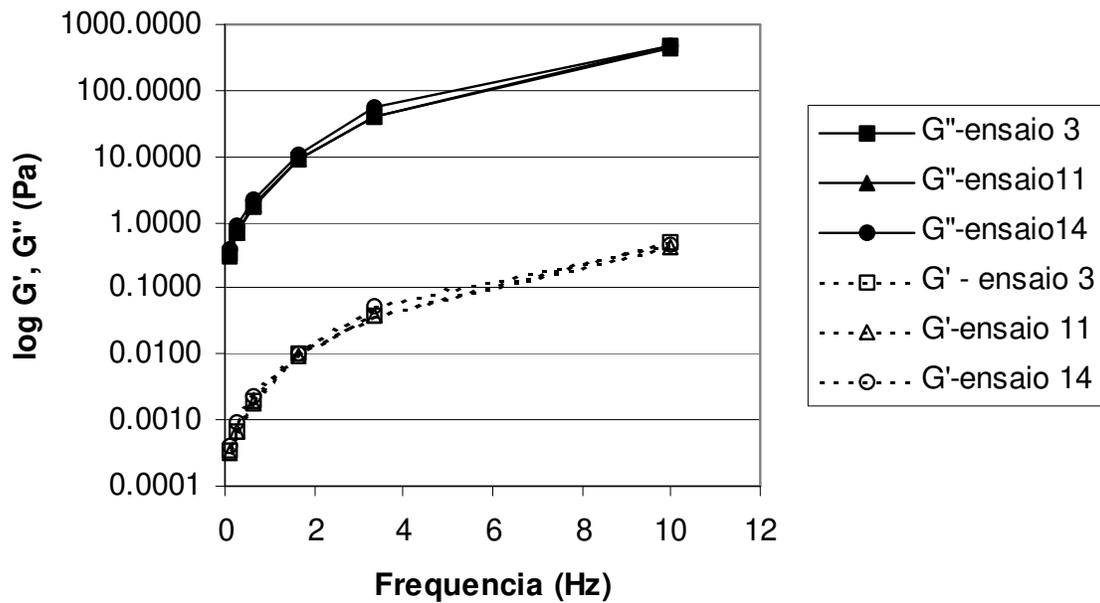
% variação explicada (R^2) = 88,70%. *F_(7, 9; 0,01) e **F_(7, 2; 0,01).

3.2.3 Medidas reológicas

A Figura 2.4a (Experimento I) e a Figura 2.4b (Experimento II) exemplificaram as mudanças ocorridas nos valores de G' e G'' em função da frequência aplicada nas amostras dos ensaios selecionados tratadas sob alta pressão. Em ambas as Figuras (2.4a e 2.4b), observou-se o mesmo tipo de comportamento e os valores de G' e G'' para cada amostra estão próximos em cada frequência analisada. Como foi observado o mesmo tipo de comportamento em todas as amostras analisadas, tomou-se apenas o valor da frequência intermediária (1,667 Pa) para a realização dos cálculos de G'' para a comparação entre os ensaios nas análises estatísticas.

Nos Experimentos I e II o módulo G'' (módulo de perda ou componente viscoso) foi o componente preponderante das medidas reológicas, pois todas as amostras analisadas mostraram um comportamento predominantemente viscoso. As variáveis concentração de IPS, pH e pressão aplicada influenciaram os valores de G'' , apesar dos efeitos serem pequenos (Tabela 2.16 e Tabela 2.18). A variável concentração de IPS teve um efeito positivo sobre os valores de G'' em ambas as faixas de pH estudadas (Figura 2.5a e 2.5c), sendo máximo no caso do Experimento II tanto nos menores quanto nos maiores valores de concentração de IPS. Nos valores de pH mais baixos (Figura 2.5b) o aumento da pressão aplicada favoreceu o aumento de G'' . No Experimento II, o valor de G'' foi máximo tanto no valor máximo de pressão aplicada quanto no mínimo (Figura 2.5d).

(a)



(b)

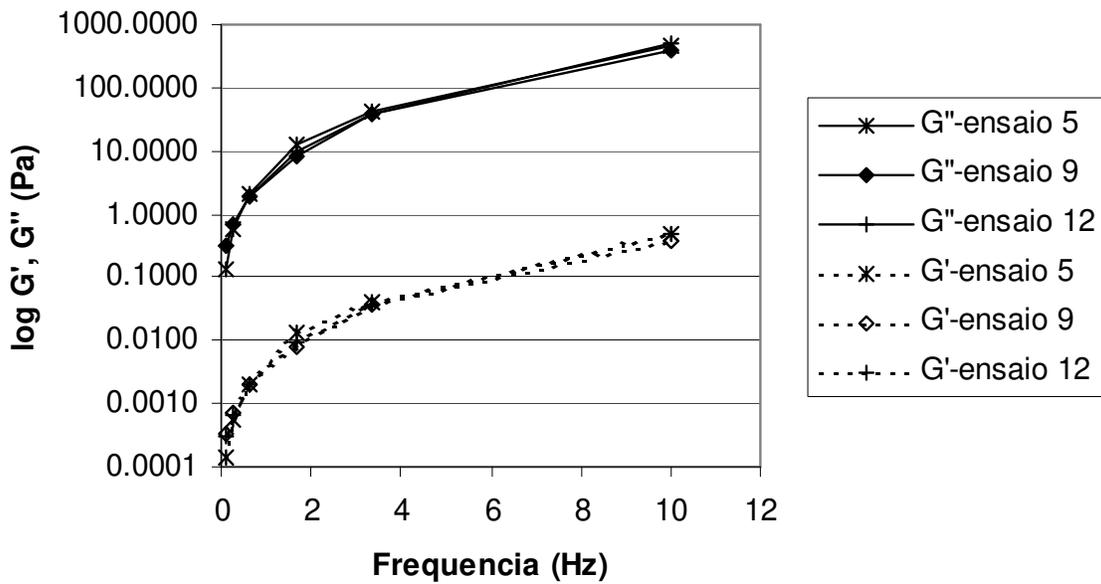
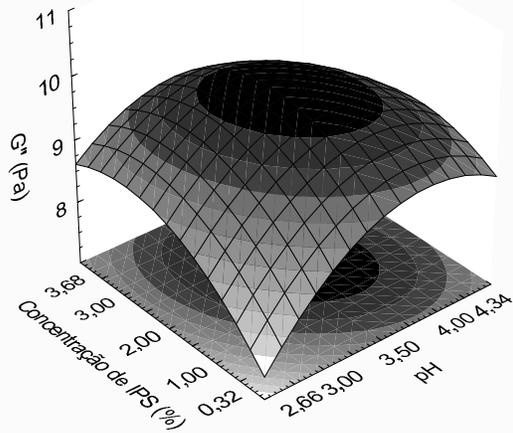
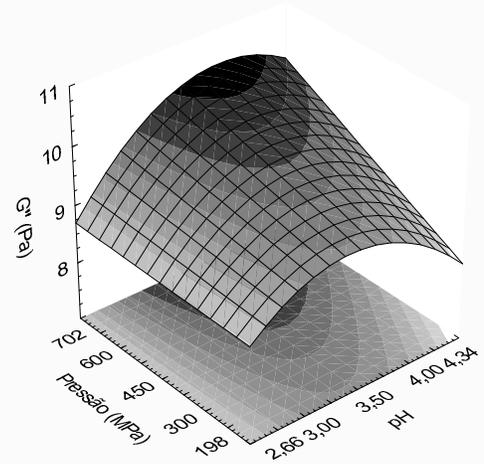


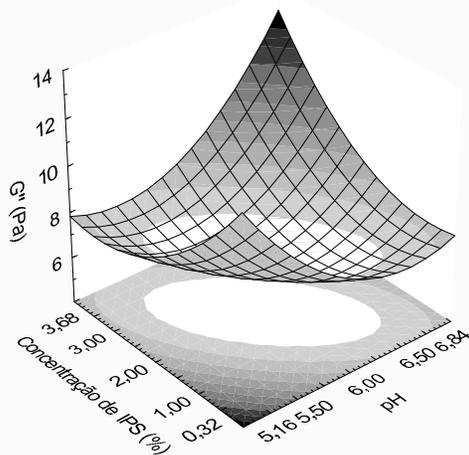
FIGURA 2.4 - Módulos G' (linhas tracejadas) e G'' (linhas cheias) em função da freqüência para amostras selecionadas (a) Experimento I (Ensaio 3= 1% de IPS, pH=4,00, 300 MPa; Ensaio 11= 2% de IPS, pH=2,66, 450 MPa; Ensaio 14= 2% IPS, pH=3,50, 702 MPa. e (b) Experimento II (Ensaio 5= 1% de IPS, pH=5,50, 600 MPa; Ensaio 9= 0,32% de IPS, pH=6,00, 450 MPa; Ensaio 12= 2% IPS, pH=6,84, 450 MPa).



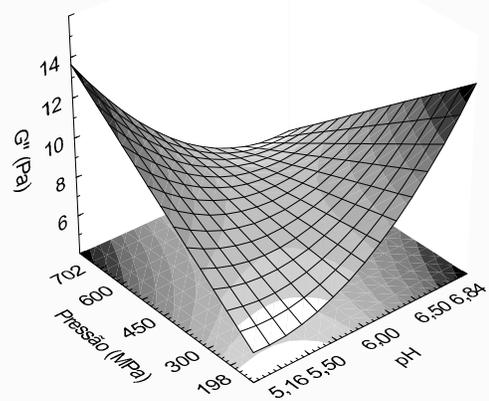
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 2.5 – Superfícies de resposta para G'' em função das variáveis pH e concentração de IPS (a e c) e pH e alta pressão (b e d) para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d).

Os coeficientes de regressão para a resposta G'' obtidos no Experimento I foram expostos na Tabela 2.16. Neste Experimento, os termos pressão quadrática e interação concentração IPS e pressão não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) para a resposta G'' , sendo estes termos incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 2.17). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (16,70) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (10,50) não foi significativo ($p > 0,01$) e sendo muito boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (92,92%), pôde-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,25%). A equação codificada de segunda ordem (Equação 2.9) que expressa G'' em função das variáveis estudadas para o Experimento I foi:

$$G'' = 9,84 + 0,09(\text{concentração de IPS}) + 0,12(\text{pH}) + 0,22(\text{pressão}) - 0,17(\text{concentração de IPS})^2 - 0,23(\text{pH})^2 - 0,11(\text{concentração de IPS})(\text{pH}) + 0,10(\text{pH})(\text{pressão}) \quad (\text{Equação 2.9})$$

No Experimento II, os termos lineares concentração de IPS, pH e pressão e o termo quadrático da pressão não foram significativos ($p > 0,05$) para a resposta G'' (Tabela 2.18). Estes termos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 4.19). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (8,27) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (5,14) não foi significativo ($p > 0,01$) e sendo razoável a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 79%), pôde-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais em relação a soma dos quadrados foi baixo (cerca de 0,86%), indicando uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais. A equação codificada de segunda ordem (Equação 2.10) que expressa a resposta G'' em função das variáveis estudadas para o Experimento II foi:

$$G'' = 8,30 + 0,45(\text{concentração de IPS})^2 + 0,57(\text{pH})^2 + 0,64(\text{concentração de IPS})(\text{pH}) - 1,04(\text{concentração de IPS})(\text{pressão}) - 1,02(\text{pH})(\text{pressão}) \quad (\text{Equação 2.10})$$

TABELA 2.16 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta G”.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
Média	9,79*	0,0296	331,1526	0,000009	9,6666	9,9211
Concentração Proteína (L)	0,09*	0,0139	6,3357	0,024018	0,0282	0,1477
Concentração Proteína (Q)	-0,16*	0,0153	-10,5796	0,008816	-0,2275	-0,0960
pH (L)	0,12*	0,0139	8,8431	0,012548	0,0631	0,1826
pH (Q)	-0,22*	0,0153	-14,2224	0,004907	-0,2832	-0,1516
Pressão (L)	0,22*	0,0139	15,5876	0,004090	0,1567	0,2762
Pressão (Q)	0,04	0,0153	2,6383	0,118636	-0,0254	0,1061
1L x 2L	-0,11*	0,0181	-6,2547	0,024622	-0,1916	-0,0354
1L x 3L	-0,07	0,0181	-3,8162	0,062316	-0,1473	0,0088
2L x 3L	0,10*	0,0181	5,8001	0,028463	0,0272	0,1833

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de proteína; 2= pH; 3= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 2.17 – Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta G” para o Experimento I.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	7	1,989	0,284	16,70	5,61*
Resíduo	9	0,151	0,017		
Fator de ajuste	7	0,146	0,021	10,50	99,36**
Erro Puro	2	0,005	0,002		
Total	16	2,136			

% variação explicada (R^2) = 92,92%. * $F_{(7, 9; 0,01)}$ e ** $F_{(7, 2; 0,01)}$

TABELA 2.18 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta G”.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média	8,095*	0,2150	37,6570	0,00070	7,1699	9,0197
Concentração Proteína (L)	0,087	0,1009	0,8616	0,47973	-0,3474	0,5213
Concentração Proteína (Q)	0,498*	0,1111	4,4792	0,04640	0,0196	0,9757
pH (L)	0,099	0,1009	0,9854	0,42832	-0,3349	0,5338
pH (Q)	0,619*	0,1111	5,5738	0,03071	0,1412	1,0974
Pressão (L)	0,372	0,1009	3,6879	0,06630	-0,0621	0,8066
Pressão (Q)	0,159	0,1111	1,4308	0,28879	-0,3191	0,6370
1L x 2L	0,643*	0,1319	4,8761	0,03958	0,0756	1,2106
1L x 3L	-1,043*	0,1319	-7,9069	0,01562	-1,6104	-0,4754
2L x 3L	-1,016*	0,1319	-7,7041	0,01643	-1,5836	-0,4486

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de proteína; 2= pH; 3= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 2.19 – Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta G” para o Experimento II.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	5	25,65	5,13	8,27	5,32*
Resíduo	11	6,79	0,62		
Fator de ajuste	9	6,52	0,72	5,14	99,32**
Erro Puro	2	0,28	0,14		
Total	16	32,44			

% variação explicada (R^2) = 79,06%. *F_(5, 11; 0,01) e **F_(9, 2; 0,01)

3.2.4. Resultados das análises específicas das amostras selecionadas

Conforme já relatado no item 2.2.5 (Métodos analíticos), foram tomados os tratamentos que apresentaram em cada delineamento composto central rotacional (Experimentos I e II) os maiores valores de solubilidade, IAE e valor de G'' , tendo-se assim, três (3) amostras selecionadas em cada experimento, num total de seis (6). Estas amostras foram analisadas também quanto ao teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica.

Observou-se que, de maneira geral, as amostras selecionadas com maior valor de IAE apresentaram um valor baixo de solubilidade proteica. Este resultado está de acordo com o observado por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) que não encontraram correlação entre os valores de solubilidade e IAE para as amostras de proteína de soja.

3.2.4.1. Conteúdo de sulfidril livre.

Os valores do teor de sulfidril livre apresentados por estas amostras antes e após o tratamento sob alta pressão foram apresentados na Tabela 2.20. Observou-se que todas as amostras analisadas exibiram o mesmo tipo de comportamento, isto é, os valores de sulfidril livre diminuíram após o tratamento sob alta pressão, mostrando que após este processo talvez novas ligações S-S tenham sido formadas. Este fato também foi observado por Kajiyama et al. (1995) em extrato hidrossolúvel de soja e por Puppo et al. (2004) que afirmaram que o efeito do desdobramento da molécula de proteína induzido pela alta pressão foi acompanhado pela formação de pontes dissulfídicas (S-S).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores dos teores de sulfidril livre antes e após o tratamento sob alta pressão para quase todas as amostras analisadas, com exceção da amostra do ensaio 9 do Experimento II. Os valores de sulfidril livre do IPS original diferiram significativamente ($p < 0,05$) de todas as amostras analisadas, mostrando que a preparação da amostra e principalmente o

ajuste de pH causaram perdas de sulfidrila livre antes do tratamento sob alta pressão. As menores perdas de sulfidrila livre foram dos ensaios 11 (2% de IPS, pH=2,66 e 450 MPa de pressão) e 14 (2% IPS, pH=3,50 e 702 MPa de pressão) do Experimento I e as amostras acidificadas exibiram, de maneira geral, menor percentual de perda de sulfidrila livre em relação às demais amostras em valores de pH mais elevados, com exceção do ensaio 3 (1% de IPS, pH=4,00, 300 MPa de pressão) do Experimento I que apresentou evidências de agregação. No entanto, a amostra do ensaio 3 do Experimento I estava próxima ao ponto isoelétrico da proteína de soja, levando à uma maior agregação.

O conteúdo de sulfidrila livre do IPS (7,41 μ moles/g de proteína) foi superior ao relatado por Takeiti (2002) que obteve 3,82 (μ moles/ g de proteína), porém está próximo ao relatado por Liu, Xiong e Butterfield (2000) que encontraram valores de cerca de 10 μ moles/ g de proteína.

TABELA 2.20 – Conteúdo de sulfidrila livre (μ moles/ g de proteína) do IPS e das amostras selecionadas dos delineamentos completos, antes e após a pressurização.

Amostra/ Ensaio	Teor de sulfidrila livre inicial (antes da pressurização)	Teor de sulfidrila livre após tratamento sob pressão	Perda do teor de sulfidrila livre após tratamento sob pressão (%)
IPS	7,41 \pm 0,16 ^{2,3}	-	
Experimento I			
3 ¹	6,04 \pm 0,04 ^{4,a}	3,48 \pm 0,30 ^{4,b}	42,38
11 ¹	5,84 \pm 0,06 ^{4,a}	4,94 \pm 0,17 ^{4,b}	15,41
14 ¹	5,07 \pm 0,10 ^{3,a}	4,12 \pm 0,08 ^{4,b}	18,73
Experimento II			
5 ¹	5,24 \pm 0,06 ^{4,a}	2,62 \pm 0,04 ^{4,b}	50,00
9 ¹	2,83 \pm 0,27 ^{4,a}	1,85 \pm 0,51 ^{4,a}	34,63
12 ¹	5,19 \pm 0,81 ^{4,a}	3,44 \pm 0,49 ^{4,b}	33,72

¹ Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

² o valor de sulfidrila livre difere significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) de todas as demais amostras.

³ valores médios de quatro determinações realizadas em triplicata \pm desvio padrão.

⁴ valores médios de duas determinações realizadas em triplicata \pm desvio padrão.

Sendo: Experimento I : Ensaio 3= 1% de IPS, pH=4,00, 300 MPa; Ensaio 11= 2% de IPS, pH=2,66, 450 MPa; Ensaio 14= 2% IPS, pH=3,50, 702 MPa. Experimento II: Ensaio 5= 1% de IPS, pH=5,50, 600 MPa; Ensaio 9= 0,32% de IPS, pH=6,00, 450 MPa; Ensaio 12= 2% IPS, pH=6,84, 450 MPa.

3.2.4.2 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).

Os valores de entalpia e de temperatura de desnaturação das médias das três amostras analisadas para cada um destes ensaios selecionados dos Experimentos I e II foram apresentados na Tabela 2.21. Os termogramas obtidos durante a análise de calorimetria diferencial de varredura foram colocados no Anexo D. As curvas levantadas para cada ensaio apresentaram as mesmas concentrações de proteína utilizadas originalmente na sua preparação, assim sendo, não foi possível estabelecer comparações dos valores de T_d e ΔH entre os ensaios. Estas comparações foram feitas apenas para cada ensaio antes e após o tratamento sob alta pressão.

Observou-se na curva do IPS (Anexo D) que houve dois picos bem definidos cujos valores médios da temperatura de desnaturação foram de 73,25°C correspondente a fração 7S e 90,70°C para a fração 11S. Estes valores embora inferiores, foram próximos aos obtidos por Souza, 2000 (75,7°C e 92,6°C, para respectivamente as frações 7S e 11S) e também por Takeiti, 2002 (75,39°C para a fração 7S e 93,17°C para a fração 11S). Os valores de temperatura de desnaturação mencionados por Puppo et al. (2004) foram de 73,9°C para a fração 7S e de 86,7°C para a fração 11S. A curva obtida para o isolado proteico de soja colocada nestes gráficos tem apenas caráter ilustrativo, para elucidar os picos das frações 7S e 11S e foi utilizada apenas para o cálculo das temperaturas de desnaturação do IPS original, não sendo utilizada para a comparação dos valores de T_d e ΔH , pois esta curva estava em uma concentração mais elevada (20%) do que as demais amostras dos ensaios.

Em nenhum termograma, tanto para as amostras antes do tratamento sob pressão como para as amostras após este tratamento, foi possível visualizar o pico correspondente a fração 7S. A preparação das amostras com o respectivo ajuste de pH pode ter contribuído para o desaparecimento do pico correspondente a proteína 7S, visto que a estabilidade térmica está associada também ao pH. Zhang et al. (2005) analisando os efeitos do tratamento sob alta pressão sobre as

proteínas do extrato hidrossolúvel de soja observaram que a fração 7S foi muito sensível ao tratamento sob pressão sendo desnaturada acima de 300 MPa e a fração 11S desnaturada acima de 400 MPa. Estes mesmos efeitos foram também observados por Molina, Defaye e Ledward (2002) que analisaram as frações 7S e 11S extraídas do IPS.

Pela análise de variância, com exceção da amostra do ensaio 3, do Experimento I, todas as demais amostras não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação à temperatura de desnaturação antes e após o processamento sob alta pressão. No caso da amostra do ensaio 3 do Experimento I, no qual houve diferença significativa entre as temperaturas de desnaturação antes e após o tratamento sob alta pressão observou-se que a temperatura de desnaturação após o tratamento sob pressão foi menor do que a observada antes do tratamento (Tabela 2.21), isto indica um decréscimo da estabilidade térmica após este tratamento, conforme também observado por Galazka, Sumner e Ledward (1996). Puppó e Anón (1999) observaram um decréscimo da estabilidade térmica com o aumento da acidez.

Apenas as amostras dos ensaios 11 e 14 do Experimento I apresentaram algum grau de desnaturação. Em relação aos valores de ΔH , todas as amostras dos ensaios, com exceção da amostra do ensaio 3 do Experimento I, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de ΔH antes e após o tratamento sob alta pressão, indicando que o tratamento sob alta pressão não contribuiu, de maneira geral, para a desnaturação da proteína. A entalpia é um parâmetro termodinâmico que indica mudanças ocorridas na proteína, como ruptura de pontes de hidrogênio, de interações hidrofóbicas e agregação (MURRAY; ARNTFIELD; ISMOND, 1985). Valores mais altos de entalpia estão associados a maiores porcentagens de proteína nativa ou pouco desnaturada (WAGNER; AÑÓN, 1990). No entanto, esta técnica também apresenta limitações para a caracterização da agregação associada a desnaturação térmica (BEVERIDGE; ARNTFIELD; MURRAY, 1985).

Dumay, Kalichevsky e Cheftel (1994) observaram que a alta pressão induz tanto o desdobramento como a agregação de β -lactoglobulinas (concentração de 2,5%) que podem ser parcialmente reversíveis com o tempo de estocagem após a pressurização. Foram observados aumentos nos valores de entalpia em relação a amostra pressurizada inicialmente (2,5% de proteína, 0% de sacarose) com o aumento do tempo de estocagem. Kolakowski, Dumay e Ledward (2001) verificaram que as amostras pressurizadas de β -lactoglobulinas estocadas por mais de 24 horas também apresentaram um ligeiro aumento no valor da entalpia.

TABELA 2.21 – Temperatura (T_d) e entalpia (ΔH) de desnaturação das amostras selecionadas antes e depois do tratamento sob alta pressão.

Experimento/Ensaio	T_d ($^{\circ}\text{C}$) ^{1, 2}	ΔH (J/g de proteína) ^{1, 2}	Desnaturação (%) ³
IPS	90,70 \pm 0,32		-
Experimento I			
3 (antes alta pressão)	85,53 \pm 0,01 ^a	0,0025 \pm 0,0010 ^a	-
(após alta pressão)	80,05 \pm 3,19 ^b	0,0063 \pm 0,0017 ^b	
11 (antes alta pressão)	91,00 \pm 0,50 ^c	0,0032 \pm 0,0011 ^c	18,75
(após alta pressão)	89,73 \pm 0,11 ^c	0,0026 \pm 0,0008 ^c	
14 (antes alta pressão)	85,01 \pm 2,87 ^d	0,0087 \pm 0,0012 ^d	10,34
(após alta pressão)	84,55 \pm 1,85 ^d	0,0078 \pm 0,0022 ^d	
Experimento II			
5 (antes alta pressão)	81,45 \pm 1,60 ^e	0,0020 \pm 0,0005 ^e	-
(após alta pressão)	79,91 \pm 0,80 ^e	0,0032 \pm 0,0003 ^e	
9 (antes alta pressão)	80,17 \pm 2,40 ^f	0,0017 \pm 0,0004 ^f	-
(após alta pressão)	79,00 \pm 0,70 ^f	0,0021 \pm 0,0003 ^f	
12 (antes alta pressão)	83,87 \pm 0,37 ^g	0,0057 \pm 0,0010 ^g	-
(após alta pressão)	80,95 \pm 2,30 ^g	0,0087 \pm 0,0009 ^g	

¹ Média de três determinações \pm desvio padrão;

² Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) comparando-se apenas cada um dos ensaios, antes e após o tratamento sob alta pressão.

³ % Desnaturação = $[(\Delta H \text{ antes alta pressão} - \Delta H \text{ após alta pressão}) / \Delta H \text{ antes alta pressão}] \times 100$
 Sendo: Experimento I : Ensaio 3= 1% de IPS, pH=4,00, 300 MPa; Ensaio 11= 2% de IPS, pH=2,66, 450 MPa; Ensaio 14= 2% IPS, pH=3,50, 702 MPa.
 Experimento II: Ensaio 5= 1% de IPS, pH=5,50, 600 MPa; Ensaio 9= 0,32% de IPS, pH=6,00, 450 MPa; Ensaio 12= 2% IPS, pH=6,84, 450 MPa.

3.2.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).

O cromatograma apresentado na Figura 2.6 mostrou que o IPS original exibiu três (3) picos bem definidos obtidos em 23,3, 26,3 e 27,4 minutos. O segundo pico, que apresentou a maior área foi o único que aparece em todas as amostras analisadas (Figuras 2.7 e 2.8) tanto antes como após o tratamento sob alta pressão. Observou-se que apenas a mudança de pH (amostras antes do tratamento sob alta pressão) causou alterações no perfil cromatográfico e outras mudanças também podem ser notadas nos cromatogramas após o tratamento sob alta pressão. As Figuras 2.7 e 2.8 apresentaram os cromatogramas das amostras selecionadas com maiores valores de solubilidade proteica, Índice de Atividade Emulsificante e G'' obtidos para os delineamentos completos para respectivamente os Experimentos I e II.

Para as amostras dos ensaios do Experimento I (Figura 2.7) que apresentavam valores de pH mais baixos do que a amostra de IPS original, observou-se que apenas o segundo pico que apareceu no IPS original ficou evidente em todas as amostras tanto antes quanto após o tratamento sob alta pressão. Os cromatogramas antes e após o tratamento sob pressão se mostraram similares e não apresentaram a formação de novos picos. Foram observadas algumas diferenças apenas para a amostra do ensaio 11 (que apresentou o maior valor de solubilidade proteica deste Experimento) onde foi possível visualizar os outros dois picos que apareciam no IPS original e também que o segundo pico (IPS original) apresentou maior intensidade após o tratamento sob alta pressão. Nos cromatogramas dos ensaios 3 e 14, o maior pico que apareceu nas amostras antes do tratamento sob alta pressão (correspondente ao segundo pico do IPS original) diminuiu de intensidade após o tratamento sob alta pressão. Observou-se pela Figura 2.7, que a variação de pH influenciou na mudança do perfil cromatográfico, quando comparado à Figura 2.6, enquanto que as diferenças na pressão aplicada fizeram com que as intensidades dos picos fossem diferentes.

Para o Experimento II, as amostras antes do tratamento sob pressão, em geral, exibiram os 3 picos característicos (Figura 2.8) que apareceram, também, no

cromatograma do IPS original (Figura 2.6). As amostras antes do tratamento sob alta pressão com valor de pH mais próximo da amostra de IPS original (ensaios 9 e 12) foram as que apresentaram o perfil cromatográfico mais próximo ao IPS original, sendo o mais característico o da amostra do ensaio 12 que apresentou também o maior valor de solubilidade. No entanto, no caso dos ensaios 9 e 12 após o tratamento sob alta pressão apenas foi possível visualizar o pico correspondente ao pico 2 do IPS original. O ensaio 5 que apresentou o valor de pH mais baixo entre as amostras selecionadas deste Experimento apresentou baixa resolução dos picos antes do tratamento sob alta pressão, sendo que, após o tratamento sob alta pressão, visualizou-se apenas o pico correspondente ao segundo pico do IPS original.

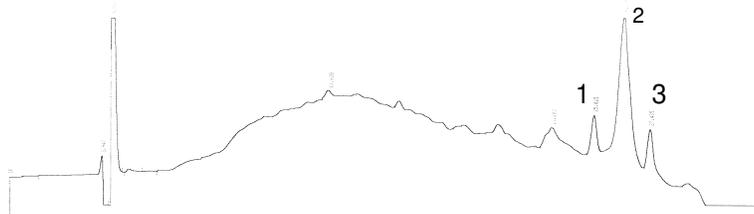
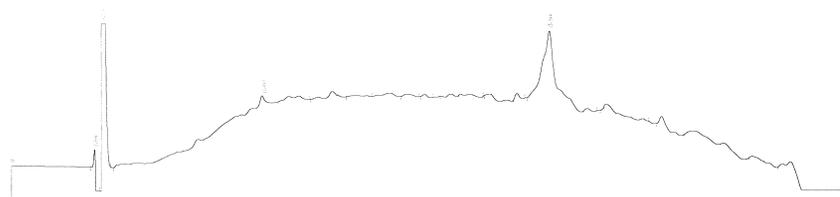
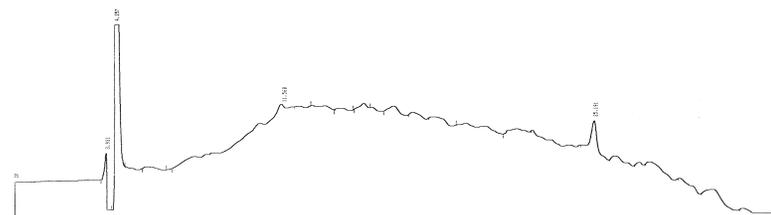


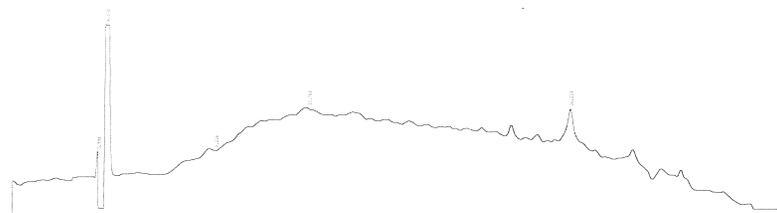
FIGURA 2.6 – Cromatogramas de CLAE-FR do isolado proteico de soja original (pH=6,60), mostrando os picos mais bem definidos 1, 2 3.



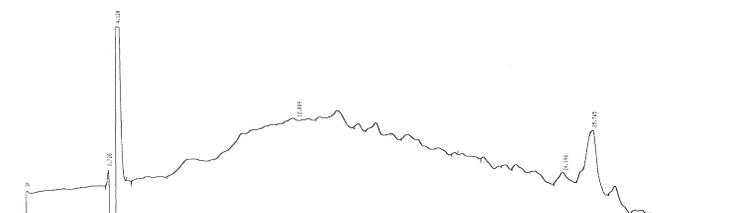
Ensaio 3 (antes do tratamento sob pressão): 1% de IPS, pH=4,00



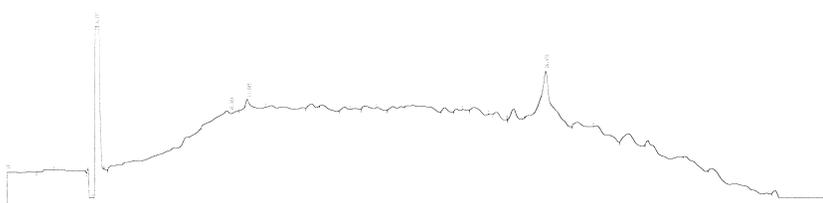
Ensaio 3 após o tratamento sob pressão de 300 MPa.



Ensaio 11 (antes do tratamento sob pressão): 2% de IPS, pH=2,66



Ensaio 11 após o tratamento sob pressão de 450 MPa.

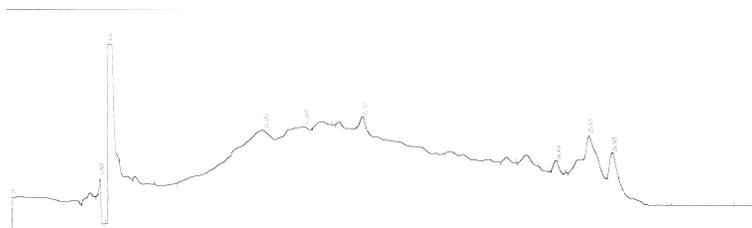


Ensaio 14(antes do tratamento sob pressão): 2% IPS e pH=3,50

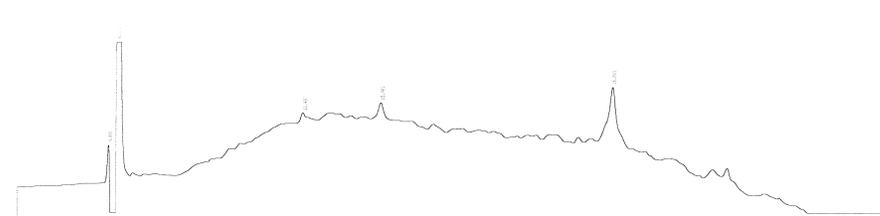


Ensaio 14 após o tratamento sob pressão de 702 MPa.

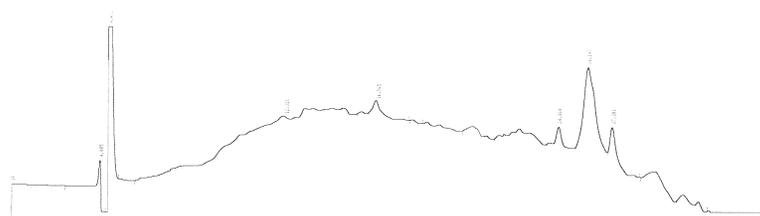
FIGURA 2.7 – Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento I.



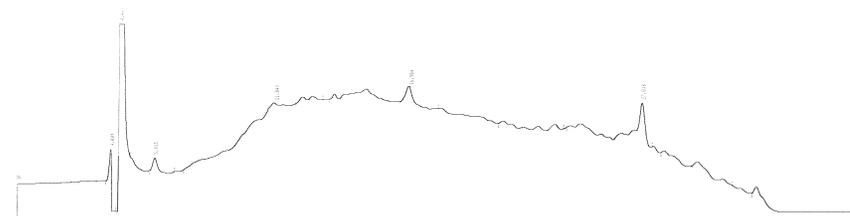
Ensaio 5 (antes do tratamento sob pressão): 1% de IPS, pH=5,50



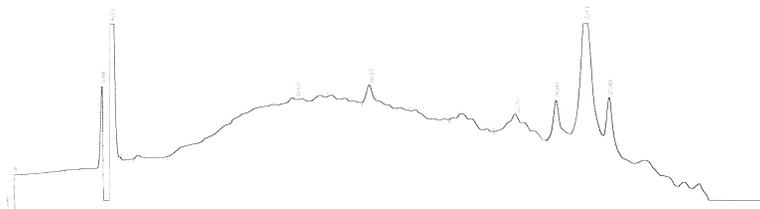
Ensaio 5 após o tratamento sob pressão de 600 MPa.



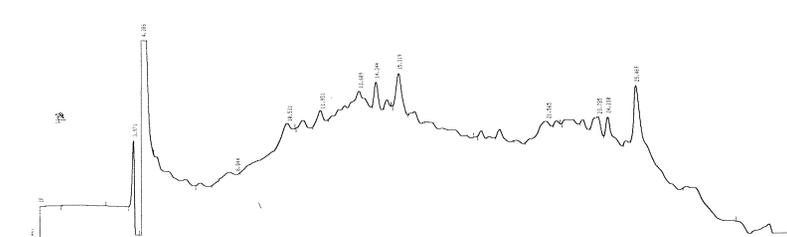
Ensaio 9 (antes do tratamento sob pressão): 0,32% de IPS, pH=6,00



Ensaio 9 após o tratamento sob pressão de 450 MPa.



Ensaio 12 (antes do tratamento sob pressão): 2% IPS e pH=6,84



Ensaio 12 após o tratamento sob pressão de 450 MPa.

FIGURA 2.8 – Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento II.

3.2.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida Native PAGE das amostras selecionadas dos Experimentos I e II antes e após o tratamento sob alta pressão foram mostrados na Figura 2.9. Observou-se que todas as amostras apresentam mudanças nos perfis eletroforéticos após o tratamento sob alta pressão. De modo geral, a banda designada como A (destacada na Figura 2.9) permaneceu intacta em todas as amostras analisadas, independente da pressão aplicada ou composição das amostras.

Todas as amostras antes do tratamento sob pressão do Experimento I apresentaram bandas distintas no topo do gel (Figura 2.9). Na amostra do ensaio 11 do Experimento I, que apresentou o menor valor de pH (2,66), as cargas eletrostáticas inibiram a formação de agregados, resultando em menor número de bandas no início do gel. Após o tratamento sob alta pressão, muitas das bandas distintas desapareceram, principalmente, nas amostras dos ensaios 3 (1% de IPS, pH=4,00 e 300 MPa de pressão) e 14 (2% IPS, pH=3,50 e 702 MPa de pressão), conservando-se praticamente inalterada apenas a banda da amostra do ensaio 11 (2% de IPS, pH=2,66 e 450 MPa de pressão). Como observado na aparência visual das amostras dos ensaios 3 e 14 (Tabela 2.6), estas amostras apresentaram precipitados após o tratamento sob alta pressão, perda de grupos sulfidril livre (Tabela 2.20) e aumento de entalpia (Tabela 2.21 - amostra do ensaio 3), sendo provável que a fração proteica encontrava-se unida, sendo o peso molecular do complexo formado muito elevado de tal forma que este não consiga penetrar no gel de poliacrilamida. Este tipo de comportamento era esperado, visto que, as amostras dos ensaios 3 e 14 estavam mais próximas ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, no qual há a tendência da proteína auto-associar-se. Este fato poderia sugerir também que em valores extremos de pH, onde a proteína estava mais solúvel, o efeito do pH foi mais intenso do que o da pressão quando se comparou as amostras 11 e 3 do Experimento I, mostrando a pouca influência do tratamento sob alta pressão em valores baixos de pH.

No Experimento II (Figura 2.9) todas as amostras antes do tratamento sob alta pressão demonstraram possuir uma grande quantidade de agregados no topo do gel, com destaque para a amostra do ensaio 5 (1% de IPS, pH=5,50 e 600 MPa de pressão). A amostra do ensaio 5 têm o menor valor de pH quando comparada com as demais amostras selecionadas deste Experimento (ensaio 9 = 0,32% de IPS, pH=6,00 e 450 MPa de pressão e ensaio 12 = 2% IPS, pH=6,84 e 450 MPa de pressão) aproximando-se do pI da proteína de soja. No pI, as proteínas tem menor carga eletrostática o que resulta em maior agregação, o que poderia explicar o aparecimento da banda mais escura na amostra 5. Após o tratamento sob alta pressão as estruturas maiores que apareciam no topo do gel tendem a desaparecer, sugerindo a formação de complexos como observado para as amostras de mais baixo pH (Experimento I), não havendo sinais de formação de novas bandas. As amostras dos ensaios 5, 9 e 12 após o tratamento sob alta pressão mostraram uma certa agregação ou formação de complexos como pode ser verificado nas análises de sulfidril livre (Tabela 2.20), sugerindo que alguns agregados foram formados ou permanecem intactos após este tratamento, não permitindo assim a penetração deste complexo de alto peso molecular no gel de poliacrilamida.

A Figura 2.10, comparou o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, em condições redutoras das amostras selecionadas dos Experimentos I e II, antes e após o tratamento sob alta pressão. Os perfis eletroforéticos destas amostras foram bastante similares antes e após o tratamento sob alta pressão, corroborando com os resultados obtidos por Apichartsrangkoon (2003) que não observou mudanças entre os perfis eletroforéticos de SDS-PAGE entre amostras controle de proteína concentrada de soja e às submetidas ao processo de alta pressão (200-800 MPa), tratadas à temperatura ambiente.

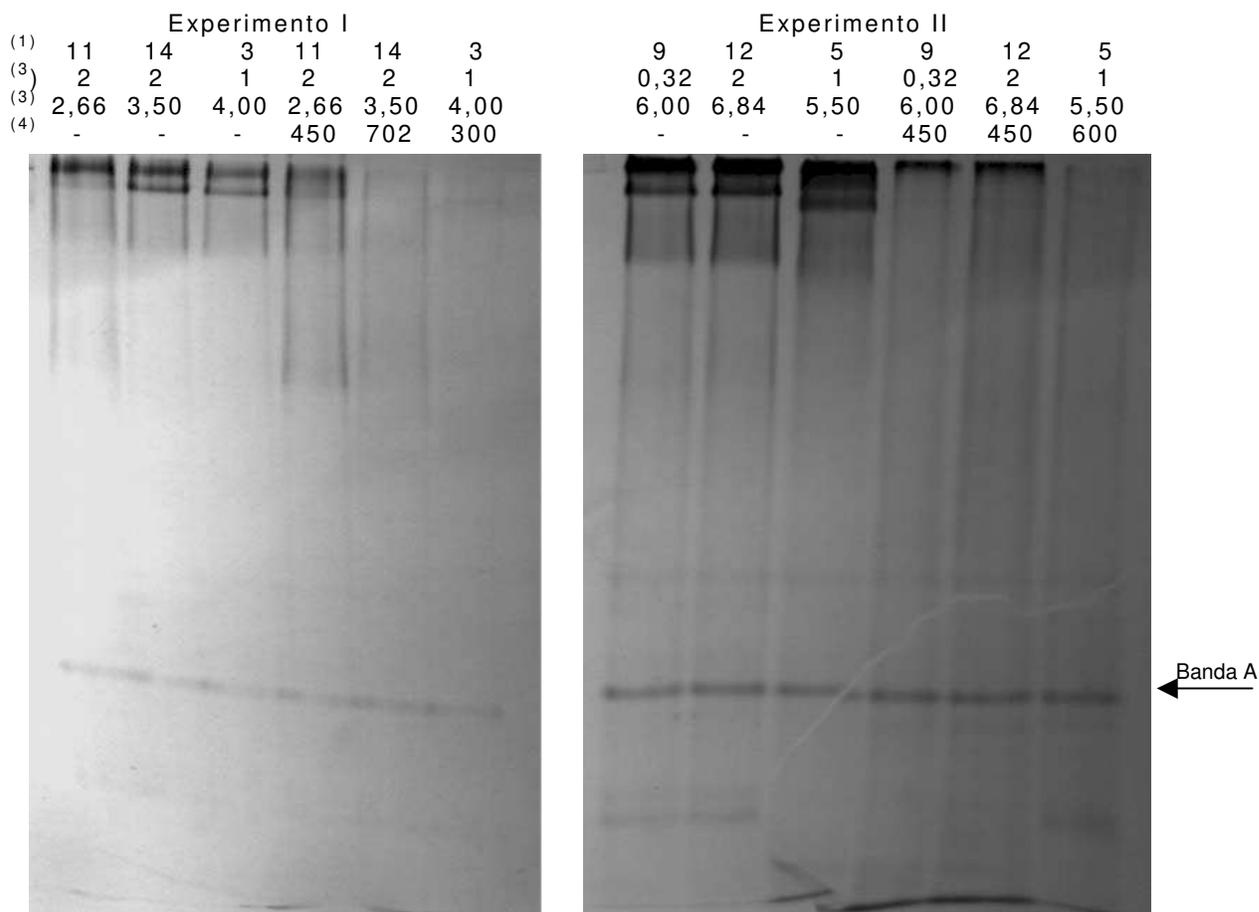


FIGURA 2.9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras selecionadas dos Experimentos I e II, antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo (1) número do ensaio; (2) concentração de IPS (%); (3) pH da amostra e (4) nível de pressão aplicada.

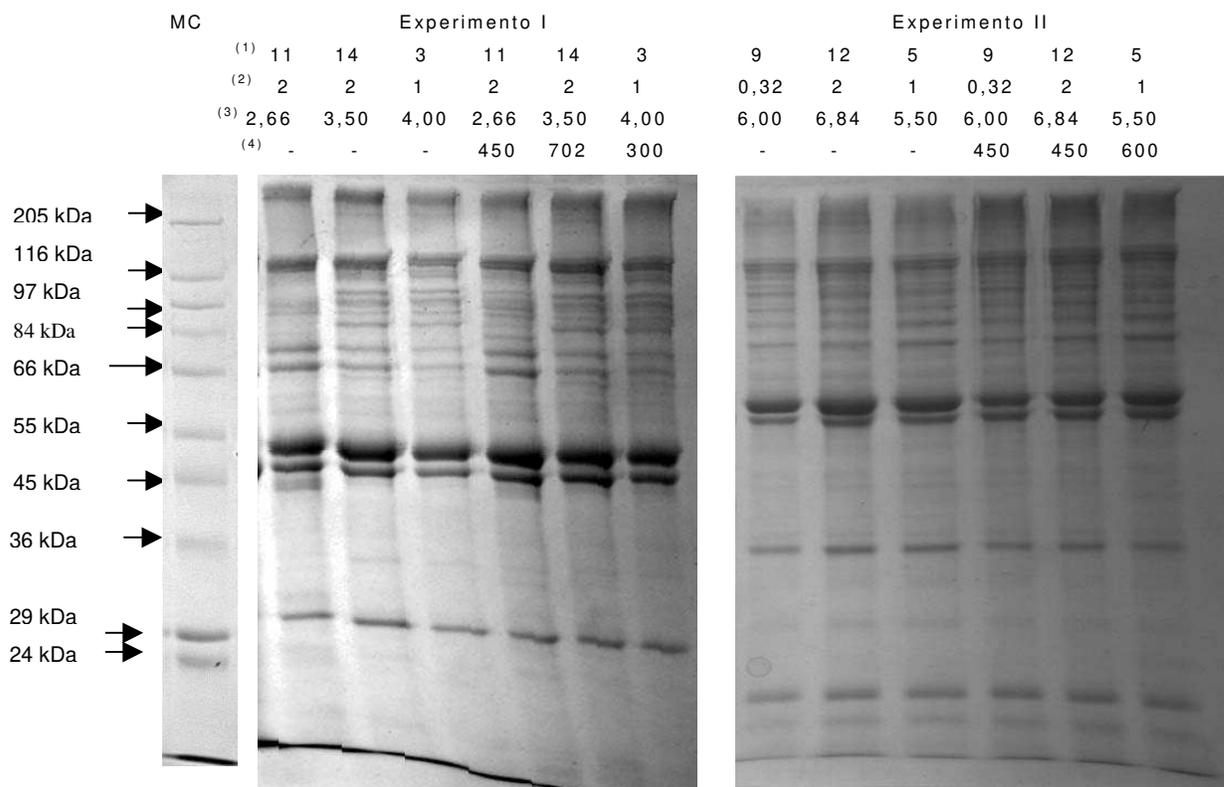


FIGURA 2.10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE), em condições redutoras, das amostras selecionadas dos Experimentos I e II antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo MC=marcadores de peso molecular comercial, (1) número do ensaio; (2) concentração de IPS (%); (3) pH da amostra e (4) nível de pressão aplicada.

3.2.4.5. Microestrutura das amostras selecionadas.

A Figura 2.11 apresentou a microestrutura da amostra de IPS e as Figuras 2.12 e 2.13 apresentaram respectivamente as microestruturas das amostras selecionadas obtidas dos Experimentos I e II. A amostra de IPS apresentou uma conformação plana e bastante característica dos produtos liofilizados (Figura 2.11) que foi facilmente visualizada nas demais microestruturas documentadas.

Para o Experimento I, observou-se que a amostra do ensaio 3 (Figura 2.12 a e b) apresentou nítida agregação após o tratamento sob pressão, o que era de se esperar, pois esta amostra estava em pH 4,00, valor este próximo ao ponto isoelétrico da proteína de soja ($pI \cong 4,5$). As demais amostras deste experimento (ensaios 11 e 14) que possuem pH abaixo de 4,00 não apresentaram diferenças de aparência entre as amostras antes do tratamento sob pressão e após este tratamento (Figura 2.12 c, d, e, f). Embora não haja uma relação direta entre microestrutura e características físico-químicas, alguns destes resultados confirmaram de certa forma os obtidos nas análises de conteúdo de sulfidrila livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia e eletroforese Native-Page, pois a amostra do ensaio 3, mostrou desde a sua elaboração uma aparência agregada, baixa solubilidade proteica, alta perda de sulfidrila livre (42,38%) e aumento de ΔH evidenciando a formação de estruturas diferentes da inicial. A amostra do ensaio 11 que não apresentou diferenças na sua microestrutura, apresentou pequenas diferenças quanto à eletroforese Native-PAGE, nenhuma diferença na eletroforese SDS-page, pequena perda de teor de sulfidrila livre (15,41%) e nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de ΔH antes e após o tratamento sob alta pressão, embora tenha sido observado um certo grau de desnaturação, evidenciando que não houve mudanças drásticas na estrutura da proteína, pelos resultados das análises realizadas. A amostra do ensaio 14, embora não tenha apresentado diferença na sua microestrutura, apresentou também pequena perda do teor de sulfidrila livre (18,73%), diminuição de ΔH evidenciando certa desnaturação proteica que pode ser confirmada pelas alterações observadas também na cromatografia e eletroforese Native-Page.

A amostra do ensaio 5 do Experimento II (Figura 2.13 a, b) apresentou uma ligeira diferença na aparência do IPS após o tratamento sob alta pressão, evidenciando uma ligeira deformação da sua estrutura original. A amostra do ensaio 9 (Figura 2.13 c, d) que possuía um teor de proteína pequeno (0,32%), teve uma aparência mais agregada antes do tratamento sob alta pressão do que após este tratamento, embora os agregados estejam mais dispersos. O mesmo comportamento foi observado na amostra do ensaio 12 (Figura 2.13 e, f) que parecia ter uma estrutura mais agregada antes do tratamento sob alta pressão do que após este tratamento. Os resultados dos ensaios 9 e 12 estão particularmente coerentes com os resultados obtidos na eletroforese Native-PAGE destas amostras, visto que indicavam a presença de agregados antes do tratamento sob alta pressão. De maneira geral, os resultados obtidos para as amostras do Experimento II foram coerentes com os obtidos na determinação de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura e cromatografia, visto que todos estes resultados apontaram diferenças nas estruturas das amostras antes e após o tratamento sob alta pressão.

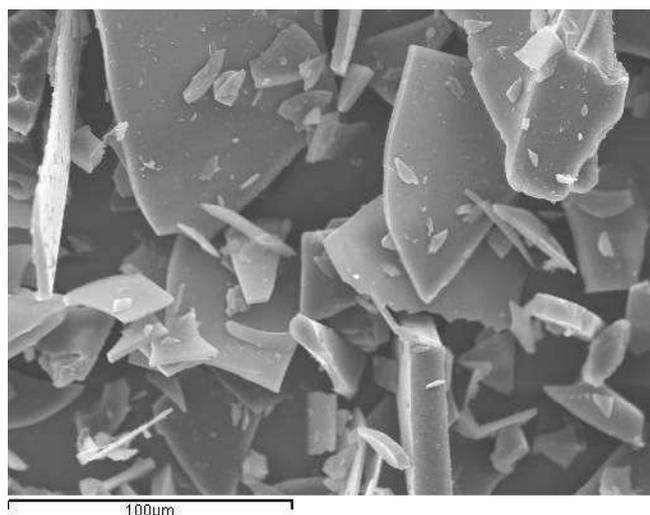
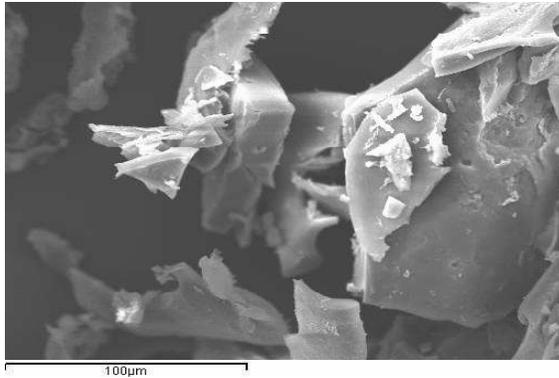
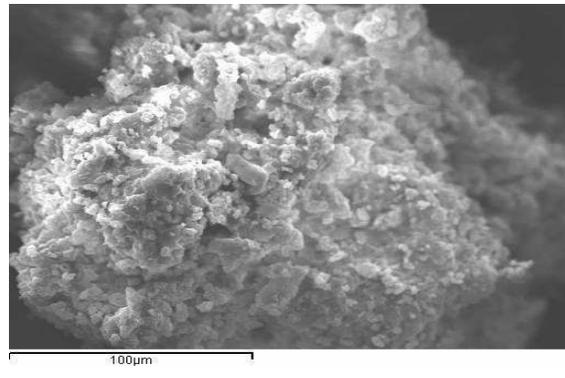


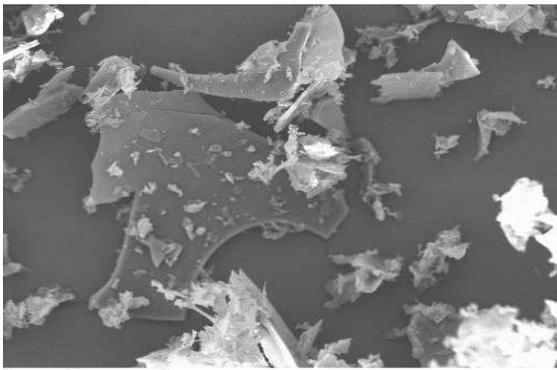
FIGURA 2.11 – Microestrutura do IPS original liofilizado (pH=6,6), sem tratamento, com aumento de 540 vezes.



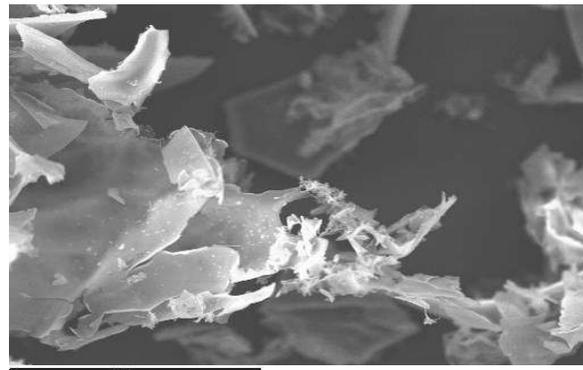
(a) 1% IPS, pH = 4,0, antes do tratamento.



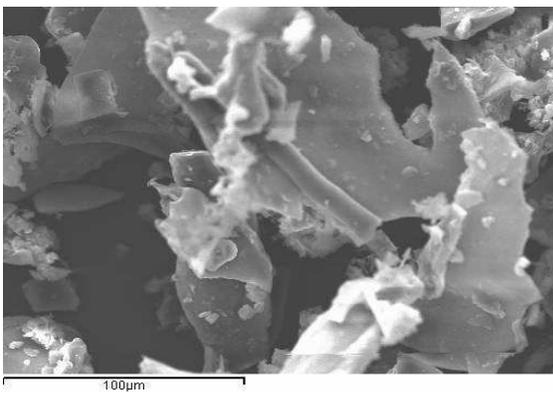
(b) 1% IPS, pH = 4,0, 300 MPa de pressão.



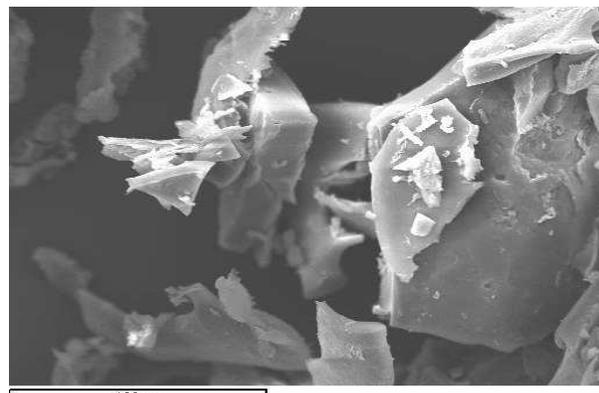
(c) 2% IPS, pH = 2,66, antes do tratamento.



(d) 2% IPS, pH = 2,66, 450 MPa de pressão.



(e) 2% IPS, pH = 3,5, antes do tratamento.



(f) 2% IPS, pH = 3,5, 702 MPa de pressão.

FIGURA 2.12 - Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento I, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 3 (1% IPS, pH=4,0); (b) Ensaio 3 (1% IPS, pH=4,0, 300 MPa); (c) Ensaio 11 (2% IPS, pH=2,66) e (d) Ensaio 11 (2% IPS, pH=2,66, 450 MPa); (e) Ensaio 14 (2% IPS, pH=3,5) e (f) Ensaio 14 (2% IPS, pH=3,5, 702 MPa).

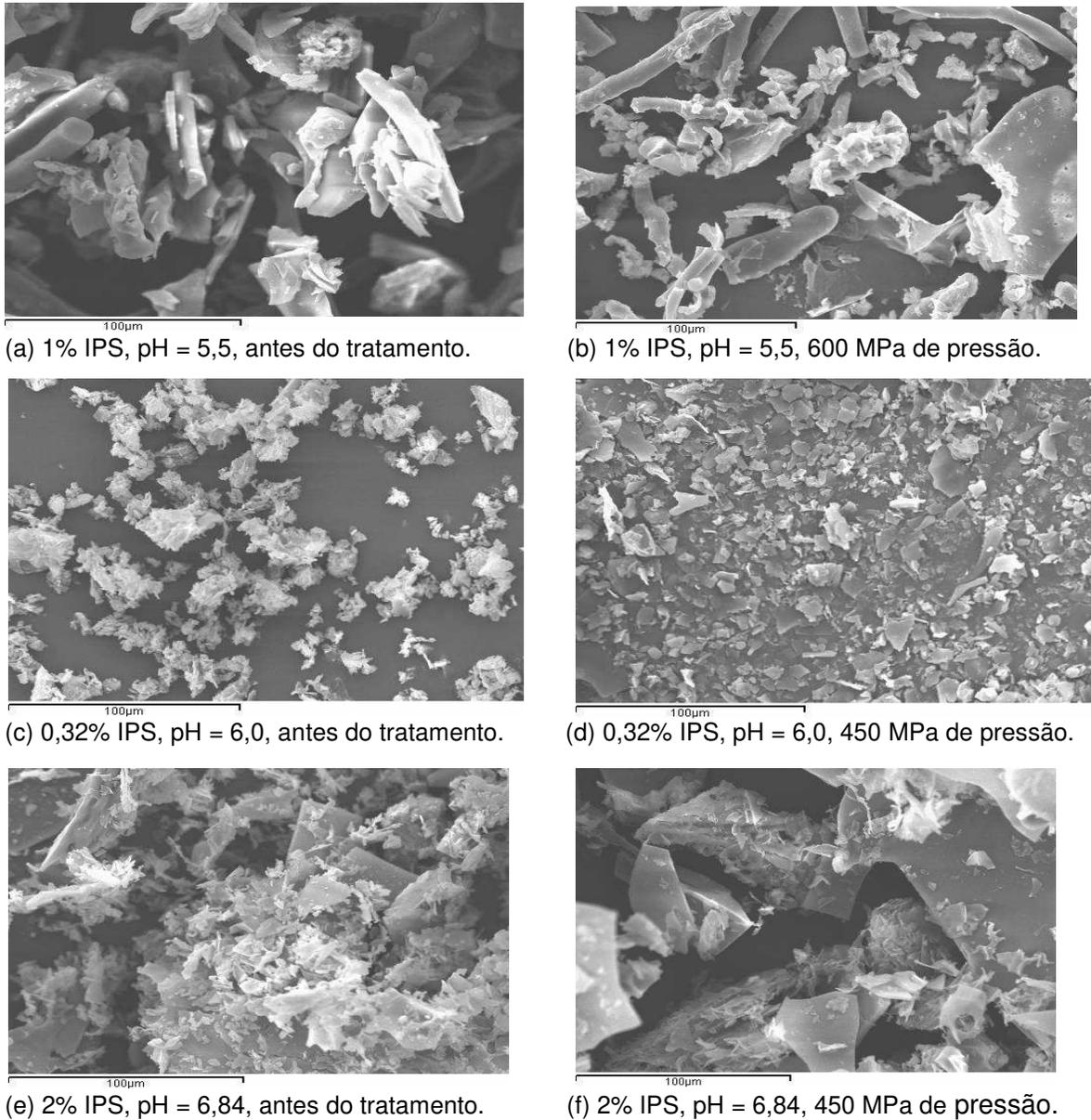


FIGURA 2.13 – Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento II, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 5 (1% IPS, pH=5,50); (b) Ensaio 5 (1% IPS, pH=5,50, 600 MPa); (c) Ensaio 9 (0,32% IPS, pH=6,00) e (d) Ensaio 9 (0,32% IPS, pH=6,00, 450 MPa); (e) Ensaio 12 (2% IPS, pH=6,84) e (f) Ensaio 12 (2% IPS, pH=6,84, 450 MPa).

4. Conclusão

A solubilidade proteica foi fortemente influenciada pela variável pH em ambas as faixas de pH estudadas. Na faixa de pH 5,16-6,84 a concentração de proteína exerce também influência sobre a solubilidade proteica.

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi influenciado pelas variáveis estudadas concentração de IPS, pH e pressão aplicada. Em ambas as faixas de pH estudadas a concentração de IPS influencia negativamente o IAE. Na faixa de pH mais baixa (2,66 – 4,34 – Experimento I) o valor de IAE é máximo nos tratamentos sob baixa pressão. Na faixa de pH de 5,16 a 6,84 (Experimento II) os valores mais altos de IAE foram obtidos na região de valores centrais de pressão e de baixo pH. Em ambas as faixas de pH estudadas os valores máximos de IAE obtidos foram bem superiores (434,39 m²/g para o Experimento I e 297,93 m²/g para o Experimento II) ao do IPS original (97,19 m²/g).

Em todos os experimentos realizados, o módulo de perda ou componente viscoso (G'') foi o componente dominante, exibindo um comportamento predominantemente viscoso. Apesar dos efeitos serem pequenos, o módulo G'' foi influenciado por todas as variáveis estudadas (concentração de IPS, pH e pressão). A concentração de IPS influenciou positivamente os valores de G'' em ambas as faixas de pH estudadas e o aumento dos valores de pressão influenciaram positivamente os valores de G'' na faixa de pH 2,66-4,34. Na faixa de pH 5,16-6,84 o valor de G'' é máximo nos extremos dos valores de pressão.

A análise das amostras selecionadas com os maiores valores de solubilidade proteica, IAE e G'' em cada experimento mostraram que o tratamento sob alta pressão diminuiu em maior ou menor grau o teor de sulfidril livre de todas as amostras analisadas, evidenciando uma mudança na molécula da proteína confirmada pelas alterações observadas através das análises de CDV, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica.

Devido a boa solubilidade do IPS em pH ácido e acima de 6,00 é possível a sua utilização tanto em bebidas com pH baixo como nas lácteas conferindo alto teor proteico. Nos produtos onde se requer uma boa capacidade de formar emulsão, pode-se trabalhar na faixa de pH próxima ao ponto isoelétrico e pressões moderadas. O aumento da concentração de proteína e pressão podem favorecer a obtenção de produtos com característica mais viscosa.

5. Agradecimento

À Capes/Ministério da Educação pela concessão de bolsa sanduíche na Universidade de Reading.

6. Referências Bibliográficas

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC**. 16^a ed. Arlington: AOAC International, 1997.

APICHARTSRANGKOON, A. Effects of high pressure on rheological properties of soy protein gels. **Food Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 55-60, 2003.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp. 1995. 299 p.

BEVERIDGE, T.; ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E.D. Protein structure development in relation to denaturation temperatures. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 18, n. 2, p. 189-191, 1985.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH and SS groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 39, n. 1, p. 49-51, 1974.

BIETZ, J. A. Separation of cereal proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, The Netherlands, v. 255, p. 219-238, 1983.

BURKERT, J. F. de M., MALDONADO, R. R., MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Londres, v. 80, n.1, p. 61-67, 2005.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional e modificaciones químicas**. Zaragoza: Editorial Acribia S. A. 1989. 346 p.

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

DUMAY, E. M.; KALICHEVSKY, M. T.; CHEFTEL, J. C. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and baroprotective effects of sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 9, p. 1861-1868, 1994.

GALAZKA, V. B.; SUMNER, I. G.; LEDWARD, D. A. Changes in protein-protein and protein-polysaccharide interactions induced by high pressure. **Food Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 393-398, 1996.

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

HALL, G. M. Basic concepts. In: HALL, G. M. (ed.) **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 1-10.

HARDHAM, J. F. The determination of total and reactive sulphhydryl of whey protein concentrates. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, v. 36, n. 4, p. 153-155, 1981.

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, n. 8, p. 3009-3015, 1998.

- HETTIARACHCHY, N.; KALAPATHY, U. Soybean protein products. In Liu, K. ***Soybeans: chemistry, technology, and utilization***, Chapter 8. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. 1999. p. 379-411.
- HILL, S. E. Emulsions. In: HALL, G. M. (ed.). **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 153-185.
- KAJIYAMA, N.; ISOBE, S.; UEMURA, K.; NOGUCHI, A. Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 147-158, 1995.
- KOLAKOWSKI, P.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Effects of high pressure and low temperature on β -lactoglobulin unfolding and aggregation. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, n. 3, p. 215-232, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, p, 680-685, 1970.
- LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, physical, and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 5, p. 811-818, 2000.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc. 1999. 532p.
- MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.
- MOLINA, E.; DEFAYE, A. B.; LEDWARD, D. A. Soy protein pressure-induced gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 625-632, 2002.
- MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 263-269, 2001.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

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**, Ottawa, v. 18, n. 2, p. 158-162, 1985.

OWUSU-APENTEN, R. K. The bicinchoninic acid protein assay. In: OWUSU-APENTEN, R. K. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 99-124, 2002. 463p.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 3, p. 716-723, 1978.

PUPPO, M. C.; ANON, M. C. Soybean protein dispersions at acid pH: thermal and rheological properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 1, p. 50–56, 1999.

PUPPO, C.; CHAPLEAU, N.; SPERONI, F.; LAMBALLERIE-ANTON, M. de; MICHEL, F.; AÑON, C.; ANTON, M. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 6, p. 1564-1571, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1^a ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SINGH, N.; SINGH, D.; CHAUHAN, G. S. Effects of defatting, coagulants and coagulation pHs on soy protein isolates. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 31, n. 2, p. 117-121, 1994.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: chemistry and technology**. Connecticut: The AVI Publishing Co. Inc, 1972. 470 p.

SOUZA, A. S. de. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2000. 108p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SOUZA, A. S. de. **Efeito da irradiação na composição e propriedades funcionais da soja**. 2006. 99p. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TAKEITI, C. Y. **Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2002. 102p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

WAGNER, J.R.; AÑON, 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.

ZHANG, H.; LI, L.; TATSUMI, E.; ISOBE, S. High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 7-14, 2005.

Capítulo 3

Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre as propriedades funcionais tecnológicas das misturas proteína de soja - polissacarídeos

Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre as propriedades funcionais tecnológicas das misturas proteína de soja-polissacarídeos

RESUMO

O isolado proteico de soja é um produto com pelo menos 90% de proteínas que, associado com polissacarídeos é utilizado como ingrediente em produtos cárneos, alimentos infantis, bebidas e produtos de panificação. Os polissacarídeos aniônicos (carboxilados e sulfatados) são utilizados em alimentos como espessantes, geleificantes e estabilizantes de emulsões. Neste trabalho, foram analisados os efeitos do tratamento sob alta pressão isostática sobre as características funcionais (solubilidade, propriedades emulsificantes e reológicas) do isolado proteico de soja misturado com polissacarídeos (pectina ou κ -carragena). Inicialmente, foi utilizado um planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para avaliar os efeitos das variáveis independentes (concentração de isolado de soja, concentração do polissacarídeo utilizado - pectina ou κ -carragena, pH e nível de pressão), e foi decidido fixar-se a concentração de proteína em 1% para os posteriores planejamentos fatoriais completos (2^3) realizados. Para o planejamento fatorial completo, na faixa de pH 2,66-4,34, foi adicionada pectina à proteína de soja e para o planejamento na faixa de 5,16-6,84, foi utilizada a κ -carragena. Em ambos os planejamentos as variáveis independentes foram a concentração de polissacarídeos (pectina ou κ -carragena), pH e nível de pressão aplicada, obtendo-se as superfícies de respostas. De cada planejamento fatorial completo, foram selecionados os ensaios que apresentaram as maiores respostas em cada característica funcional estudada (solubilidade, índice de atividade emulsificante e G'') e avaliadas também o teor de sulfidril livre, comportamento eletroforético, grau de desnaturação das proteínas (calorimetria diferencial de varredura - CDV), perfil cromatográfico e documentação da microestrutura. A adição de pectina ou κ -carragena ao sistema fez com que outras variáveis, além do pH, influenciassem a solubilidade proteica, embora o efeito do pH tenha sido o mais relevante. Os

maiores valores do Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foram encontrados para os valores médios de pH e concentração de pectina, no entanto, quando se utilizou a κ -carragena, os maiores valores de IAE foram obtidos nas mais baixas concentrações de κ -carragena e igualmente para os valores médios de pH. Embora os efeitos das variáveis sejam pequenos, observou-se que, a incorporação de pectina ao sistema fez com que todas as demais variáveis tivessem efeitos positivos ao aumento do G'' . Quando se utilizou a κ -carragena não foi possível estabelecer um modelo para a resposta G'' em função das variáveis estudadas, verificando-se que os valores de G'' não foram afetados pelas variações de concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada. A análise das amostras selecionadas com os maiores valores de solubilidade proteica, IAE e G'' em cada experimento mostraram que o tratamento sob alta pressão diminuiu em maior ou menor grau o teor de sulfidril livre de todas as amostras analisadas, evidenciando uma mudança na molécula da proteína, confirmada pelas alterações observadas através das análises de calorimetria diferencial de varredura, cromatografia, eletroforese e microscopia eletrônica.

Palavras-chave: isolado proteico de soja; pectina; κ -carragena; solubilidade; índice de atividade emulsificante; módulo de perda.

SUMMARY

Soy protein isolate (SPI) contains at least 90% protein and jointed with polysaccharides are used as an ingredient in meat products, baby foods, beverages and baking products. The anionic polysaccharides (carboxylated and sulphated) are widely used as a thickening, gelling and stabilising agent in the food industry. The aim of this work was to investigate the effects of isostatic high-pressure treatment on functional properties (protein solubility, emulsifying activity index and rheological properties – G' and G'') of soy protein isolate mixed with polysaccharides (pectin and κ -carrageenan). First of all a fractional factorial design (2^{4-1}) was used for soy protein – polysaccharides systems to evaluate the effects of the independent variables: SPI concentration, concentration of polysaccharide

used - pectin or κ -carrageenan, pH and pressure applied. It was decided to fix the SPI concentration as 1% to the next two central composite rotatable designs (2^3). Central composite rotatable designs were employed over two pH ranges with polysaccharide concentration (pectin or κ -carrageenan), pH and high-pressure (198 to 702 MPa) as independent variables. SPI was mixed with pectin in the pH range 2.66 to 4.34 and mixed with κ -carrageenan in the pH range 5.16 to 6.84. The surface responses were obtained for protein solubility, emulsifying activity index (EAI) and G'' . The samples with the highest effect on protein solubility, EAI and G'' value were evaluated as well by electrophoresis, differential scanning calorimetry (DSC), chromatography (HPLC), free sulphhydryl determination, scanning electronic microscopy (SEM). The pectin and κ -carrageenan addition showed that other variables could influence protein solubility as well but the pH still being the major one. The highest EAI was at middle values of pH and pectin concentration. Nevertheless, when κ -carrageenan was used the highest values of EAI were in low κ -carrageenan concentration and middle values of pH. Although of small variables effect on increase of G'' , all the variables effect were positive when pectin was used. When κ -carrageenan was used, G'' was not influenced by studied variables so that it was not possible to establish a model for G'' response. The selected samples analysis showed that high pressure treatment decrease in larger or minor degree the free sulphhydryl content of all analyzed samples standing out a structural change confirmed by means of the other analyses (DSC, HPLC, electrophoresis and in some cases also SEM).

Keywords: soy protein isolate ; pectin; κ -carrageenan; protein solubility; emulsifying activity index ; loss modulus.

1. Introdução

As propriedades funcionais tecnológicas têm sido definidas como qualquer propriedade dos alimentos ou de seus componentes, excetuando-se as nutricionais, que influencie a sua aceitação e utilização (SGARBIERI, 1996).

O uso da alta pressão para modificar a funcionalidade das proteínas foi revisado por Messens, Van Camp e Huyghebaert (1997). Segundo estes autores, a alta pressão pode afetar a conformação das proteínas levando a desnaturação, agregação ou geleificação, dependendo do sistema proteico (tipo de proteína, pH e força iônica), pressão aplicada, temperatura e duração do tratamento. Os efeitos do tratamento sob alta pressão sobre as proteínas estão relacionados com a ruptura das interações não covalentes nas moléculas de proteínas e a subsequente formação de novas pontes intra ou intermoleculares.

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais de alto peso molecular, formados pela condensação de monossacarídeos ou seus derivados, unidos entre si por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos de menor peso molecular são, na sua grande maioria, solúveis em água e designados como hidrocolóides. O interesse por hidrocolóides está baseado no seu comportamento reológico, isto é, na sua viscosidade que determina a sua habilidade de formar gel e seus efeitos estabilizantes. Estas propriedades podem ser obtidas somente depois da solubilização completa da molécula, quando, então, as moléculas são capazes de reorganizar-se através da retenção de moléculas de água (efeito de espessamento) ou pela construção de redes envolvendo zonas de ligação (efeito de geleificação). Todos os hidrocolóides podem ter estas duas propriedades desenvolvidas em maior ou menor extensão, dependendo do seu peso e espaço molecular, presença ou não de grupos funcionais na molécula, temperatura do meio e interações com outros ingredientes do meio, como outros hidrocolóides e cátions (PENNA, 2003).

A interação entre proteínas e polissacarídeos exerce influência direta sobre as propriedades macroscópicas dos alimentos, tais como fluidez, estabilidade e textura. O tratamento sob alta pressão além de preservar os alimentos pode modificar as propriedades funcionais dos seus constituintes, pois as ligações não-covalentes das proteínas e moléculas maiores podem ser alteradas pela alta pressão.

Neste trabalho foram analisados os efeitos do tratamento sob alta pressão isostática sobre as características funcionais (solubilidade, Índice de Atividade Emulsificante - IAE e valor de G'') da mistura de isolado proteico de soja com polissacarídeos: pectina (0,032 a 0,368 g de pectina/g de IPS, pH 2,66 a 4,34 e pressão de 198 a 702 MPa) e κ -carragena (0,032 a 0,368 g de κ -carragena /g de IPS, pH 5,16 a 6,84 e pressão de 198 a 702 MPa). Inicialmente, foram realizados dois planejamentos fatoriais fracionários (2^{4-1}) para avaliar os efeitos das variáveis independentes (concentração de isolado de soja, concentração do polissacarídeo utilizado - pectina ou κ -carragena, pH e nível de pressão), e foi decidido fixar-se a concentração de proteína em 1% para os posteriores planejamentos fatoriais completos (2^3) realizados. Para os planejamentos fatoriais completos, as variáveis independentes foram a concentração de polissacarídeos (0,032 a 0,368 g de polissacarídeo - pectina ou κ -carragena/g de IPS), pH (para o Experimento com adição de pectina: 2,66 a 4,34 e para o Experimento com adição de κ -carragena 5,16 a 6,84) e nível de pressão aplicada (198 a 702 MPa), obtendo-se as superfícies de resposta. De cada planejamento fatorial completo foram selecionados os ensaios que apresentaram as maiores respostas em cada característica funcional estudada (solubilidade, índice de atividade emulsificante e G'') e avaliadas também o teor de sulfidril livre, comportamento eletroforético, grau de desnaturação das proteínas por calorimetria diferencial de varredura (CDV), perfil cromatográfico e documentação da microestrutura.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Isolado proteico de soja

O isolado proteico de soja (IPS) foi obtido a partir da farinha desengordurada de soja (ProsamR®, Bunge Alimentos Ltda.), por extração alcalina (pH 8,0) seguido por precipitação a pH 4,5 e neutralização, conforme o descrito por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001), com modificações. Após o seu preparo, este produto foi congelado em câmaras apropriadas (-18°C) e logo após liofilizado e

triturado. O isolado proteico possuía a seguinte composição centesimal: $94,65 \pm 1,70\%$ de proteína, $0,27 \pm 0,12\%$ de lipídeos, $3,32 \pm 0,07\%$ de cinzas (em base seca), sendo a sua solubilidade proteica de $49,32 \pm 1,84\%$ e o Índice de Atividade Emulsificante (IAE) de $97,19 \pm 3,00 \text{ m}^2/\text{g}$.

2.1.2. Polissacarídeos

Pectina cítrica (Pectina Genu®, tipo 8140), com alto teor de esterificação (69%), pH em solução 1% (2,9 a 3,6) e κ -carragena (Genulacta®carragena, tipo K-100), pH em solução 0,5% (7,0 a 10,0), gentilmente fornecidas pela empresa CP Kelco Brasil S.A.

2.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (p.a.) de várias procedências, salvo algumas especificações mencionadas nos próprios métodos.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo das amostras

Para as amostras utilizadas nos delineamentos estatísticos, foram preparadas alíquotas de 50 g de dispersão de IPS e o polissacarídeo utilizado (pectina ou κ -carragena, conforme o caso) em água desionizada (p/p) em diferentes concentrações, nas duas faixas de pH estudadas (abaixo e acima do ponto isoelétrico da proteína de soja - pl) conforme o especificado na Tabela 3.1 e Tabela 3.2. Esta mistura foi homogeneizada em agitador magnético até que os componentes da mistura se mostrassem aparentemente dissolvidos. O pH foi ajustado pela adição de soluções 0,2 ou 2N de HCl ou NaOH, conforme o caso. As amostras preparadas foram embaladas em embalagens plásticas (Cryovac® W. R. Grace Ltd., Londres, Reino Unido), duplamente seladas e pressurizadas.

2.2.2. Tratamento sob alta pressão

O tratamento das amostras foi realizado em equipamento de alta pressão

isostático destinado à pressurização de alimentos (Food Lab HP Rig, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido), utilizando como meio líquido para a transmissão de pressão ao alimento a mistura de óleo de rícino e etanol (20:80). As amostras foram tratadas sob alta pressão de acordo com a pressão requerida por cada amostra (Tabela 3.1 e 3.2) durante 20 minutos. O vaso de pressão foi operado via ar comprimido com mecanismo de elevação e retração do embolo, bomba de alta pressão e sistema de descompressão. A temperatura inicial do vaso de trabalho não foi alterada sendo mantida nas condições ambientes ($\sim 20,0^{\circ}\text{C}$). O registro das temperaturas durante o processamento sob alta pressão foi mencionado nas Tabelas A3, A4, A5, A6, A7, A8 e A9 (Anexo A).

2.2.3. Análise estatística

Foi utilizada a metodologia de superfícies de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995) para o planejamento e análise dos resultados. Para a avaliação da interação proteína de soja-polissacarídeos, foram executados, inicialmente, dois delineamentos experimentais fracionados 2^{4-1} , tendo como variáveis independentes a concentração de isolado de soja (1 a 3%), concentração do polissacarídeo 0,1 a 0,3% (pectina ou κ -carragena), pH (3,0 a 4,0 e 5,5 a 6,5) e nível de pressão aplicado (300 – 600 MPa), conforme mostra a Tabela 3.1. Foram avaliados os efeitos de cada uma destas variáveis independentes nas respostas desejadas (solubilidade proteica, índice de atividade emulsificante e características reológicas). Com base nestes resultados foram executados dois novos delineamentos compostos centrais rotacionais (2^3), um utilizando pectina e o outro κ -carragena com as variáveis que se mostrarem significativas no delineamento fracionário a nível de 5%. A concentração de IPS foi fixada em 1% para todos os ensaios. Este delineamento incluiu 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios, conforme mostrou a Tabela 3.2. A distância dos pontos axiais foi de $\pm 1,68$, calculada conforme o descrito por Rodrigues e lemma (2005).

TABELA 3.1 – Delineamento Experimental Fatorial Fracionário (2^{4-1}) para os sistemas proteína-polissacarídeo (pectina ou κ -carragena).

Variável independente	Nível codificado		
	-1	0	+1
Experimento I			
Concentração de isolado proteico de soja (%)	1,0	2,0	3,0
pH	3,0	3,5	4,0
Concentração de pectina – g/g de IPS	0,1	0,2	0,3
Nível de pressão (MPa)	300	450	600
Experimento II			
Concentração de isolado proteico de soja (%)	1,0	2,0	3,0
pH	5,5	6,0	6,5
Concentração de κ -carragena - g/g de IPS	0,1	0,2	0,3
Nível de pressão (MPa)	300	450	600

TABELA 3.2 – Delineamento Experimental Fatorial Completo (2^3) para o sistema modelo contendo concentração fixa de isolado proteico de soja (1%) e polissacarídeo (pectina ou κ -carragena).

Variável independente	Nível codificado				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Experimento III					
Concentração de pectina (g/g de IPS)	0,032	0,100	0,200	0,300	0,368
pH	2,66	3,00	3,50	4,00	4,34
Nível de pressão (MPa)	198	300	450	600	702
Experimento IV					
Concentração de κ -carragena (g/g de IPS)	0,032	0,100	0,200	0,300	0,368
pH	5,16	5,50	6,00	6,50	6,84
Nível de pressão (MPa)	198	300	450	600	702

Os ensaios de cada experimento foram realizados de maneira aleatória. Nos casos onde foi utilizado o delineamento composto central rotacional, as respostas solubilidade proteica, IAE e G'' foram descritas por um modelo de segunda ordem e examinadas em termos de ajuste do modelo através de Análise de Variância

(ANOVA). Os dados levantados foram analisados com o auxílio do programa Statística 5.5 da Statsoft Inc. (3225 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). Este mesmo programa também foi utilizado para a comparação das médias de alguns resultados experimentais, por análise de variância e quando diferentes, pelo Método de Tukey (COCKRAN; COX, 1957).

2.2.4. Métodos analíticos

Todas as amostras tratadas sob alta pressão isostática que compunham os delineamentos utilizados foram analisadas quanto a solubilidade proteica, Índice de Atividade Emulsificante (IAE) e análises reológicas (determinação de G' e G''). As amostras que apresentaram em cada delineamento composto central rotacional os maiores valores de solubilidade, IAE e valor de G'' , tendo-se assim, 3 amostras selecionadas em cada delineamento completo, num total de 6 amostras, foram também analisadas quanto ao teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica. As amostras selecionadas foram especificadas na Tabela 3.3 e foram armazenadas sob refrigeração após o tratamento sob alta pressão. No caso específico da análise de microscopia eletrônica, as amostras foram preparadas exclusivamente para esta finalidade, sendo logo após o tratamento sob alta pressão, congeladas e posteriormente liofilizadas e trituradas.

As amostras referentes a cada ensaio experimental foram preparadas e analisadas em uma única amostra e as determinações realizadas em duplicata, triplicata ou sexplicata, conforme o caso. As amostras submetidas ao tratamento sob pressão, foram armazenadas sob refrigeração e analisadas no período máximo, de até 2 dias, após o seu processamento.

TABELA 3.3 – Amostras selecionadas a partir dos delineamentos completos III e IV para a execução das análises de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, análises cromatográficas, eletroforese e microscopia eletrônica de varredura.

Experimento/ Ensaio	Conc. Proteína (%)	Conc. Pectina (g/g de IPS)	Conc. k- carragena (g/g de IPS)	pH	Nível de Pressão (MPa)
Experimento III					
5	1	0,1	-	3,00	600
8	1	0,3	-	4,00	600
14	1	0,2	-	3,50	702
Experimento IV					
3	1	-	0,100	6,50	300
7	1	-	0,100	6,50	600
9	1	-	0,032	6,00	450

2.2.4.1. Solubilidade proteica em água

A porcentagem de solubilidade proteica em água foi determinada segundo o proposto por Morr et al. (1985) com modificações. A concentração de proteína foi padronizada e fixada em 0,01g de IPS/mL de água e a proteína solúvel dosada segundo o método BCA (“Bicinchoninic acid protein assay”) proposto por Owusu-Apenten (2002), utilizando para isto o kit da Sigma® (BCA-1 e B9643) com o protocolo de 2,1 mL. A quantidade de proteína solúvel foi calculada através das curvas de calibração levantadas (Anexo B) que determinam a quantidade de proteína presente na amostra analisada e da relação entre a quantidade de proteína adicionada e presente na amostra.

2.2.4.2. Índice de Atividade Emulsificante

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi determinado pelo método espectrofotométrico de Pearce e Kinsella (1978), acrescido de informações extraídas de Hill (1996) e Molina, Papadopoulou e Ledward (2001), com modificações. A concentração de proteína na amostra analisada foi padronizada e fixada em 0,005g de IPS/mL de água desionizada. As emulsões foram formadas pela adição de 10 mL da solução proteica e 30 mL de óleo de milho (marca Asda®, Reino Unido). Esta mistura foi agitada em homogeneizador Turrax® a 10.000 rpm por 30 segundos. A absorbância da solução de emulsão diluída (1:500) e do branco (solução de SDS 0,1%) foram imediatamente determinadas pela leitura em espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20, controlado pelo “software” Winlab, a 500nm. A solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi preparada com SDS com grau de pureza de 99,5%, marca Sigma®, sendo esta solução mantida sob temperatura ambiente. A turbidez da amostra (T), a fração de volume de óleo e o IAE foram determinados conforme as equações mencionadas por Hill (1996) e Molina, Papadopoulou e Ledward (2001).

2.2.4.3. Análises reológicas

Os módulos de armazenagem ou elástico (G') e de perda ou viscoso (G'') foram determinados em reômetro visco-elástico de tensão controlada RTI (Rheo Tech International Ltd., Reino Unido), com placas paralelas de 50 mm de diâmetro, distância entre as placas de 1mm, freqüência mínima de 0,1 Hz e máxima de 10 Hz (leituras: 0,1, 0,25, 0,625, 1,667, 3,333 e 10,0), tempo para estado estacionário de 0,5 min e amplitude do torque de 0,050 mNm. A temperatura da amostra foi mantida à $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, através de banho de circulação de água com temperatura controlada, acoplado ao reômetro. As leituras de freqüência das amostras foram repetidas seis vezes e as médias dos resultados foram utilizados para o cálculo matemático do módulo complexo (G^*). Como os gráficos das leituras de G' e G'' versus freqüência mostraram a mesma tendência, foram tomados apenas os resultados para um valor de freqüência (1,667 Pa) e o cálculo de G^* foi realizado

para este valor. Como o valor de G'' se mostrou o mais relevante componente de G^* , o valor de G'' foi tomado como uma das respostas analisadas ao invés do valor de G^* .

2.2.4.4. Determinação do conteúdo de sulfidril livre

Os teores de sulfidril livre foram determinados no IPS e nas amostras selecionadas (Tabela 3.3), segundo o descrito por Beveridge, Toma e Nakai (1974) com as modificações propostas por Hardham (1981). As amostras foram analisadas em duplicata e as determinações realizadas em triplicata. Uma alíquota de 10 mg de amostra foi dissolvida em 10 mL de tampão TRIS-glicina (pH 8.00), contendo 8M de uréia. À dispersão foi adicionado 100 μ L do Reagente de Ellman (4 mg de ácido 2,2' dinitro-5,5'ditiodibenzoico – DTNB dissolvido em 1 mL de tampão TRIS-glicina). Decorridos 30 minutos, as dispersões foram filtradas em membrana Millipore® 0,45 μ m e foram tomadas alíquotas para a realização da leitura de absorbância em espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20, controlado pelo “software” Winlab, a 412 nm contra o branco (10 mL do tampão TRIS-glicina (8M de uréia) e 100 μ L do Reagente de Ellman). Para a determinação da quantidade de sulfidril livre nas amostras analisadas, utilizou-se a seguinte relação (Equação 3.1):

$$\mu\text{moles/g amostra} = \frac{735,3 \times \text{Abs (412 nm)}}{\text{Peso amostra(mg)}} \quad \text{Equação 3.1}$$

2.2.4.5. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)

Os termogramas foram obtidos, conforme o descrito por Molina, Defaye e Ledward (2002), utilizando um analisador Perkin Elmer DSC-7 calibrado com indium (faixa de 130 a 170°C) e zinco (faixa de 400-450 °C). As amostras selecionadas (Tabela 3.3), nas suas concentrações próprias foram precisamente pesadas (20-25 mg) e colocadas diretamente em cápsulas de alumínio hermeticamente seladas. As amostras foram aquecidas de 30 a 100°C na velocidade de 5°C/minuto, utilizando uma cápsula vazia como referência. As leituras de entalpia (ΔH) e da temperatura de desnaturação (T_d) foram obtidas em triplicatas diretamente no analisador

utilizado, através do “software” interno do equipamento (“7 Series Thermal Analysis System”, 1972).

2.2.4.6. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

O perfil cromatográfico foi determinado apenas para as amostras selecionadas (Tabela 3.3), utilizando-se a técnica de CLAE-FR, de acordo com Bietz (1983), utilizando-se solução aquosa de 15% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) como solvente A e 80% de acetonitrila e 0,1% de TFA como solvente B. Estes solventes foram previamente filtrados em membrana (47mm, 0,20 µm de nylon, Whatman, Maidstone, Reino Unido) e purgados com gás Hélio antes de serem bombeados.

Primeiramente, as amostras foram padronizadas para a concentração de 0,1 mg de proteína/mL com água desionizada, sendo a seguir filtradas em filtro de 0,2 micron (Minisart high flow hydrophilic filter, Sartorius, Honover, Alemanha) e injetados 100µL em coluna C-18 (Modelo Ace 5 C18-300, com 150mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, 300Å de tamanho de partícula, Advanced Chromatography Technologies, Escócia). Os solventes foram alimentados utilizando bomba HPLC (Spectra Physics SP800) em cromatógrafo HP com integrador (Modelo HP 3396A) e detector UV (Spectroflow 757, ABI Analytical Division). As condições da corrida obedeceram a um gradiente linear de 0 a 100% do solvente B por 50 minutos. O fluxo foi de 0,5 mL/min, com detecção a 210 nm. Após cada análise, a coluna foi retornada às condições iniciais através de um gradiente linear (100% a 0% do solvente B) por 10 minutos.

2.2.4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A determinação do perfil eletroforético das proteínas totais foi conduzida em gel de poliacrilamida adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) denominado como SDS-PAGE e sem a adição SDS denominado Native PAGE, segundo o descrito por Laemmli (1970). A concentração total do monômero (%T) no gel de empacotamento foi de 4,5% e do gel de separação de 10%, sendo a concentração

do “crosslinking” (%C) nos dois casos de 2,67%. As amostras selecionadas foram padronizadas para a concentração de 0,1% de proteína em água desionizada e diluídas na proporção 1:1 com tampão Tris-HCl (1,5 g Tris, 2mg azul de bromofenol, 10mL glicerol em 100mL de solução, sendo o pH ajustado para 6,8 com 5M HCl). As amostras diluídas foram imersas em água em ebulição por 3 minutos sendo a seguir resfriadas (somente para SDS PAGE). Alíquotas de 15µL de cada amostra foram aplicadas ao gel.

A eletroforese foi conduzida em tampão (0,025M Tris, 0,192M glicina, 0,1% SDS, pH 8.6-8.7) a 500V, 50mA até que as bandas azuis começassem a surgir no início do gel (aproximadamente 60 minutos). A coloração dos géis foi realizada, conforme o descrito por Puppo et al. (2004), utilizando como solução 0,05% de Comassie Brilhante G-250, 25% de etanol e 10% de ácido acético. Os géis foram descorados em solução aquosa contendo 7% de ácido acético e 40% de etanol. Foram utilizados marcadores de pesos moleculares comerciais na faixa de 6.500 a 205.000 Da da Sigma®. As imagens dos géis foram obtidas em equipamento Gene Genius, Snyoptics, Cambridge, Reino Unido, sendo manipuladas digitalmente utilizando o software Adobe® Photoshop.

2.2.4.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a observação através da MEV, as amostras selecionadas (Tabela 3.3) foram separadas em duas porções distintas, uma antes do tratamento sob pressão e outra após o tratamento sob pressão. Estas amostras foram preparadas e liofilizadas e trituradas para observação através da MEV. As amostras foram espalhadas sobre “stubs” de alumínio preparados com adesivo de carbono e revestidas com pó de ouro sob vácuo. A observação foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura submetido a alto vácuo, Cambridge Stereoscan S360, Reino Unido, equipado com sistema de dispersão de raios X, Oxford INCA, Oxford Instruments, Reino Unido e Inca software para a visualização das imagens.

3. Resultados e Discussão

3.1. Ensaio experimentais

3.1.1. Delineamentos Fracionários

Os Experimentos Fracionários I e II foram realizados a fim de avaliar os efeitos da variáveis estudadas (concentração de IPS, concentração de polissacarídeos – pectina ou κ -carragena, pH e nível de pressão) sobre as respostas obtidas (solubilidade proteica, IAE e G’). Os resultados para solubilidade proteica, IAE e G’ obtidos no Experimento I estão apresentados na Tabela 3.4. Todos os efeitos das variáveis estudadas (concentração de proteína, pH, concentração de pectina e nível de pressão aplicada) foram significativos ao nível de 5%, quando analisados pelo Erro Puro, para a resposta solubilidade proteica (Tabela 3.5). O maior efeito observado para a resposta solubilidade proteica foi o do pH, sendo este um efeito negativo, isto é, para a faixa de pH estudada a medida que se aumentou o valor de pH diminuiu-se a solubilidade proteica. Este resultado foi de acordo com esperado devido ao conhecido fenômeno de agregação proteica que ocorre próximo ao ponto isoelétrico (pH 4,2 a 4,6), sendo que a solubilidade proteica aumenta em valores de pH abaixo ou acima do pI (HETTIARACHCHY; KALAPATHY, 1999).

TABELA 3.4 - Resultados do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹).

Ensaio	Conc. de proteína (%)	pH	Conc. de pectina (g/g de proteína)	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	G'' (Pa) ¹	Aspecto visual da amostra ²
1	-1 (1,00)	-1 (3,00)	-1 (0,1)	-1 (300)	36,97	353,40	8,975	Opaca, pequenos precipitados, bege.
2	+1 (3,00)	-1 (3,00)	-1 (0,1)	+1 (600)	31,90	136,29	8,667	Opaca, pequenos precipitados, bege.
3	-1 (1,00)	+1 (4,00)	-1 (0,1)	+1 (600)	3,40	81,40	9,829	Opaca, pequenos precipitados, branca.
4	+1 (3,00)	+1 (4,00)	-1 (0,1)	-1 (300)	3,18	356,85	9,620	Opaca, pequenos precipitados, branca.
5	-1 (1,00)	-1 (3,00)	+1 (0,3)	+1 (600)	40,73	59,72	9,211	Opaca, pequenos precipitados, bege.
6	+1 (3,00)	-1 (3,00)	+1 (0,3)	-1 (300)	24,58	271,67	9,175	Opaca, pequenos precipitados, bege.
7	-1 (1,00)	+1 (4,00)	+1 (0,3)	-1 (300)	0,60	114,80	10,684	Opaca, pequenos precipitados, branca.
8	+1 (3,00)	+1 (4,00)	+1 (0,3)	+1 (600)	0,20	84,72	9,756	Opaca, pequenos precipitados, bege.
9	0 (2,00)	0 (3,50)	0 (0,2)	0 (450)	5,09	120,73	9,818	Opaca, pequenos precipitados, branca.
10	0 (2,00)	0 (3,50)	0 (0,2)	0 (450)	4,24	171,48	9,625	Opaca, pequenos precipitados, branca.
11	0 (2,00)	0 (3,50)	0 (0,2)	0 (450)	5,38	181,68	9,833	Opaca, pequenos precipitados, branca.

¹ Valores expressos em média das determinações;

² após tratamento sob alta pressão.

TABELA 3.5 – Efeitos principais do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹) para a resposta solubilidade proteica.

Variável	Efeito	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
Média	14,21*	0,1786	79,5253	0,000158	13,4377	14,9750
Concentração de proteína	-5,46*	0,4190	-13,0327	0,005836	-7,2626	-3,6574
pH	-31,70*	0,4190	-75,6659	0,000175	-33,5026	-29,8974
Concentração de pectina	-2,34*	0,4190	-5,5735	0,030716	-4,1376	-0,5324
Pressão	2,72*	0,4190	6,5044	0,022830	0,9224	4,5276

Onde: *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Os dados da Tabela 3.6, mostraram que somente a média e o nível de pressão apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) quando se levou em consideração apenas a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE). Quando se considerou apenas a resposta G' todos os efeitos das variáveis foram significativos ($p < 0,05$) com exceção da pressão aplicada (Tabela 3.7). Como todas as variáveis influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a resposta solubilidade proteica, apenas a variável pressão influenciou a resposta IAE e no caso do G' as variáveis significativas ($p < 0,05$) foram concentração de proteína, concentração de pectina e pH e tendo como objetivo estudar a interação proteína-pectina, tomou-se a decisão de fixar a concentração de proteína em 1% para a realização do delineamento completo (Experimento III). Tomando-se assim, somente três variáveis (concentração de pectina, pH e nível de pressão) o número de ensaios com confiabilidade nos resultados foi reduzido e foi permitido a realização do estudo da interação proteína-pectina, influência do pH e nível de pressão aplicado.

TABELA 3.6 – Efeitos principais do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).

Variável	Efeito	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
Média	175,71*	9,8427	17,8514	0,003123	133,3560	218,0547
Concentração de proteína	60,05	23,0831	2,6016	0,121422	-39,2670	159,3702
pH	-45,83	23,0831	-1,9853	0,185525	-145,1440	53,4926
Concentração de pectina	-99,26	23,0831	-4,3001	0,050054	-198,5790	0,0579
Pressão	-183,65*	23,0831	-7,9559	0,015434	-282,9640	-84,3275

Onde: *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 3.7 – Efeitos principais do Experimento I (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta G'' .

Variável	Efeito	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	9,56*	0,0350	273,1706	0,000013	9,4124	9,7136
Concentração de proteína	-0,37*	0,0821	-4,5025	0,045955	-0,7229	-0,0164
pH	0,97*	0,0821	11,7560	0,007158	0,6119	1,3184
Concentração de pectina	0,43*	0,0821	5,2812	0,034034	0,0803	0,7868
Pressão	-0,25	0,0821	-3,0195	0,094406	-0,6011	0,1053

Onde: *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos no Experimento Fracionário II para as respostas estudadas (solubilidade proteica, IAE e G'') foram apresentados na Tabela 3.8. Para a resposta solubilidade proteica todos os efeitos foram significativos ao nível de 5% (Tabela 3.9). No Experimento II, o maior efeito observado para a resposta solubilidade proteica foi o do pH, sendo este um efeito positivo, isto é, para a faixa de pH estudada a medida que se aumentou o valor de pH aumentou-se também a solubilidade proteica. Este resultado foi de acordo com os dados coletados no Experimento I.

TABELA 3.8 - Resultados do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}).

Ensaio	Conc. de proteína (%)	pH	Conc. de κ -carragena (g/g proteína)	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	G'' (Pa) ¹	Aspecto visual da amostra ²
1	-1 (1,00)	-1 (5,50)	-1 (0,1)	-1 (300)	15,54	46,10	9,803	Homogênea, opaca, esbranquiçada.
2	+1 (3,00)	-1 (5,50)	-1 (0,1)	+1 (600)	6,49	78,20	9,048	Homogênea, opaca, espessa e bege.
3	-1 (1,00)	+1 (6,50)	-1 (0,1)	+1 (600)	62,62	41,12	10,467	Homogênea, bege, translúcida.
4	+1 (3,00)	+1 (6,50)	-1 (0,1)	-1 (300)	61,60	38,34	11,360	Homogênea, opaca, bege.
5	-1 (1,00)	-1 (5,50)	+1 (0,3)	+1 (600)	8,19	138,08	8,721	Partículas internas, opaca, bege.
6	+1 (3,00)	-1 (5,50)	+1 (0,3)	-1 (300)	8,18	162,62	9,439	Homogênea, opaca, bege, com espuma.
7	-1 (1,00)	+1 (6,50)	+1 (0,3)	-1 (300)	78,27	66,78	9,781	Homogênea, límpida, bege, com espuma.
8	+1 (3,00)	+1 (6,50)	+1 (0,3)	+1 (600)	15,04	86,54	9,512	Homogênea, opaca, bege, espessa.
9	0 (2,00)	0 (6,00)	0 (0,2)	0 (450)	31,20	67,44	9,350	Homogênea, opaca, bege, com espuma.
10	0 (2,00)	0 (6,00)	0 (0,2)	0 (450)	33,94	74,24	9,326	Homogênea, opaca, bege, com espuma.
11	0 (2,00)	0 (6,00)	0 (0,2)	0 (450)	34,63	63,19	9,511	Homogênea, opaca, bege, com espuma.

¹ Valores expressos em média das determinações;² após tratamento sob alta pressão.

TABELA 3.9 – Efeitos principais do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta solubilidade proteica.

Variável	Efeito	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	32,34*	0,5470	59,1146	0,000286	29,9828	34,6900
Concentração de proteína	-18,33*	1,2829	-14,2865	0,004864	-23,8472	-12,8078
pH	44,78*	1,2829	34,9085	0,000820	39,2628	50,3022
Concentração de κ -carragena	-9,14*	1,2829	-7,1267	0,019126	-14,6622	-3,6228
Pressão	-17,81*	1,2829	-13,8850	0,005147	-23,3322	-12,2928

Onde: *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Os dados da Tabela 3.10, mostraram que a média, concentração de proteína, pH e concentração de κ -carragena apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) quando se levou em consideração apenas a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE). Quando se considerou apenas a resposta G'' os efeitos das variáveis significativas ($p < 0,05$) foram a média, pH, concentração de κ -carragena e nível de pressão aplicado (Tabela 3.11). A partir destes resultados e tendo como objetivo estudar a interação proteína-carragena, tomou-se a decisão de fixar a concentração de proteína em 1% para a realização do delineamento completo (Experimento IV), como a adotada a partir dos resultados do Experimento III. Assim, o Experimento IV foi delineado com três variáveis: concentração de κ -carragena, pH e nível de pressão.

TABELA 3.10 – Efeitos principais do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta Índice de Atividade Emulsificante.

Variável	Efeito	Desvio Padrão (Erro Puro)	t(2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	78,42*	1,6814	46,6414	0,000459	71,1893	85,6585
Concentração de proteína	18,41*	3,9433	4,6674	0,042967	1,4384	35,3716
pH	-48,05*	3,9433	-12,1860	0,006667	-65,0194	-31,0862
Concentração de κ -carragena	62,57*	3,9433	15,8666	0,003949	45,6001	79,5334
Pressão	7,53	3,9433	1,9093	0,196430	-9,4378	24,4954

Onde: *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 3.11 – Efeitos principais do Experimento II (Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}) para a resposta G”.

Variável	Efeito	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	9,66*	0,0303	318,6494	0,000010	9,5348	9,7958
Concentração de proteína	0,15	0,0711	2,0630	0,175196	-0,1593	0,4528
pH	1,03*	0,0711	14,4409	0,004761	0,7212	1,3333
Concentração de κ -carragena	-0,81*	0,0711	-11,3341	0,007695	-1,1123	-0,5002
Pressão	-0,66*	0,0711	-9,2606	0,011461	-0,9648	-0,3527

Onde: *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

3.1.2. Delineamentos Completos

3.1.2.1. Experimento III

Os resultados obtidos para as respostas solubilidade proteica, IAE e G” no Experimento III foram expostos na Tabela 3.12. A Figura 3.1 mostrou a influência das variáveis estudadas (concentração de pectina, pH e pressão aplicada) sobre a

resposta solubilidade proteica para o Experimento III, tendo-se fixado a concentração de IPS em 1%. Observou-se pela Figura 3.1 (a e b) que somente nos valores baixos de pH e de concentração de pectina, atingiu-se os maiores valores de solubilidade proteica. A pressão aplicada teve pequeno efeito sobre os valores de solubilidade proteica (Figura 3.1 c, d). Estes resultados foram de acordo com o observado no Experimento I (Capítulo 2) que estudou a mesma faixa de pH e também em relação a influência da variável pressão com o relatado por Apichartsrangkoon (2003). O maior valor de solubilidade proteica observado foi 56,99% (Tabela 3.12) que é cerca de 15% maior do que o observado para o IPS original (49,32%).

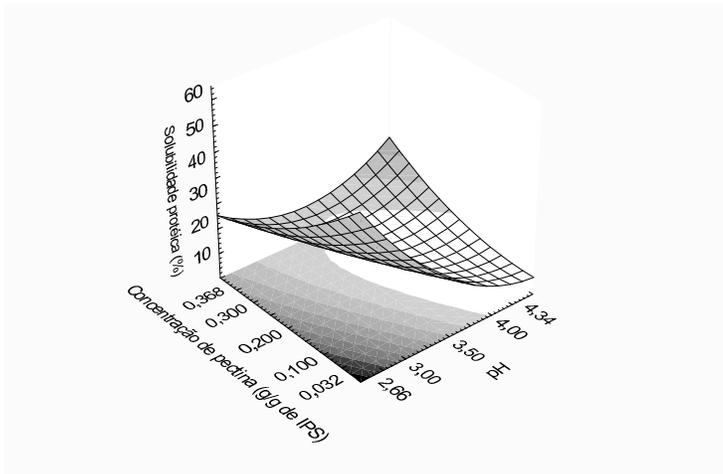
As Tabelas 3.13 e 3.14 mostram respectivamente os coeficientes de regressão linear e a Análise de Variância (ANOVA) para a resposta solubilidade proteica no Experimento III em função das variáveis estudadas (concentração de pectina, pH e pressão aplicada). Pelo exposto na Tabela 3.13, o termo pressão linear e o termo de interação (pH)x(pressão) não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), sendo estes termos incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 3.14). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (5,56) foi significativo ($p < 0,05$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (42,19) não foi significativo ($p > 0,01$) e, sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 81%), pode-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,13%).

TABELA 3.12 - Resultados do Experimento III (Delineamento Composto Central).

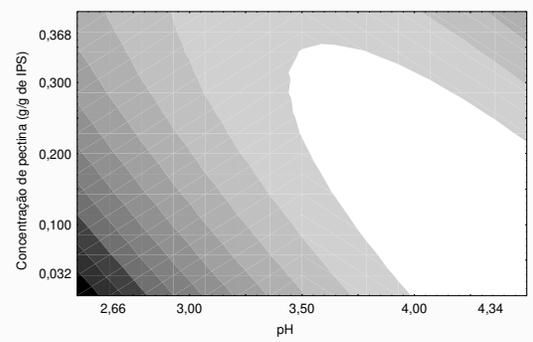
Ensaio	Conc. de pectina (g/g de IPS)	pH	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	G'' (Pa) ¹	Aspecto visual da amostra ²
1	-1 (0,1)	-1 (3,00)	-1 (300)	36,49	89,48	9,761	Opaca, pequenos precipitados, bege.
2	+1 (0,3)	-1 (3,00)	-1 (300)	33,80	72,29	9,554	Opaca, pequenos precipitados, bege.
3	-1 (0,1)	+1 (4,00)	-1 (300)	4,38	375,72	9,477	Opaca, pequenos precipitados, branca.
4	+1 (0,3)	+1 (4,00)	-1 (300)	4,12	82,62	8,900	Opaca, pequenos precipitados, branca.
5	-1 (0,1)	-1 (3,00)	+1 (600)	56,99	140,90	9,047	Opaca, pequenos precipitados, bege.
6	+1 (0,3)	-1 (3,00)	+1 (600)	15,85	105,15	9,696	Opaca, pequenos precipitados, bege.
7	-1 (0,1)	+1 (4,00)	+1 (600)	2,15	379,14	11,662	Opaca, pequenos precipitados, branca.
8	+1 (0,3)	+1 (4,00)	+1 (600)	4,04	364,49	13,596	Opaca, pequenos precipitados, branca.
9	-1,68 (0,032)	0 (3,50)	0 (450)	9,46	392,21	8,487	Opaca, pequenos precipitados, bege.
10	+1,68 (0,368)	0 (3,50)	0 (450)	3,62	74,19	12,751	Opaca, pequenos precipitados, branca.
11	0 (0,2)	-1,68 (2,66)	0 (450)	31,16	172,27	10,539	Leve translucidez, pequenos precipitados.
12	0 (0,2)	+1,68 (4,34)	0 (450)	1,74	89,83	11,143	Opaca, pequenos precipitados, branca.
13	0 (0,2)	0 (3,50)	-1,68 (198)	6,42	833,72	9,350	Opaca, pequenos precipitados, bege
14	0 (0,2)	0 (3,50)	+1,68 (702)	5,12	1.056,67	10,692	Opaca, pequenos precipitados, bege
15	0 (0,2)	0 (3,50)	0 (450)	5,28	439,56	7,494	Opaca, pequenos precipitados, bege
16	0 (0,2)	0 (3,50)	0 (450)	4,69	375,15	7,244	Opaca, pequenos precipitados, bege
17	0 (0,2)	0 (3,50)	0 (450)	4,88	402,36	6,996	Opaca, pequenos precipitados, bege

¹ Valores expressos em média das determinações;

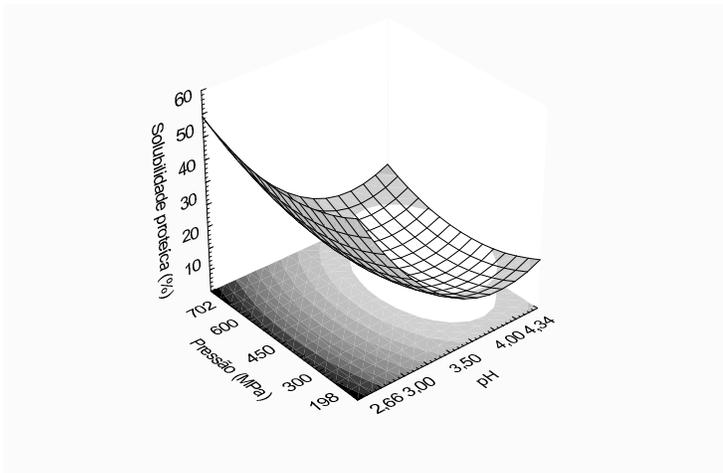
² após tratamento sob alta pressão.



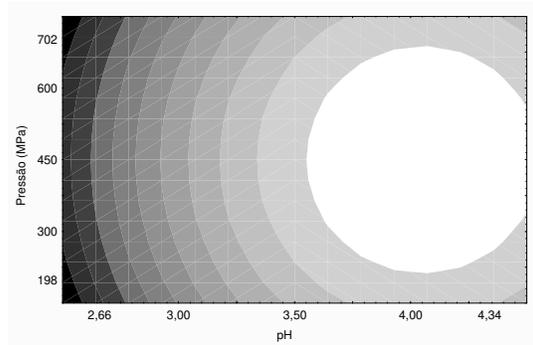
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 3.1 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a solubilidade proteica em função das variáveis pH e concentração de pectina (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento III.

TABELA 3.13 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento III) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média	5,05*	1,0112	4,9941	0,037834	0,6991	9,4006
Concentração Pectina (L)	-4,79*	0,4749	-10,0897	0,009681	-6,8343	-2,7480
Concentração Pectina (Q)	2,84*	0,5226	5,4247	0,032342	0,5865	5,0840
pH (L)	-14,01*	0,4749	-29,5032	0,001147	-16,0528	-11,9666
pH (Q)	6,34*	0,5226	12,1285	0,006729	4,0902	8,5877
Pressão (L)	-1,12	0,4749	-2,3680	0,141458	-3,1676	0,9187
Pressão (Q)	2,56*	0,5226	4,9039	0,039158	0,3142	4,8117
1L x 2L	7,36*	0,6204	11,8608	0,007034	4,6893	10,0282
1L x 3L	-2,86*	0,6204	-4,6118	0,043943	-5,5307	-0,1918
2L x 3L	1,07	0,6204	1,7226	0,227101	-1,6007	3,7382

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de pectina; 2= pH; 3= pressão aplicada. *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 3.14 – Análise de variância (ANOVA) do Experimento III do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	7	3959,97	565,71	5,56	3,29*
Resíduo	9	915,81	101,76		
Fator de ajuste	7	909,65	129,95	42,19	99,36**
Erro Puro	2	6,16	3,08		
Total	16	4875,78			

% variação explicada (R^2) = 81,22%. *F_(7, 9; 0,05) e **F_(7, 2; 0,01)

A equação codificada (Equação 3.2) que expressou a solubilidade proteica em função das variáveis estudadas para o Experimento III foi :

$$\begin{aligned} \text{Solubilidade proteica} = & 5,05 - 4,79(\text{concentração de pectina}) - 14,01(\text{pH}) \\ & + 2,84(\text{concentração de pectina})^2 + 6,34(\text{pH})^2 \\ & + 2,56(\text{pressão})^2 + 7,36(\text{concentração de pectina})(\text{pH}) \\ & - 2,86(\text{concentração de pectina})(\text{pressão}) \end{aligned}$$

(Equação 3.2)

Observou-se que a incorporação de pectina ao sistema fez com que outras variáveis além do pH influenciassem a solubilidade proteica (Equação 3.2) ao contrário do ocorrido no Experimento I (Capítulo 2), onde apenas o pH teve fator decisivo sobre a resposta solubilidade proteica (Equação 2.5). A análise estatística revelou que o pH apresentou o maior efeito sobre a solubilidade proteica (Tabela 3.13), embora outras variáveis tenham sido significativas ao nível de 5%. O pH teve um efeito negativo sobre a solubilidade proteica, isto é, à medida em que se aumentou o pH diminuiu-se a solubilidade proteica em presença de pectina, o que acompanhou a tendência verificada anteriormente para esta mesma faixa de pH, quando se utilizou apenas proteína de soja (Experimento I do Capítulo 2). Observou-se também que a concentração de pectina teve efeito negativo sobre a resposta solubilidade proteica, isto é, a medida que aumentou-se a concentração de pectina menor foi a solubilidade da proteína de soja.

A influência das variáveis estudadas (concentração de pectina, pH e pressão aplicada) sobre a resposta IAE foi mostrada na Figura 3.2. Os maiores valores de IAE foram encontrados para os valores médios de pH e concentração de pectina (Figuras 3.2a e 3.2b). O IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos sob pressão nos pontos extremos (mais baixos ou nos mais altos), conforme pôde ser notado nas Figuras 3.2c e 3.2d. No caso do Experimento I do Capítulo 2, o qual estava na mesma faixa de pH, apenas foi notado o aumento de IAE para os valores mais altos de pressão. A Tabela 3.15 exibiu os coeficientes de regressão para a resposta IAE obtida no Experimento III. Neste Experimento, os termos de

interação não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) para a resposta IAE, sendo incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 3.16). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (5,80) foi significativo ($p < 0,05$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (32,53) não foi significativo ($p > 0,01$) e sendo razoável a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 77%), pôde-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,17%). A equação codificada (Equação 3.3) que expressou o IAE em função das variáveis estudadas para o Experimento III foi :

$$\text{IAE} = 420,97 - 65,57(\text{concentração de pectina}) + 48,00(\text{pH}) + 54,52(\text{pressão}) \\ - 113,63(\text{concentração de pectina})^2 - 149,74(\text{pH})^2 + 138,10 (\text{pressão})^2 \\ \text{(Equação 3.3)}$$

Os valores de IAE obtidos no Experimento III foram bem superiores aos obtidos no Experimento I do Capítulo 2, que estava na mesma faixa de pH, o que revelou um efeito positivo da adição de pectina, aumentando a área de interface. O maior valor de IAE (cerca de $1.057 \text{ m}^2/\text{g}$) obtido pelo ensaio 14 (Tabela 3.12), no qual foi utilizada pressão de 702 MPa e $\text{pH}=3,50$, mostrou-se mais de dez vezes superior ao do IPS original (cerca de $97 \text{ m}^2/\text{g}$). Adicionalmente, observou-se (Tabela 3.15) um efeito negativo da adição de pectina para a resposta IAE. Este fato pôde ser visualizado na Figura 3.2 a, b, onde nos valores mais baixos de concentração de pectina foram obtidos os maiores valores de IAE.

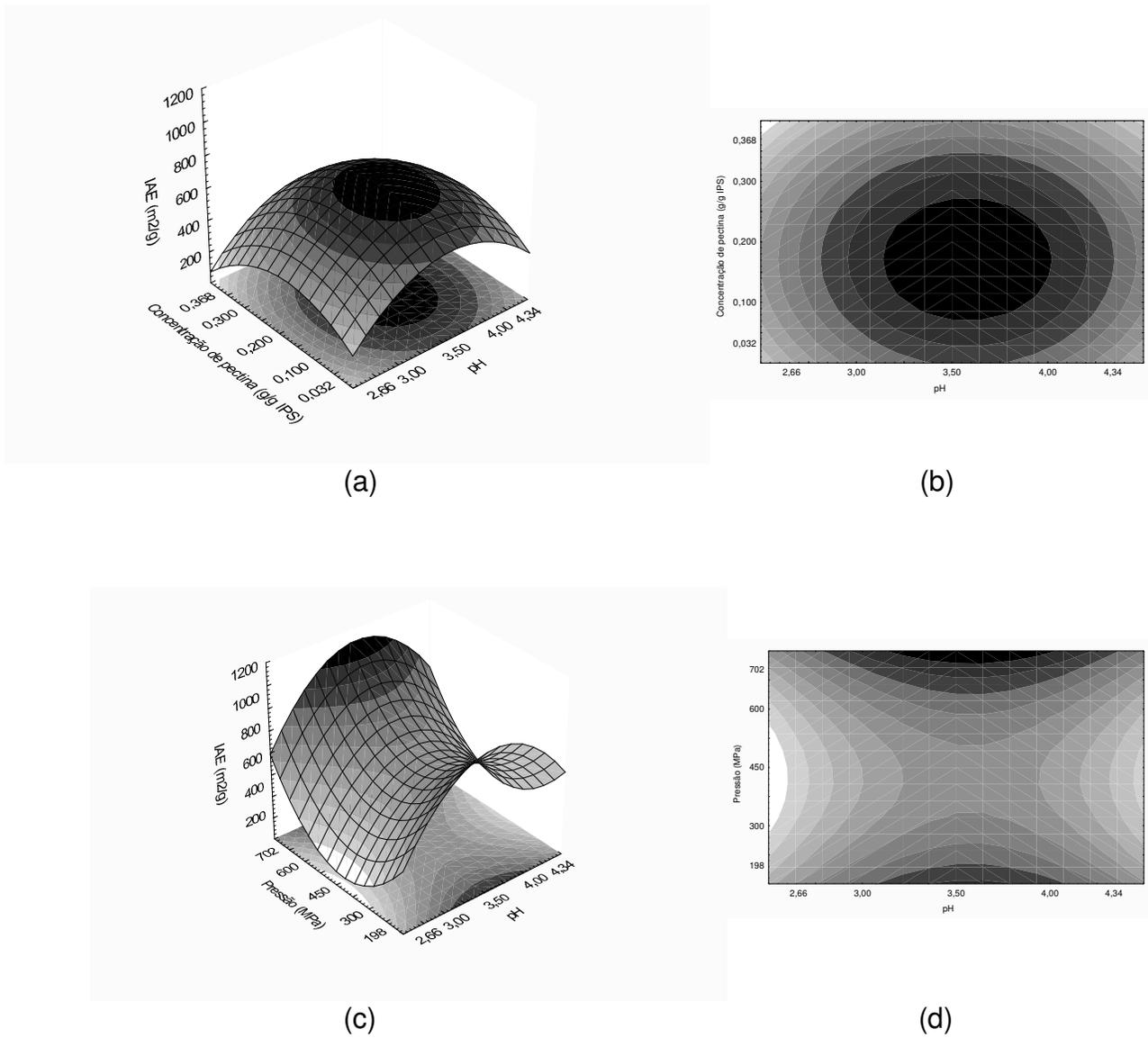


FIGURA 3.2 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta IAE em função das variáveis pH e concentração de pectina (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento III.

TABELA 3.15 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento III) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	420,97*	18,6312	22,5950	0,001953	340,8075	501,1347
Concentração Pectina (L)	-65,57*	8,7494	-7,4947	0,017341	-103,2200	-27,9288
Concentração Pectina (Q)	-113,63*	9,6300	-	0,007106	-155,0620	-72,1932
pH (L)	48,00*	8,7494	5,4860	0,031659	10,3526	85,6435
pH (Q)	-149,74*	9,6300	-	0,004110	-191,1770	-
Pressão (L)	54,52*	8,7494	6,2309	0,024803	16,8706	92,1616
Pressão (Q)	138,10*	9,6300	14,3407	0,004827	96,6661	179,5348
1L x 2L	-31,85	11,4316	-2,7862	0,108294	-81,0365	17,3359
1L x 3L	32,49	11,4316	2,8420	0,104722	-16,6982	81,6742
2L x 3L	25,13	11,4316	2,1980	0,159033	-24,0596	74,3128

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de pectina; 2= pH; 3= pressão aplicada; *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 3.16 – Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento III.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	6	954643,7	159107,30	5,80	3,22*
Resíduo	10	274164,3	27416,40		
Fator de ajuste	8	272073,4	34009,18	32,53	99,37**
Erro Puro	2	2090,9	1045,45		
Total	16	1228808,0			

% variação explicada (R^2) = 77,69%. *F_(6, 10; 0,05) e **F_(8, 2; 0,01)

A Figura 3.3 exemplificou as mudanças ocorridas nos valores de G' e G'' em função da frequência aplicada nas amostras dos ensaios selecionados do Experimento III tratadas sob alta pressão. Todas as amostras exibiram o mesmo tipo de comportamento e os valores de G' e G'' para cada amostra foram próximos em cada frequência analisada. Como foi verificado o mesmo tipo de comportamento em todas as demais amostras analisadas (resultados não exibidos), tomou-se apenas os valores de frequência intermediária (1,667 Pa) para a realização dos cálculos de G'' para a comparação entre os ensaios nas análises estatísticas.

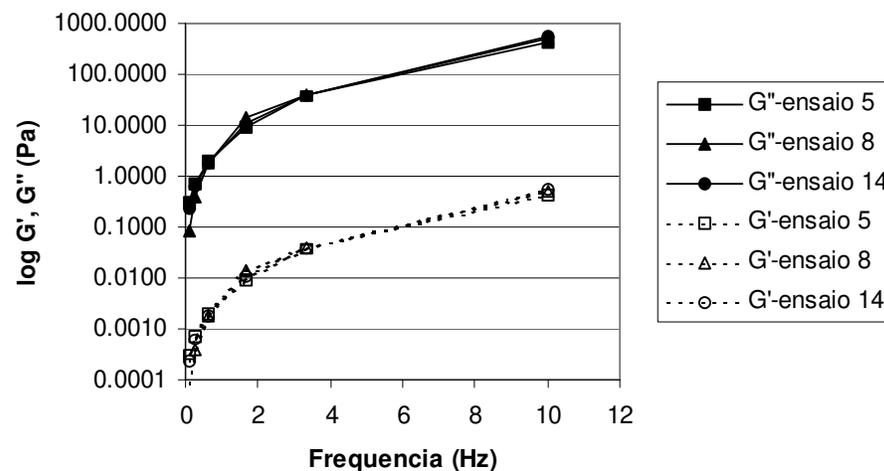


FIGURA 3.3 - Módulos G' (linhas tracejadas) e G'' (linhas cheias) em função da frequência para as amostras selecionadas do Experimento III com 1% de IPS, sendo : Ensaio 5 (0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00 e Pressão=600 MPa); Ensaio 8 (0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00 e Pressão=600 MPa); Ensaio 14 (0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50 e Pressão=702 MPa).

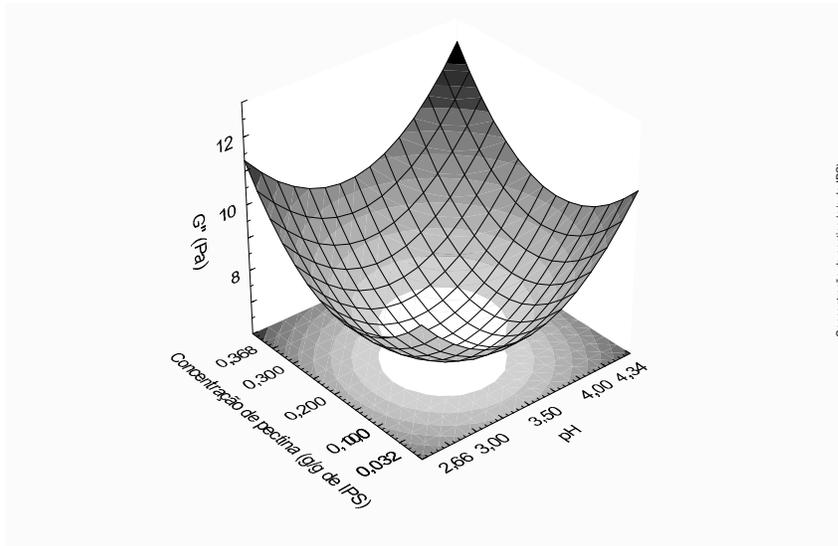
A Figura 3.4 mostrou a influência das variáveis estudadas (concentração de pectina, pH e pressão aplicada) sobre a resposta G'' para o Experimento III, tendo-se fixado a concentração de IPS em 1%. O aumento da concentração de pectina (Figura 3.4 a, b) e da pressão aplicada (Figura 3.4 c, d) favoreceram o aumento dos valores de G'' . Estes resultados foram de acordo com o observado no Experimento I (Capítulo 2) que estudou a mesma faixa de pH onde os valores de G'' aumentaram com o aumento da concentração do soluto (no caso do

Experimento I do Capítulo 2, aumento da concentração de IPS) e da pressão aplicada.

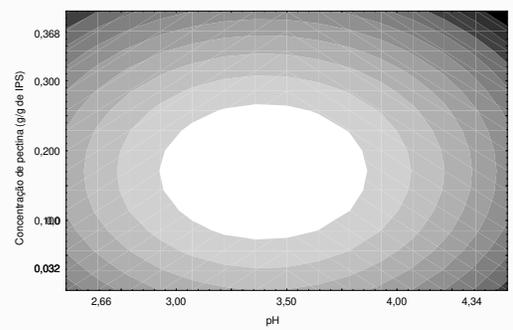
As Tabelas 3.17 e 3.18 mostraram respectivamente os coeficientes de regressão linear e a Análise de Variância (ANOVA) para a resposta G'' no Experimento III em função das variáveis estudadas (concentração de pectina, pH e pressão aplicada). Pelo exposto na Tabela 3.17, apenas o termo interativo (concentração de pectina)x(pH) não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$), sendo este termo incorporado aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 3.18). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (7,38) foi significativo ($p < 0,05$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (17,17) não foi significativo ($p > 0,05$) e sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 88%), foi possível concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,23%). A equação de segunda ordem codificada (Equação 3.4) que expressa G'' em função das variáveis estudadas para o Experimento III foi:

$$G'' = 7,28 + 0,66(\text{concentração de pectina}) + 0,48(\text{pH}) + 0,63 (\text{pressão}) \\ + 1,09(\text{concentração de pectina})^2 + 1,16(\text{pH})^2 + 0,88(\text{pressão})^2 \\ + 0,42(\text{concentração de pectina})(\text{pressão}) + 0,93(\text{pH})(\text{pressão}) \\ \text{(Equação 3.4)}$$

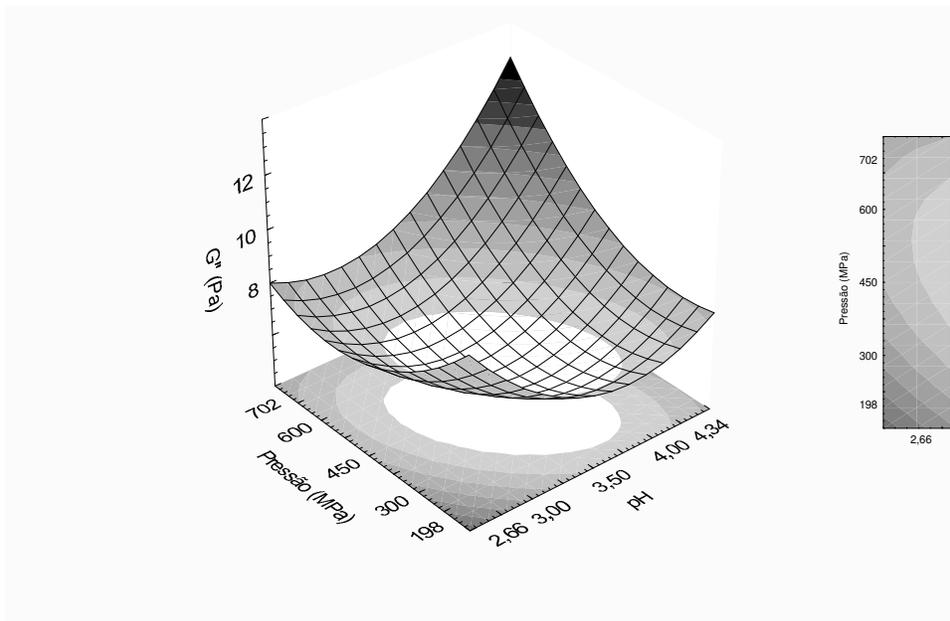
Embora os efeitos das variáveis sejam pequenos observou-se que a incorporação de pectina ao sistema fez com que todas as demais variáveis tivessem efeitos positivos ao aumento do G'' (Equação 3.4).



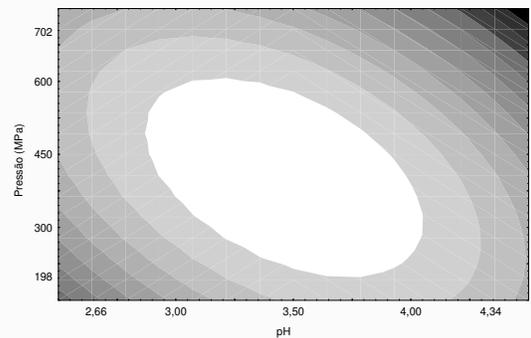
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 3.4 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta G'' em função das variáveis pH e concentração de pectina (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento III.

TABELA 3.17 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento III) calculados pelo erro puro para a resposta G''.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	7,28*	0,1435	50,7080	0,000389	6,6582	7,8929
Concentração Pectina (L)	0,66*	0,0674	9,7482	0,010360	0,3669	0,9467
Concentração Pectina (Q)	1,09*	0,0742	14,6525	0,004625	0,7676	1,4057
pH (L)	0,48*	0,0674	7,1646	0,018930	0,1928	0,7726
pH (Q)	1,17*	0,0742	15,7109	0,004027	0,8460	1,4842
Pressão (L)	0,63*	0,0674	9,3090	0,011344	0,3373	0,9171
Pressão (Q)	0,88*	0,0742	11,8016	0,007103	0,5561	1,1943
1L x 2L	0,11	0,0880	1,2992	0,323473	-0,2644	0,4932
1L x 3L	0,42*	0,0880	4,7808	0,041076	0,0421	0,7996
2L x 3L	0,93*	0,0880	10,5824	0,008812	0,5528	1,3104

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de pectina; 2= pH; 3= pressão aplicada; *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 3.18 – Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta G'' para o Experimento III.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	8	46,62	5,83	7,38	3,44*
Resíduo	8	6,30	0,79		
Fator de ajuste	6	6,17	1,03	17,17	19,33**
Erro Puro	2	0,12	0,06		
Total	16	52,92			

% variação explicada (R^2) = 88,10%. *F_(8, 8; 0,05) e **F_(6, 2; 0,05).

3.1.2.2. Experimento IV

Os resultados obtidos no Experimento IV para as respostas solubilidade proteica, IAE e G'' foram apresentados na Tabela 3.19. A Figura 3.5 mostrou a influência das variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada) sobre a resposta solubilidade proteica para o Experimento IV, tendo-se fixado a concentração de IPS em 1%. Observou-se, pela Figura 3.5 que a maior influência sobre os valores de solubilidade proteica foi exercida pela variável pH e a medida que este aumentou, cresceram também os valores de solubilidade. O aumento da concentração de κ -carragena (Figura 3.5 a, b) fez com que houvesse um ligeiro declínio nos valores de solubilidade proteica. A pressão aplicada (Figura 3.5 c, d) não afetou significativamente ($p>0,05$) os valores de solubilidade. Este resultado está de acordo com o observado no Experimento II do Capítulo 2 que estudou a mesma faixa de pH, no qual também o gráfico de pH versus pressão apresentou a mesma tendência aqui verificada. Este fato também foi observado por Apichartsrangkoon (2003). O maior valor de solubilidade proteica obtido foi 61,85% (Tabela 3.19) que foi cerca de 25% maior do que o observado para o IPS original (49,32% – Tabela 2.5), porém um pouco menor do que o maior valor alcançado no Experimento II do Capítulo 2 (65,03%), onde não havia a adição de κ -carragena.

As Tabelas 3.20 e 3.21 mostraram respectivamente os coeficientes de regressão linear e a Análise de Variância (ANOVA) para a resposta solubilidade proteica no Experimento IV em função das variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada). Pelo exposto na Tabela 3.20, apenas os termos lineares concentração de κ -carragena e pH e o termo quadrático do pH foram estatisticamente significativos ($p<0,05$). Os demais termos não significativos ($p>0,05$) foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 3.21). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (47,61) foi significativo ($p<0,05$) e valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (11,21) não foi significativo ($p>0,05$) e sendo a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo muito boa (cerca de 92%), foi possível concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos

dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,13%). A equação codificada (Equação 3.5) que expressou a solubilidade proteica em função das variáveis estudadas para o Experimento IV foi:

$$\text{Solubilidade proteica} = 38,64 - 3,69(\text{concentração de } \kappa\text{-carragena}) + 19,80(\text{pH}) - 3,54(\text{pH})^2 \quad (\text{Equação 3.5})$$

TABELA 3.19 - Resultados do Experimento IV (Delineamento Composto Central).

Ensaio	Concentração de κ -carragena (g/g de IPS)	pH	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	G'' (Pa) ¹	Aspecto visual da amostra ²
1	-1 (0,1)	-1 (5,50)	-1 (300)	10,05	43,78	8,941	Homogênea, opaca, bege.
2	+1 (0,3)	-1 (5,50)	-1 (300)	8,87	43,76	7,505	Pequenos precipitados, opaca, bege.
3	-1 (0,1)	+1 (6,50)	-1 (300)	56,99	70,52	10,925	Homogênea, translúcida, bege.
4	+1 (0,3)	+1 (6,50)	-1 (300)	52,60	53,64	10,313	Homogênea, translúcida, com espuma, bege.
5	-1 (0,1)	-1 (5,50)	+1 (600)	10,40	80,08	9,516	Pequenos precipitados, opaca, branca.
6	+1 (0,3)	-1 (5,50)	+1 (600)	8,05	62,40	8,562	Precipitados, opaca, bege.
7	-1 (0,1)	+1 (6,50)	+1 (600)	61,85	54,43	8,433	Homogênea, translúcida, bege.
8	+1 (0,3)	+1 (6,50)	+1 (600)	50,39	46,07	10,751	Homogênea, translúcida, bege.
9	-1,68 (0,032)	0 (6,00)	0 (450)	49,45	85,68	10,175	Pequenos precipitados, leve translucidez, branca.
10	+1,68 (0,368)	0 (6,00)	0 (450)	31,03	41,78	9,698	Precipitados, opaca, bege.
11	0 (0,2)	-1,68 (5,16)	0 (450)	6,92	47,45	8,150	Opaca, pequenos precipitados, bege.
12	0 (0,2)	+1,68 (6,84)	0 (450)	58,01	46,90	9,672	Homogênea, translúcida, com espuma, bege.
13	0 (0,2)	0 (6,00)	-1,68 (198)	42,62	42,75	9,448	Pequenos precipitados, leve translucidez, bege.
14	0 (0,2)	0 (6,00)	+1,68 (702)	49,86	71,87	8,560	Opaca, pequenos precipitados, bege.
15	0 (0,2)	0 (6,00)	0 (450)	35,65	56,51	8,948	Pequenos precipitados, leve translucidez, bege.
16	0 (0,2)	0 (6,00)	0 (450)	36,40	61,88	8,055	Pequenos precipitados, leve translucidez, bege.
17	0 (0,2)	0 (6,00)	0 (450)	39,49	61,51	7,422	Pequenos precipitados, leve translucidez, bege.

¹ Valores expressos em média das determinações;

² após processamento sob alta pressão.

A análise estatística revelou que o pH apresentou o maior efeito sobre a solubilidade proteica (Tabela 3.20) sendo este um efeito positivo, isto é, a medida em que se aumentou o pH, aumentaram também os valores de solubilidade proteica em presença de κ -carragena, o que acompanhou a tendência verificada anteriormente para esta mesma faixa de pH, quando se utilizou apenas proteína de soja (Experimento II, do Capítulo 2).

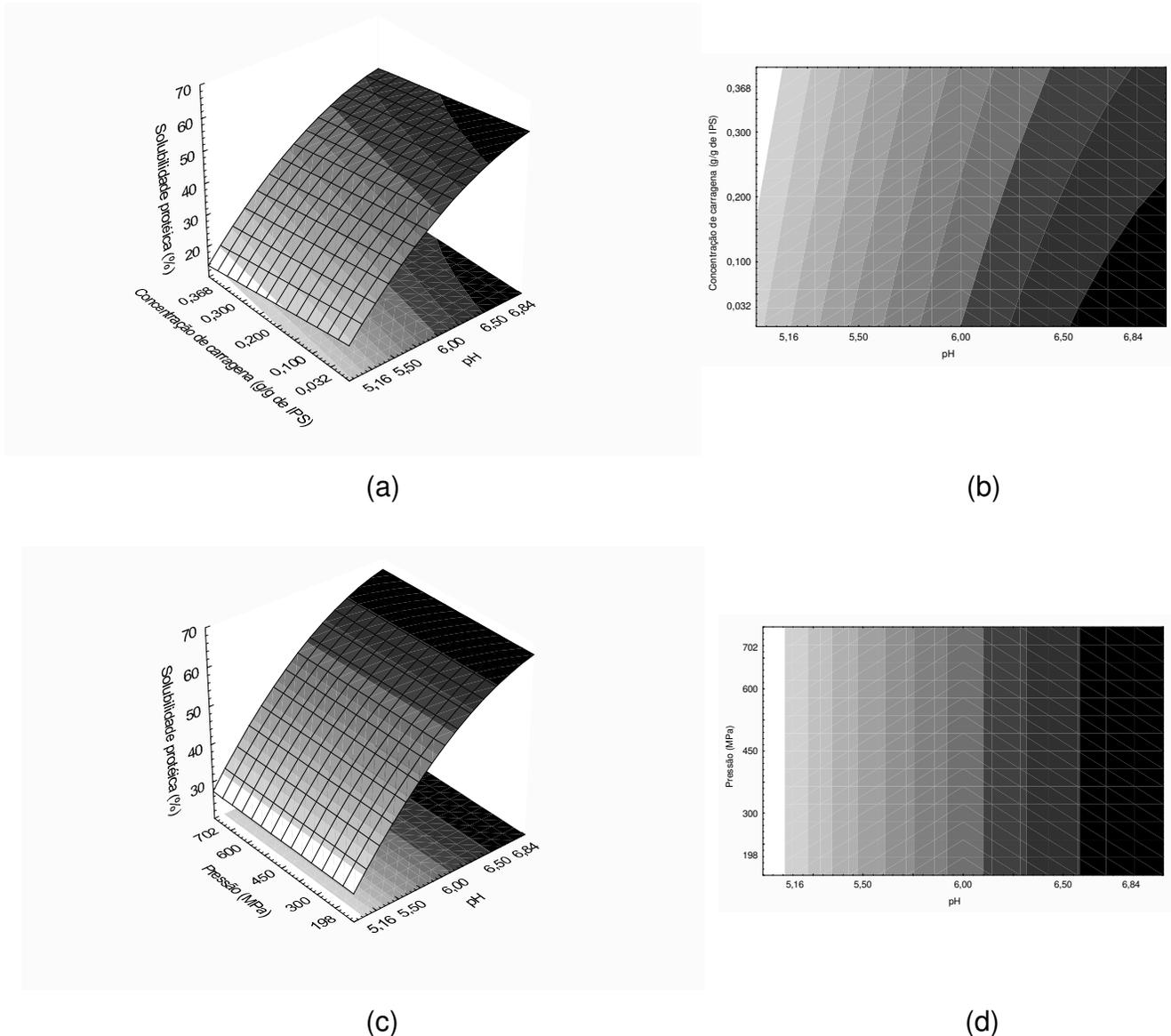


FIGURA 3.5 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta solubilidade proteica em função das variáveis pH e concentração de κ -carragena (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento IV.

TABELA 3.20 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento IV) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	37,66*	1,1728	32,1080	0,000969	32,6106	42,7030
Concentração κ -carragena (L)	-3,69*	0,5508	-6,6951	0,021589	-6,0572	-1,3177
Concentração κ -carragena (Q)	-0,56	0,6062	-0,9247	0,452753	-3,1688	2,0477
pH (L)	19,80*	0,5508	35,9469	0,000773	17,4286	22,1681
pH (Q)	-3,31*	0,6062	-5,4593	0,031953	-5,9177	-0,7012
Pressão (L)	1,05	0,5508	1,9086	0,196526	-1,3185	3,4210
Pressão (Q)	1,56	0,6062	2,5747	0,123514	-1,0475	4,1690
1L x 2L	-1,54	0,7196	-2,1400	0,165710	-4,6362	1,5563
1L x 3L	-1,03	0,7196	-1,4313	0,288652	-4,1262	2,0662
2L x 3L	0,39	0,7196	0,5420	0,642153	-2,7062	3,4862

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de κ -carragena; 2= pH; 3= pressão aplicada; *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 3.21 – Análise de variância (ANOVA) do Experimento IV do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3	5701,86	1900,62	47,61	3,41*
Resíduo	13	518,98	39,92		
Fator de ajuste	11	510,70	46,43	11,21	19,40**
Erro Puro	2	8,28	4,14		
Total	16	6220,84			

% variação explicada (R^2) = 91,66%. *F_(3, 13; 0,05) e **F_(11, 2; 0,05)

A Figura 3.6 revelou a influência das variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada) sobre a resposta IAE para o Experimento IV, tendo-se fixado a concentração de IPS em 1%. Observou-se que a resposta IAE foi influenciada pelas variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada). Os maiores valores de IAE foram encontrados para os valores médios de pH e baixas concentrações de κ -carragena (Figuras 3.6 a, b). Quando analisou-se a variável pressão, o IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos nos pontos extremos (pressões mais baixas ou nas mais altas), conforme notou-se nas Figuras 3.6c e 3.6d. Pelos resultados da Tabela 3.19, observou-se que o maior valor de IAE foi obtido pelo ensaio 9 (85,68 m²/g), no qual foi utilizada a mais baixa concentração de κ -carragena (0,032 g de κ -carragena/ g de IPS), pH do ponto central (6,00) e pressão mediana (450MPa), que foi inferior ao do IPS original (cerca de 97 m²/g). Comparando-se estes resultados com o Experimento II do Capítulo 2, o qual estava na mesma faixa de pH, também foi notado o efeito negativo da concentração de soluto (o aumento da concentração de IPS afeta negativamente o IAE) e pH. Comparando-se os valores de IAE obtidos no Experimento II do Capítulo 2 (Tabela 2.7) e os obtidos no Experimento IV (Tabela 3.19), guardando-se as devidas diferenças, observou-se que, de maneira geral, os valores obtidos no Experimento IV foram menores, dando a indicação que a adição de κ -carragena ao sistema diminuiu o índice de atividade emulsificante das amostras analisadas. Quando se comparou também os valores de IAE obtidos no Experimento III (Tabela 3.12) com os obtidos no Experimento IV (Tabela 3.19) observou-se que, de modo geral, a adição de pectina proporcionou maiores aumentos nos valores de IAE quando comparada com a κ -carragena e que os valores de pH ácidos favoreceram a obtenção de IAE mais elevados, comportamento semelhante ao obtido no Capítulo 2.

A Tabela 3.22 exibiu os coeficientes de regressão para a resposta IAE obtidos no Experimento IV. Neste Experimento, os termos quadráticos concentração de κ -carragena e pressão, o termo linear do pH e os termos de interação (concentração de κ -carragena)x(pH) e (concentração de κ -carragena)x(pressão) não foram estatisticamente significativos ($p>0,05$) para a resposta IAE, sendo incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 3.23). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (16,98) foi significativo ($p<0,05$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (4,72) não foi significativo ($p>0,05$) e sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 85%), foi possível concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,61%). A equação codificada de segunda ordem (Equação 3.6) que expressou o IAE em função das variáveis estudadas para o Experimento IV foi :

$$\text{IAE} = 60,73 - 8,55(\text{concentração de } \kappa\text{-carragena}) + 5,88(\text{pressão}) - 4,49(\text{pH})^2 - 9,82(\text{pH})(\text{pressão}) \quad (\text{Equação 3.6})$$

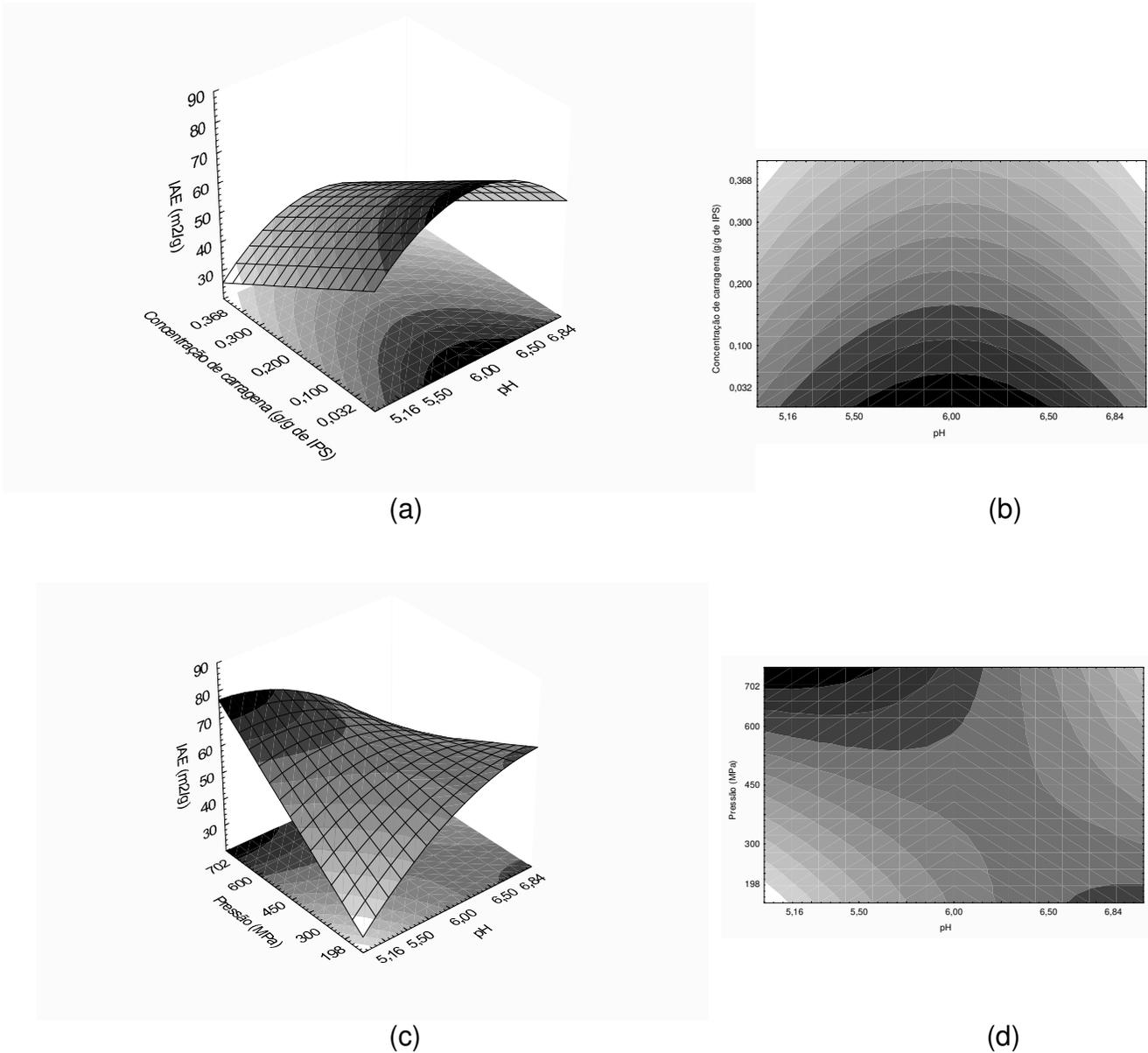


FIGURA 3.6 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) em função das variáveis pH e concentração de κ -carragena (a e b) e pH e alta pressão (c e d) para o Experimento IV.

TABELA 3.22 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento IV) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	59,90*	1,7277	34,6742	0,000831	52,4716	67,3387
Concentração κ -carragena (L)	-8,55*	0,8113	-10,5406	0,008881	-12,0427	-5,0610
Concentração κ -carragena (Q)	1,55	0,8930	1,7368	0,224565	-2,2913	5,3931
pH (L)	-0,46	0,8113	-0,5675	0,627574	-3,9513	3,0304
pH (Q)	-4,30*	0,8930	-4,8168	0,040500	-8,1435	-0,4591
Pressão (L)	5,88*	0,8113	7,2430	0,018534	2,3855	9,3672
Pressão (Q)	-0,72	0,8930	-0,8053	0,505184	-4,5613	3,1231
1L x 2L	-0,94	1,0600	-0,8888	0,467900	-5,5031	3,6189
1L x 3L	-1,14	1,0600	-1,0776	0,393916	-5,7033	3,4187
2L x 3L	-9,82*	1,0600	-9,2681	0,011442	-14,3856	-5,2636

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de κ -carragena; 2= pH; 3= pressão aplicada e *Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 3.23 – Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (Experimento IV).

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	4	2505,34	626,34	16,98	3,26*
Resíduo	12	442,64	36,89		
Fator de ajuste	10	424,66	42,47	4,72	19,40**
Erro Puro	2	17,98	8,99		
Total	16	2947,98	184,25		

% variação explicada (R^2) = 84,98%. * $F_{(4, 12; 0,05)}$ e ** $F_{(10, 2; 0,05)}$

A Figura 3.7 exemplificou as mudanças ocorridas nos valores de G' e G'' em função da frequência aplicada nas amostras dos ensaios selecionados do Experimento IV tratadas sob alta pressão. Observou-se que todas as amostras exibiram o mesmo tipo de comportamento e que os valores de G' e G'' para cada amostra foram próximos em cada frequência analisada. Como foi verificado o mesmo tipo de comportamento em todas as demais amostras analisadas (resultados não mostrados), tomou-se apenas os valores de frequência intermediária (1,667 Pa) para a realização dos cálculos de G'' para a comparação entre os ensaios nas análises estatísticas.

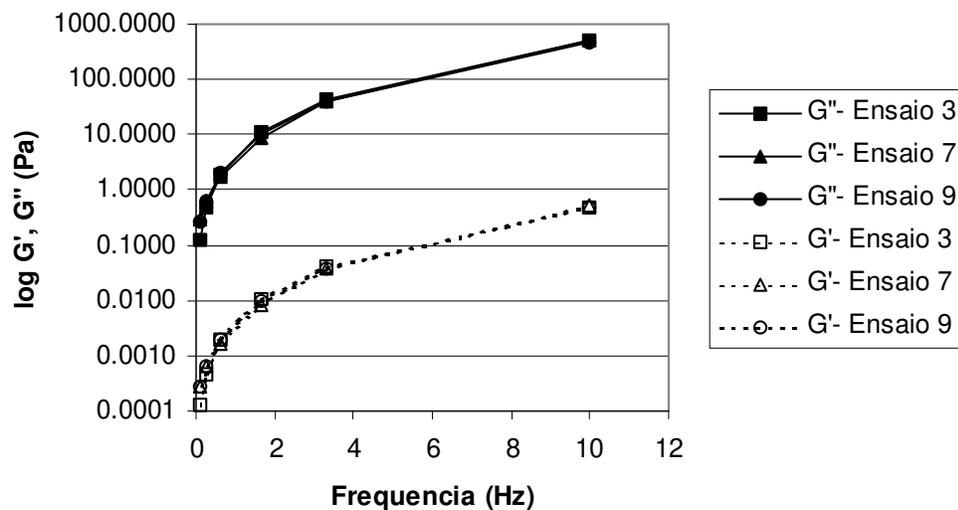


FIGURA 3.7 - Módulos G' (linha tracejada) e G'' (linha cheia) em função da frequência para as amostras selecionadas do Experimento IV com 1% de IPS, sendo : Ensaio 3 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, Pressão=300 MPa); Ensaio 7 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50 e Pressão=600 MPa); Ensaio 9 (0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00 e Pressão=450 MPa).

Como pôde ser observado nos resultados obtidos para os diferentes ensaios realizados (Tabela 3.19) os valores de G'' variaram entre 7,505 a 10,925, valores estes, mínimo e máximo, respectivamente, para os 17 ensaios realizados, sendo que a variação do ponto central foi de 7,422 a 8,948, ou seja, valores muito próximos àqueles obtidos nas outras condições do delineamento. Assim, nenhuma variável estudada foi estatisticamente significativa para a resposta G'' e a Tabela

3.24 confirma este fato, mostrando que apenas a média foi significativa ($p < 0,01$), sendo os demais efeitos lineares, quadráticos ou de interação entre as variáveis não significativos ($p > 0,05$ ou $p > 0,01$). Assim, não foi possível estabelecer um modelo para a resposta G'' em função das variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada) para o Experimento IV. Isto significa que os valores de G'' neste Experimento não foram afetados pelas variações de concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada.

TABELA 3.24 – Análise dos efeitos para a resposta G'' do Delineamento Composto Central Rotacional (Experimento IV).

	Efeitos	Erro Padrão	t (2)	p	Limite de Confiança	
					-95%	+95%
Média	8,15*	0,4418	18,4434	0,002927	6,2471	10,0487
Concentração κ -carragena (L)	-0,46	0,4149	-1,1073	0,383521	-2,2447	1,3258
Concentração κ -carragena (Q)	1,23	0,4567	2,6852	0,115214	-0,7387	3,1912
pH (L)	0,92	0,4149	2,2092	0,157781	-0,8686	2,7020
pH (Q)	0,50	0,4567	1,0942	0,388049	-1,4652	2,4647
Pressão (L)	-0,41	0,4149	-0,9933	0,425220	-2,1974	1,3731
Pressão (Q)	0,57	0,4567	1,2413	0,340324	-1,3981	2,5319
1L x 2L	0,28	0,5421	0,5252	0,651833	-2,0478	2,6173
1L x 3L	0,44	0,5421	0,8121	0,502033	-1,8923	2,7728
2L x 3L	-1,47	0,5421	-2,7166	0,112993	-3,8053	0,8598

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= concentração de κ -carragena; 2= pH; 3= pressão aplicada, *Coeficiente estatisticamente significativo ($p < 0,01$).

3.2. Resultados das análises específicas das amostras selecionadas

Conforme relatado no item 2.2.4. (Métodos analíticos) foram selecionadas as amostras que apresentaram em cada delineamento composto central rotacional (Experimentos III e IV) os maiores valores de solubilidade, IAE e valor de G'' , tendo-se assim, 3 amostras selecionadas em cada experimento, num total de 6 amostras (Tabela 3.3). Embora no Experimento IV não tenha sido possível traçar

as superfícies de resposta para G'' , o ensaio com o maior valor de G'' foi selecionado para a realização das análises específicas. As amostras selecionadas foram analisadas quanto ao teor de sulfidrila livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica.

Observou-se que no Experimento III, a amostra selecionada com maior valor de IAE apresentou baixo valor de solubilidade proteica. Este resultado está de acordo com o observado por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) que não encontrou correlação entre os valores de solubilidade e IAE para amostras de proteína de soja.

3.2.1. Conteúdo de sulfidrila livre.

Os valores do teor de sulfidrila livre apresentados pelas amostras selecionadas antes e após o tratamento sob alta pressão foram apresentados na Tabela 3.25. Observou-se que todas as amostras analisadas exibiram o mesmo tipo de comportamento, isto é, os valores de sulfidrila livre diminuiram após o tratamento sob alta pressão, mostrando que após este tratamento novas ligações S-S tenham sido formadas. Este fato também foi observado por Kajiyama et al. (1995) em extrato hidrossolúvel de soja e por Puppo et al. (2004) que afirmaram que o efeito do desdobramento da molécula de proteína induzido pela alta pressão foi acompanhado pela formação de pontes dissulfídicas (S-S).

Os valores de sulfidrila livre do IPS original diferiram significativamente ($p < 0,05$) de quase todas as amostras analisadas, com exceção das amostras antes do tratamento sob alta pressão dos ensaios 5 e 14 do Experimento III, mostrando que a preparação da amostra com o ajuste de pH causaram perdas de sulfidrila livre das amostras antes do tratamento sob alta pressão. Houve indícios que a pectina poderia proteger a estrutura da proteína. Para os tratamentos que utilizaram a κ -carragena (Experimento IV), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as amostras antes e após o tratamento sob alta pressão.

Comparando-se os resultados dos experimentos com adição de polissacarídeos com os apresentados no Capítulo 2, onde apenas a proteína de soja foi utilizada, observou-se que a amostra do ensaio 8 do Experimento III, que possui o mesmo valor de pH (4,00) da amostra 3 do Experimento I do Capítulo 2, embora o tratamento sob pressão tenha sido diferente, apresentou menor % de perda de sulfidril livre, indicando que a pressão e a adição de pectina podem ter mantido a sua estrutura menos vulnerável. Foi também observado, que todas as amostras adicionadas de pectina (Experimento III) não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores dos teores de sulfidril livre, antes e após o tratamento sob alta pressão. As menores perdas de sulfidril livre foram dos ensaios 5 e 8 do Experimento III e as amostras acidificadas exibiram, de maneira geral, um menor percentual de perda de sulfidril livre em relação às amostras do Experimento IV que estavam em valores de pH mais elevados, que refletiu a mesma tendência verificada nos Experimentos I e II do Capítulo 2.

O conteúdo de sulfidril livre do IPS (7,41 $\mu\text{moles/g}$ de proteína) foi superior ao relatado por Takeiti (2002) que obteve 3,82 $\mu\text{moles/g}$ de proteína, sendo próximo ao relatado por Liu, Xiong e Butterfield (2000) que encontraram valores de cerca de 10 $\mu\text{moles/g}$ de proteína.

TABELA 3.25 – Conteúdo de sulfidril livre ($\mu\text{moles/g}$ de proteína) do IPS e das amostras selecionadas dos delineamentos completos, antes e após a pressurização.

Amostra /Ensaio	Teor de sulfidril livre inicial (antes da pressurização)	Teor de sulfidril livre após tratamento sob pressão	Perda do teor de sulfidril livre após tratamento sob pressão (%)
IPS	$7,41 \pm 0,16$ ^{2,3}	-	
Experimento III			
5 ¹	$5,64 \pm 0,14$ ^{4, a}	$4,27 \pm 0,08$ ^{4, a}	24,29
8 ¹	$4,90 \pm 0,84$ ^{4, a}	$3,66 \pm 0,13$ ^{4, a}	25,31
14 ¹	$5,93 \pm 0,98$ ^{4, a}	$4,00 \pm 1,04$ ^{4, a}	32,55
Experimento IV			
3 ¹	$5,58 \pm 0,15$ ^{4, a}	$3,68 \pm 0,44$ ^{4, b}	34,05
7 ¹	$5,58 \pm 0,15$ ^{4, a}	$3,08 \pm 0,20$ ^{4, b}	44,80
9 ¹	$5,07 \pm 0,06$ ^{4, a}	$3,00 \pm 0,03$ ^{4, b}	40,83

¹ Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

² o valor de sulfidril livre difere significativamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey de quase todas as amostras, com exceção das amostras dos ensaios 5 e 14 (Exp. III) antes do tratamento sob alta pressão.

³ valores médios de quatro determinações realizadas em triplicata \pm desvio padrão.

⁴ valores médios de duas determinações realizadas em triplicata \pm desvio padrão.

Sendo: Experimento III (1% IPS): Ensaio 5= 0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00, 600 MPa; Ensaio 8= 0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00, 600 MPa; Ensaio 14= 0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50, 702 MPa. Experimento IV (1% IPS): Ensaio 3= 0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 300 MPa; Ensaio 7= 0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 600 MPa; Ensaio 9= 0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00, 450 MPa.

3.2.2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).

Os valores de entalpia e de temperatura de desnaturação das médias das três amostras analisadas para cada um dos ensaios selecionados dos Experimentos III e IV foram apresentados na Tabela 3.26. Os termogramas obtidos durante a análise de calorimetria diferencial de varredura foram colocados no Anexo D. As curvas levantadas para cada ensaio apresentaram as mesmas concentrações de proteína utilizadas originalmente na sua preparação, assim sendo, todas as amostras possuem a mesma concentração de proteína, pois nesses experimentos a concentração de IPS foi fixada em 1%. Porém, como os valores de pH entre os

ensaios foram diferentes, as comparações dos valores de T_d e ΔH foram feitas apenas para cada ensaio antes e após o tratamento sob alta pressão.

Na curva do IPS houve dois picos bem definidos cujos valores médios da temperatura de desnaturação foram de 73,25°C correspondente a fração 7S e 90,70°C para a fração 11S. Esses valores embora inferiores, foram próximos aos obtidos por Souza, 2000 (75,7°C e 92,6°C, para respectivamente as frações 7S e 11S) e também por Takeiti, 2002 (75,39°C para a fração 7S e 93,17°C para a fração 11S). Os valores de temperatura de desnaturação mencionados por Puppo et al. (2004) foram de 73,9°C para a fração 7S e de 86,7°C para a fração 11S. A curva obtida para o isolado proteico de soja colocada nestes gráficos tem apenas caráter ilustrativo, para elucidar os picos das frações 7S e 11S e foi utilizada apenas para o cálculo das temperaturas de desnaturação do IPS original, não sendo utilizada para a comparação dos valores de T_d e ΔH , pois esta curva estava em uma concentração mais elevada (20%) do que as demais amostras dos ensaios.

Em nenhum termograma, tanto para as amostras antes do tratamento sob pressão como para as amostras após esse tratamento, foi possível visualizar o pico correspondente a fração 7S. A preparação das amostras, com o respectivo ajuste de pH, pôde ter contribuído para o desaparecimento do pico correspondente a proteína 7S, visto que a estabilidade térmica está também associada ao pH, conforme relatado por Puppo e Anón (1999). Zhang et al. (2005) analisando os efeitos do tratamento sob alta pressão sobre as proteínas do extrato hidrossolúvel de soja, observaram que a fração 7S é muito sensível ao tratamento sob pressão sendo desnaturada acima de 300 MPa e a fração 11S foi desnaturada acima de 400 MPa. Estes mesmos efeitos foram também observados por Molina, Defaye e Ledward (2002) que analisaram as frações 7S e 11S extraídas do IPS.

Pela análise de variância, observou-se que todas as amostras não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação à temperatura de desnaturação antes e após o processamento sob alta pressão. As amostras dos ensaios 5 e 8 do

Experimento III e do ensaio 9 do Experimento IV apresentaram algum grau de desnaturação. Em relação aos valores de ΔH , com exceção das amostras dos ensaios 3 e 7 do Experimento IV, todas as demais amostras não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de ΔH antes e após o tratamento sob alta pressão, indicando que o tratamento sob alta pressão não contribuiu, de maneira geral, para a desnaturação da proteína. Observou-se que no caso das amostras dos ensaios 3 e 7, que possuem a mesma concentração de proteína e pH, diferindo apenas em relação ao tratamento sob pressão, que os valores de ΔH para os mesmos tratamentos foram semelhantes entre si e que o tratamento sob pressão não influenciou o valor da entalpia. No caso, das amostras dos ensaios 3 e 7, houve indicações que o complexo formado entre a proteína e a κ -carragena protegeu a proteína da sua desnaturação. A entalpia é um parâmetro termodinâmico que indica mudanças ocorridas na proteína, como ruptura de pontes de hidrogênio, de interações hidrofóbicas e agregação (MURRAY; ARNTFIELD; ISMOND, 1985). Valores mais altos de entalpia estão associados a maiores porcentagens de proteína nativa ou pouco desnaturada (WAGNER; AÑÓN, 1990). No entanto, esta técnica também apresenta limitações para a caracterização da agregação associada a desnaturação térmica (BEVERIDGE; ARNTFIELD; MURRAY, 1985).

Dumay, Kalichevsky e Cheftel (1994) observaram que a alta pressão induz tanto o desdobramento como a agregação de β -lactoglobulinas (concentração de 2,5%) que podem ser parcialmente reversíveis com o tempo de estocagem após a pressurização. Foram observados aumentos nos valores de entalpia em relação a amostra pressurizada inicialmente (2,5% de proteína, 0% de sacarose) com o aumento do tempo de estocagem. Kolakowski, Dumay e Cheftel (2001) verificaram que as amostras pressurizadas de β -lactoglobulina estocadas por mais de 24 horas também apresentaram um ligeiro aumento no valor da entalpia.

TABELA 3.26 – Temperatura (Td) e entalpia (ΔH) de desnaturação das amostras selecionadas antes e depois do tratamento sob alta pressão.

Ensaio	Td (°C) ^{1,2}	ΔH (J/g de proteína) ^{1,2}	Desnaturação (%) ³
IPS original	90,70 ± 0,32		
Experimento III			
5 (antes alta pressão)	83,22 ± 1,08 ^a	0,0013 ± 0,00035 ^a	30,77
(após alta pressão)	83,83 ± 0,82 ^a	0,0009 ± 0,0004 ^a	
8 (antes alta pressão)	88,67 ± 0,36 ^b	0,0092 ± 0,0036 ^b	28,26
(após alta pressão)	80,43 ± 3,81 ^b	0,0066 ± 0,0028 ^b	
14 (antes alta pressão)	83,40 ± 1,32 ^c	0,0009 ± 0,0005 ^c	-
(após alta pressão)	85,81 ± 5,12 ^c	0,0024 ± 0,0005 ^c	
Experimento IV			
3 (antes alta pressão)	82,68 ± 0,15 ^d	0,0002 ± 0,0001 ^d	-
(após alta pressão)	80,49 ± 2,44 ^d	0,0057 ± 0,0008 ^e	
7 (antes alta pressão)	82,67 ± 0,15 ^e	0,0002 ± 0,0001 ^f	-
(após alta pressão)	83,32 ± 4,77 ^e	0,0060 ± 0,0018 ^g	
9 (antes alta pressão)	90,11 ± 1,86 ^f	0,0038 ± 0,0010 ^h	47,37
(após alta pressão)	81,95 ± 1,67 ^f	0,0020 ± 0,0007 ^h	

¹ Média de três determinações ± desvio padrão;

² Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) comparando-se cada um dos ensaios, antes e após o tratamento sob alta pressão.

³ % Desnaturação = $[(\Delta H \text{ antes alta pressão} - \Delta H \text{ após alta pressão}) / \Delta H \text{ antes alta pressão}] \times 100$
 Sendo: Experimento III (1% IPS): Ensaio 5= 0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00, 600 MPa; Ensaio 8= 0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00, 600 MPa; Ensaio 14= 0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50, 702 MPa. Experimento IV (1% IPS): Ensaio 3= 0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 300 MPa; Ensaio 7= 0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 600 MPa; Ensaio 9= 0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00, 450 MPa.

3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.

A Figura 3.8 exibiu o cromatograma do IPS original e as Figuras 3.9 e 3.10 apresentaram os cromatogramas das amostras selecionadas com maiores valores de solubilidade proteica, Índice de Atividade Emulsificante e G'' obtidos nos delineamentos completos, para respectivamente os Experimentos III e IV. O cromatograma apresentado na Figura 3.8, mostrou que o IPS original exibiu três picos bem definidos obtidos em 23,3, 26,3 e 27,4 minutos. O segundo pico que apresentou a maior intensidade foi o único que apareceu em todas as amostras analisadas (Figuras 3.9 e 3.10) tanto antes como após o tratamento sob alta pressão. Apenas a mudança de pH (amostras antes do tratamento sob alta

pressão) já causou alterações no perfil cromatográfico e outras mudanças também puderam ser notadas nos cromatogramas após o tratamento sob alta pressão.

Para as amostras dos ensaios do Experimento III (Figura 3.9) que apresentavam valores de pH mais baixo do que a amostra original de IPS, observou-se que apenas o segundo pico que apareceu no IPS original permaneceu em todas as amostras tanto antes quanto após o tratamento sob alta pressão. Os cromatogramas antes e após o tratamento sob pressão se mostraram similares e não apresentaram a formação de novos picos, evidenciando que a adição de pectina não influenciou as estruturas existentes. No caso específico da amostra do ensaio 8, que apresentava dois picos característicos antes do tratamento sob alta pressão, após o tratamento, o pico correspondente ao 3^o pico do IPS original diminuiu de intensidade, ficando mais evidente apenas o correspondente ao segundo pico do IPS original. No caso do ensaio 5, o maior pico aumentou de intensidade após o tratamento sob alta pressão. Comparando-se a Figura 3.9 com a Figura 3.8, observou-se que a variação de pH influenciou a mudança do perfil cromatográfico, enquanto que as diferenças na pressão aplicada fizeram com que as intensidades dos picos fossem diferentes.

Foram notadas pequenas diferenças entre os perfis cromatográficos antes do tratamento sob alta pressão para as amostras do Experimento IV (Figura 3.10), sendo o seu formato e intensidade de picos similares. Para a amostra do ensaio 9, foi notado que o terceiro pico correspondente ao IPS original praticamente desapareceu após o tratamento sob alta pressão. De modo geral, após o tratamento sob pressão os picos (2 e 3) que apareciam na amostras antes do tratamento sob alta pressão diminuíram de intensidade.

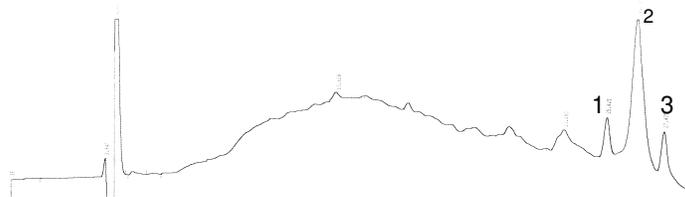
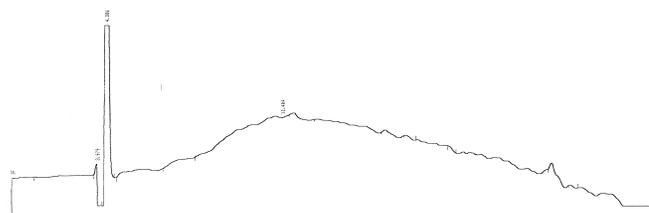
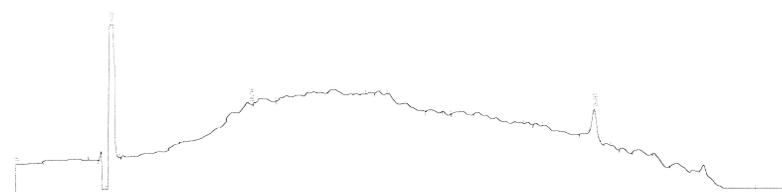


FIGURA 3.8 – Cromatogramas de CLAE-FR do IPS original (pH=6,60), sem tratamento, mostrando os picos mais bem definidos (1, 2 e 3).



Ensaio 5 (antes do tratamento sob pressão): 0,1 g de pectina/g de proteína, pH=3,00



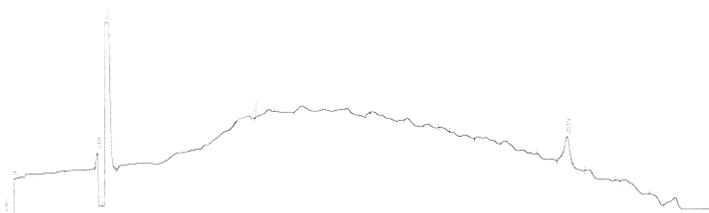
Ensaio 5 após o tratamento sob pressão de 600 MPa.



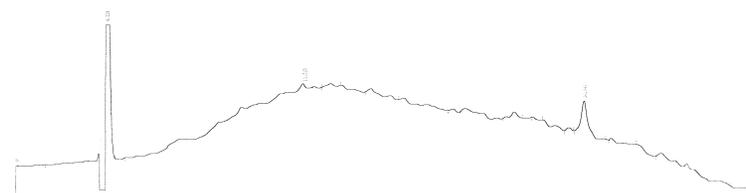
Ensaio 8 (antes do tratamento sob pressão): 0,3 g de pectina/g de proteína, pH=4,00



Ensaio 8 após o tratamento sob pressão de 600 MPa.

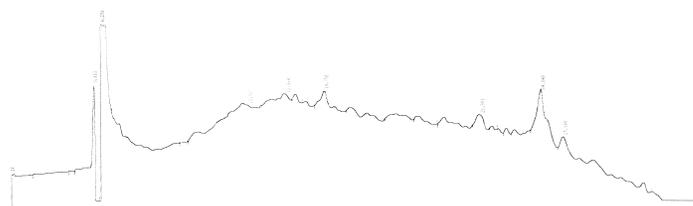


Ensaio 14 (antes do tratamento sob pressão): 0,2 g de pectina/g de proteína e pH=3,50

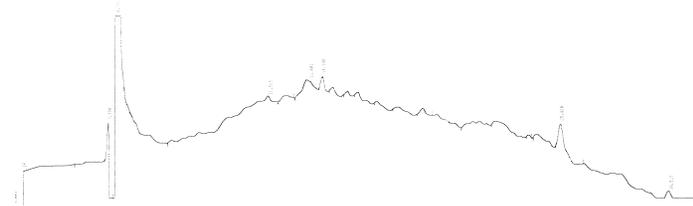


Ensaio 14 após o tratamento sob pressão de 702 MPa.

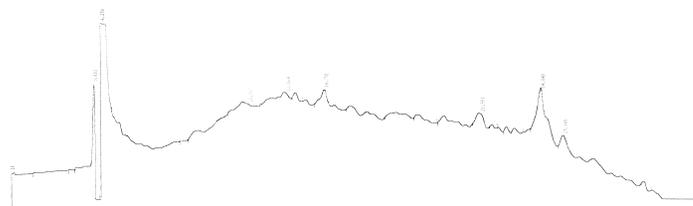
FIGURA 3.9 – Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento III, contendo 1% de IPS.



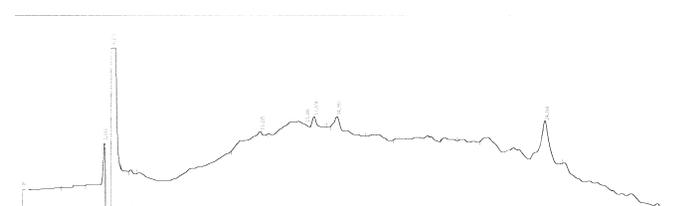
Ensaio 3 (antes do tratamento sob pressão): 0,1g de κ -carragena/g de proteína, pH=6,50



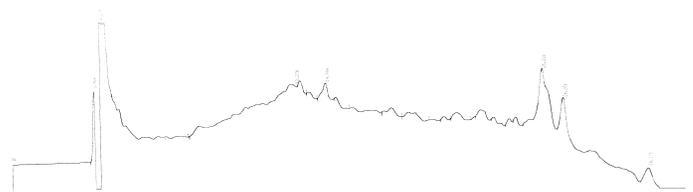
Ensaio 3 após o tratamento sob pressão de 300 MPa.



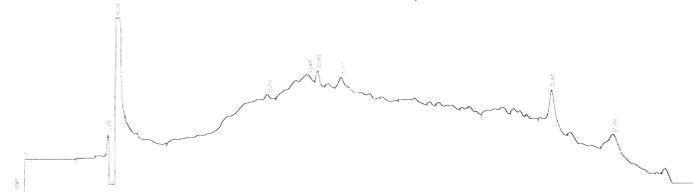
Ensaio 7 (antes do tratamento sob pressão): 0,1g de κ -carragena/g de proteína, pH=6,50



Ensaio 7 após o tratamento sob pressão de 600 MPa.



Ensaio 9 (antes do tratamento sob pressão): 0,032g de κ -carragena/g de proteína, pH=6,00



Ensaio 9 após o tratamento sob pressão de 450 MPa.

FIGURA 3.10 – Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento IV, contendo 1% de IPS.

3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras selecionadas dos Experimentos III e IV antes e após o tratamento sob alta pressão foram apresentados na Figura 3.11. Observou-se que todas as amostras apresentaram mudanças nos perfis eletroforéticos após o tratamento sob alta pressão. De modo geral, a banda designada como A (destacada na Figura 3.11) permaneceu intacta em todas as amostras analisadas, independente da pressão aplicada ou composição das amostras.

Para as amostras antes do tratamento sob alta pressão do Experimento III foram observadas a presença de estruturas de maior peso molecular que apareceram no topo do gel eletroforético. Observou-se também neste experimento, que a amostra de menor valor de pH (ensaio 5, pH=3,0) mostrou perfil diferenciado das demais amostras analisadas após o tratamento sob pressão, mostrando maior número de bandas e de unidades móveis. Após o tratamento sob alta pressão, as bandas distintas, particularmente, das amostras dos ensaios 8 e 14 desapareceram, sugerindo que pode ter havido a formação de um complexo de alto peso molecular entre a pectina e a proteína de soja, não penetrando este no gel. Já nos valores mais baixos de pH (ensaio 5), o coacervado formado se descomplexou e a proteína foi capaz de penetrar livremente no gel. Este comportamento também foi observado por Capitani (2004) que trabalhou com frações proteicas de soro de leite adicionadas de carboximetilcelulose (CMC) e observou a formação de coacervados de alto peso molecular em pH 3,0 e 4,0 que não penetraram no gel de poliacrilamida na análise por eletroforese Native-Page.

Uma ligeira diferença pôde ser notada entre os perfis eletroforéticos das amostras do Experimento IV (Figura 3.11). Notou-se que as amostras dos ensaios 3 e 7 antes do tratamento sob alta pressão apresentaram o mesmo perfil, pois são amostras de mesma composição, diferindo apenas após o tratamento sob alta pressão. Foi observada uma forte e escura banda no topo do gel da amostra do ensaio 9, comparada com as demais, o que pode ser atribuído ao baixo teor de κ -

carragena ou ao valor de pH ligeiramente inferior às demais amostras. Todas as amostras após o tratamento sob alta pressão mostraram perdas das unidades maiores que apareciam no topo do gel. Similarmente, ao já discutido para as amostras do Experimento III, sugere-se que houve interações proteína-carragena propiciando a formação de complexos de alto peso molecular, que não penetraram livremente no gel de poliacrilamida.

A Figura 3.12 apresenta o perfil eletroforético SDS-PAGE, em condições redutoras das amostras selecionadas dos Experimentos III e IV, antes e após o tratamento sob alta pressão. Observou-se que todas as amostras acrescidas de pectina (Experimento III) apresentaram diferenças no perfil eletroforético em SDS-PAGE após o tratamento sob alta pressão, em relação à amostra antes deste tratamento. No caso das amostras dos ensaios 8 e 14, praticamente as estruturas de maior peso molecular desapareceram após o tratamento sob alta pressão, intensificando-se as bandas de menores pesos moleculares. No caso da amostra do ensaio 5, houve a formação de frações de maior peso molecular após o tratamento sob alta pressão indicando a interferência da pectina nos resultados.

Todas as amostras do Experimento IV apresentaram perdas das estruturas de maior peso molecular (>52 kDa) após o tratamento sob alta pressão. Houve o aparecimento de banda na região de 47 kDa após o tratamento sob alta pressão o que poderia ser atribuída aos polipeptídeos ácidos da fração 11S ou à subunidade β da β -conglucina (PETRUCCELLI; AÑON, 1995; THANH; SHIBASAKI, 1977). Observou-se também, a formação de uma nova banda de aproximadamente 29 kDa e de um grupo de bandas entre 37 e 40 kDa, indicando que houve interação entre a proteína de soja e κ -carragena antes do tratamento sob alta pressão.

	Experimento III						Experimento IV					
(1)	8	14	5	8	14	5	7	9	3	7	9	3
(2)	4,00	3,50	3,00	4,00	3,50	3,00	6,50	6,00	6,50	6,50	6,00	6,50
(3)	-	-	-	600	702	600	-	-	-	600	450	300
(4)	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-
(5)	-	-	-	-	-	-	0,1	0,032	0,1	0,1	0,032	0,1

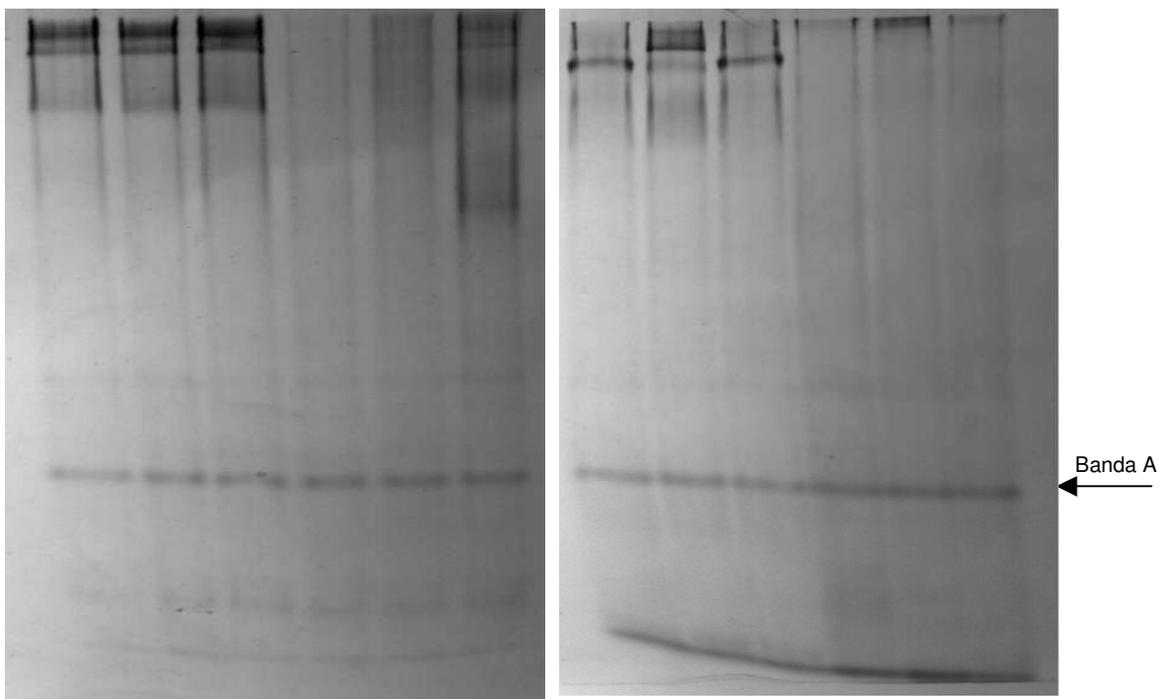


FIGURA 3.11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras selecionadas dos Experimentos III e IV, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) nível de pressão aplicada; (4) concentração de pectina (g/g de IPS) e (5) concentração de κ -carragena (g/g de IPS).

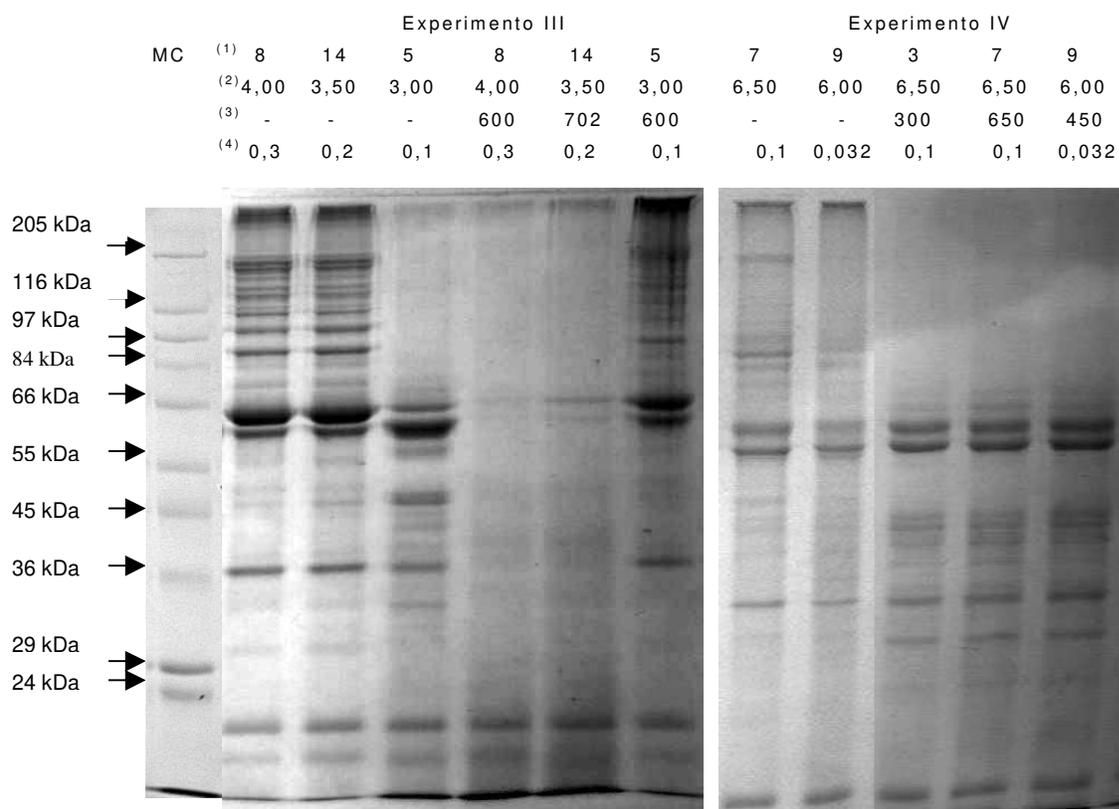


FIGURA 3.12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE), em condições redutoras das amostras selecionadas dos Experimentos III e IV, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob alta pressão, sendo MC=marcadores de peso molecular comercial, (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) nível de pressão aplicada e (4) concentração do polissacarídeo (g/g de IPS): pectina (Experimento III) e κ -carragena (Experimento IV). Sendo que no Experimento IV as amostras 3 e 7 possuem a mesma composição diferindo apenas no tratamento sob alta pressão.

3.2.5. Microestrutura das amostras selecionadas.

A Figura 3.13 apresentou a microestrutura da amostra de IPS, pectina e κ -carragena e as Figuras 3.14 e 3.15 apresentaram as microestruturas das amostras selecionadas obtidas dos experimentos com delineamentos completos nos quais havia, respectivamente, a adição de pectina (Experimento III) e κ -carragena (Experimento IV) à proteína de soja. Observou-se que a amostra de IPS apresentou uma conformação plana e bastante característica do produtos liofilizados (Figura 3.13), sendo facilmente visualizada nas demais microestruturas documentadas, no entanto, os polissacarídeos pectina e κ -carragena apresentaram uma estrutura mais complexa.

Na Figura 3.14 (a, b) observou-se que a amostra do ensaio 5 do Experimento III não sofreu alteração de estrutura após o tratamento sob alta pressão. No entanto, a amostra do ensaio 8 (pH=4,0) (Figura 3.14 c, d) mostrou o mesmo tipo de comportamento exibido anteriormente pelas amostras acidificadas (Experimento I do Capítulo 2), com agregação, porém esta agregação parece um pouco menos intensa do que a observada no Experimento I do Capítulo 2, sugerindo que a pectina possa exercer uma certa proteção sobre a molécula de proteína, evitando a sua intensa agregação após o tratamento sob alta pressão. A amostra do ensaio 14 (Figura 3.14 e, f) que foi submetida ao mais alto valor de pressão (702 MPa), também mostrou a formação de agregados após o tratamento sob alta pressão. Embora não haja uma relação direta entre microestrutura e características físico-químicas, alguns destes resultados confirmaram de certa forma, os obtidos nas análises de conteúdo de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia e eletroforese. Os resultados dos ensaios 8 e 14 estão de acordo com os resultados das análises de teor de sulfidril livre, aparência das amostras após o tratamento sob alta pressão, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese e cromatografia, confirmando que houve mudanças nas estruturas das amostras após o tratamento sob alta pressão. Para o ensaio 5, os resultados da microscopia não foram de acordo com os observados para a eletroforese e

cromatografia, que apontam para a formação de estrutura diferenciada após o tratamento sob alta pressão, muito embora estejam de acordo com os obtidos para o teor de sulfidril livre, isto se deve ao fato da limitação do método utilizado para a microscopia eletrônica neste trabalho.

As microestruturas observadas no Experimento IV foram similares antes e após o tratamento sob alta pressão, principalmente quando observou-se a amostra do ensaio 9 (Figura 3.15 e, f). As amostras dos ensaios 3 (Figura 3.15 a, b) e 7 (Figura 3.15 c, d) exibiram ligeira alteração de estrutura após o tratamento sob alta pressão, evidenciando a limitação deste método de microscopia em registrar as mudanças ocorridas na molécula.

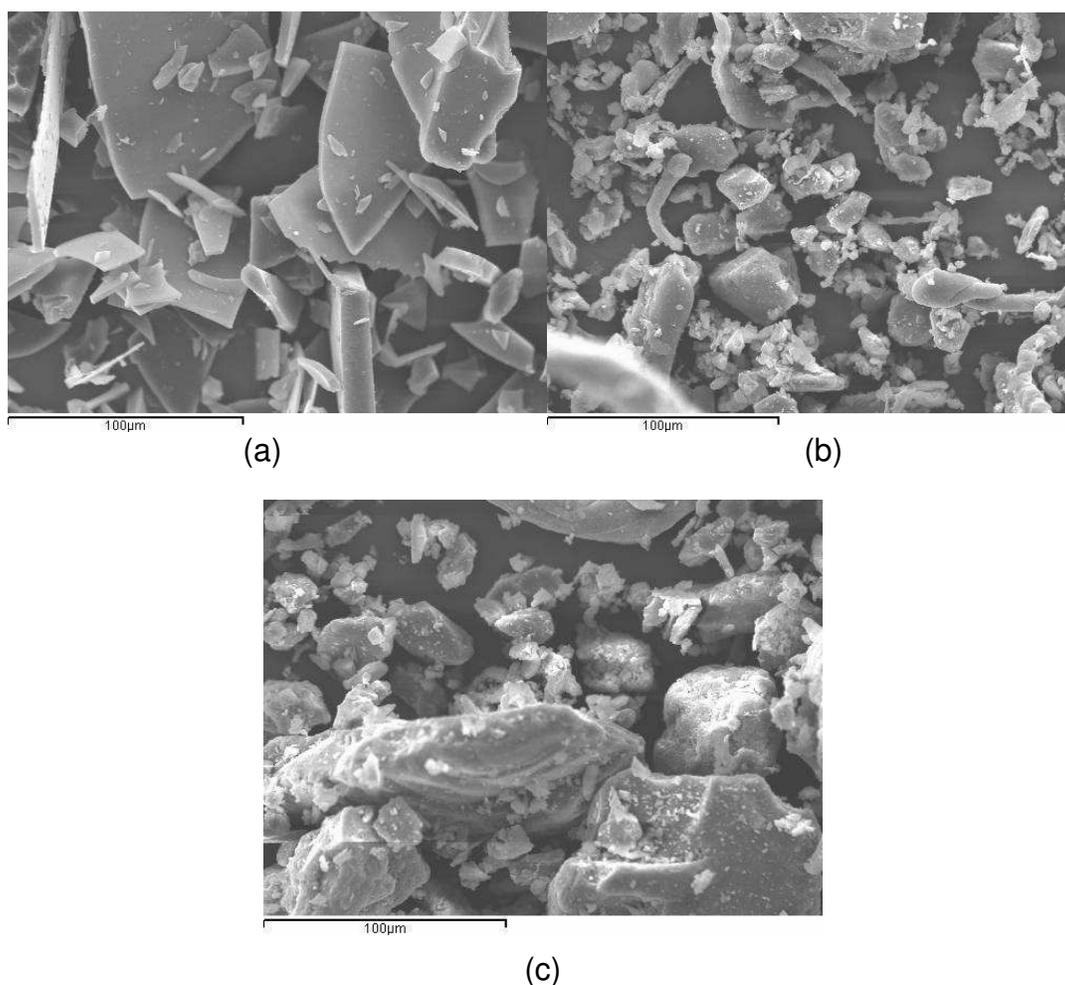


FIGURA 3.13 – Microestruturas antes do tratamento sob alta pressão de: a) IPS original (pH=6,60), b) pectina comercial e c) κ -carragena comercial, aumento de 540 vezes.

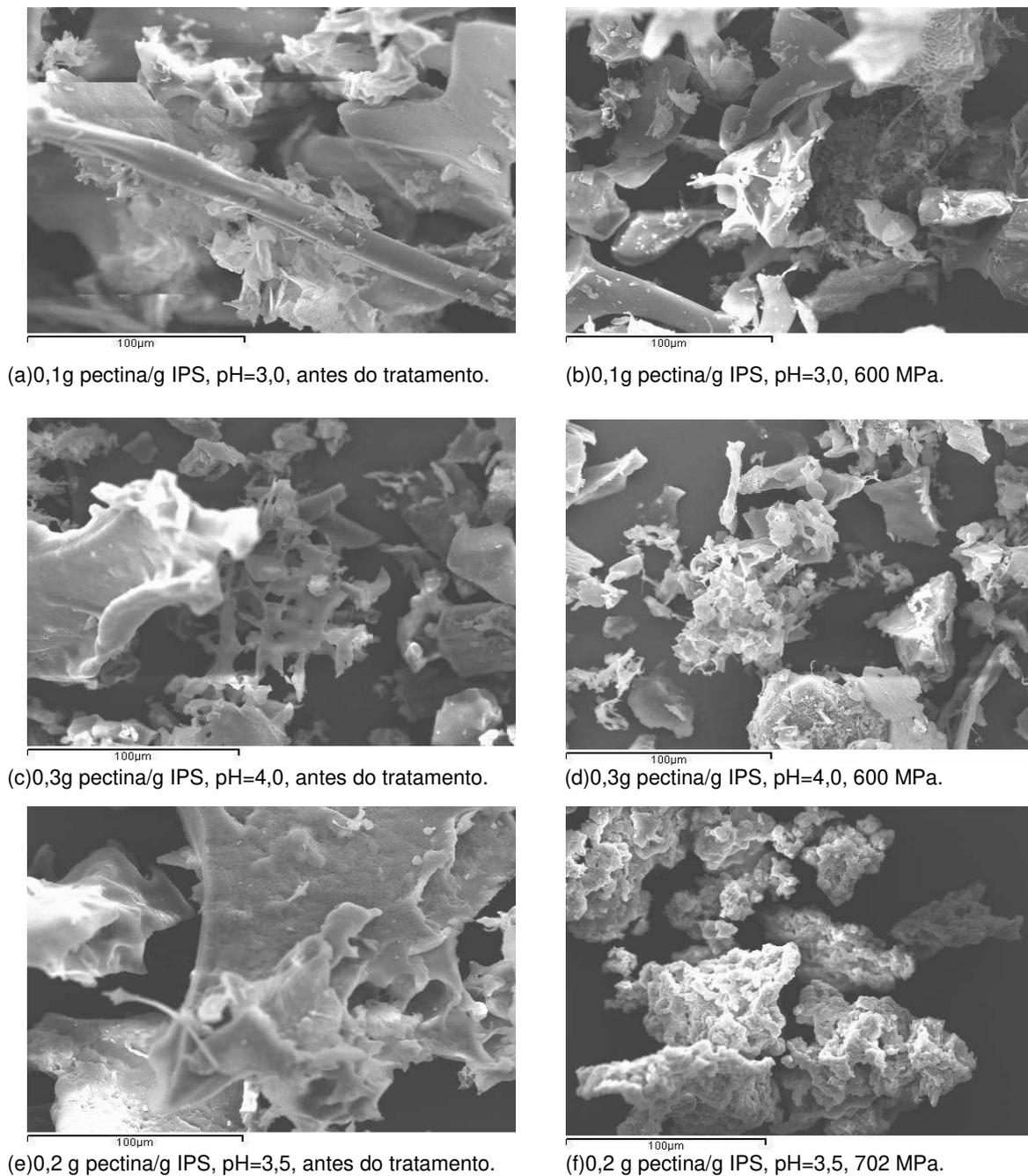


FIGURA 3.14 – Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento III (1% IPS), antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 5 (0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00); (b) Ensaio 5 (0,1 g de pectina/g de IPS, pH=3,00, 600 MPa); (c) Ensaio 8 (0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00) e (d) Ensaio 8 (0,3 g de pectina/g de IPS, pH=4,00, 600 MPa); (e) Ensaio 14 (0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50) e (f) Ensaio 14 (0,2 g de pectina/ g de IPS, pH=3,50, 702 MPa).

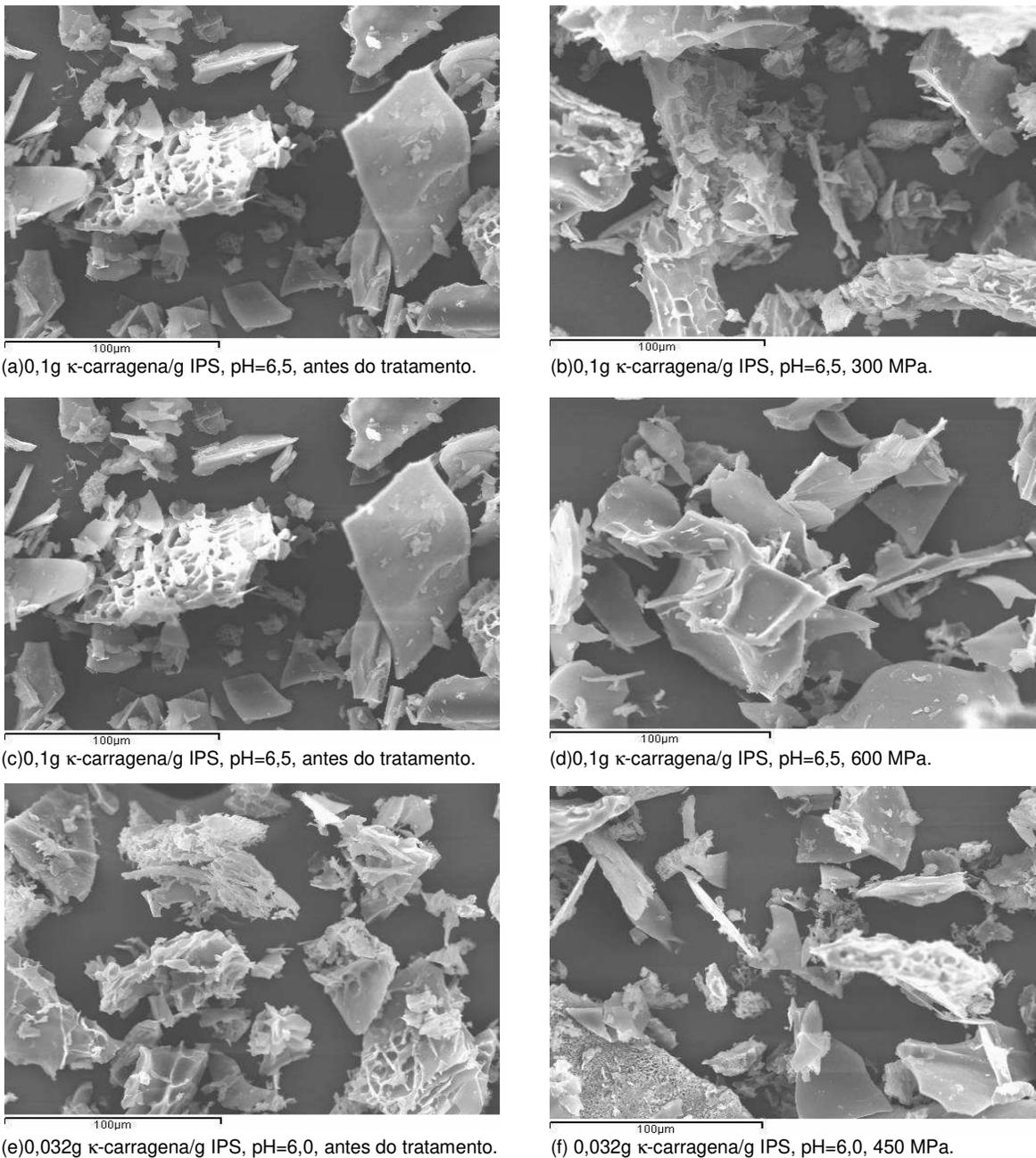


FIGURA 3.15 – Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento IV (1% IPS), antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 540 vezes: a) Ensaio 3 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50); (b) Ensaio 3 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 300 MPa); (c) Ensaio 7 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50) e (d) Ensaio 7 (0,1 g de κ -carragena/g de IPS, pH=6,50, 600 MPa); (e) Ensaio 9 (0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00) e (f) Ensaio 9 (0,032 g de κ -carragena/ g de IPS, pH=6,00, 450 MPa).

4. Conclusão

A adição de pectina ao sistema fez com que outras variáveis além do pH influenciassem a solubilidade proteica, embora o efeito do pH seja ainda o mais relevante. O pH teve um efeito negativo sobre a solubilidade proteica, isto é, à medida em que o pH aumentou (na faixa abaixo do pI) diminuiu a solubilidade proteica em presença de pectina, o que acompanhou a tendência verificada anteriormente para esta mesma faixa de pH (2,66 – 4,34), quando se utilizou apenas proteína de soja.

Os maiores valores de IAE foram encontrados para os valores médios de pH e concentração de pectina, sendo que o IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos sob alta pressão nos pontos extremos (mais baixos ou nos mais altos).

Embora os efeitos das variáveis fossem pequenos, observou-se que a incorporação de pectina ao sistema fez com que todas as demais variáveis tivessem efeitos positivos ao aumento do G'' , na faixa de pH estudada (2,66 a 4,34).

Embora o efeito do pH sobre a resposta solubilidade proteica seja o mais relevante, a adição de κ -carragena também influenciou negativamente esta resposta. Em presença de κ -carragena e na faixa de pH estudada (5,16-6,84), o pH teve um efeito positivo sobre a solubilidade proteica, isto é, à medida que aumentou o pH aumentou também a solubilidade proteica.

A adição de κ -carragena ao sistema, fez com que a resposta IAE fosse influenciada pelas variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada). Os maiores valores de IAE foram encontrados para os valores médios de pH e baixas concentrações de κ -carragena. O IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos sob pressão nos pontos extremos (mais baixos ou nos mais altos).

Não foi possível estabelecer um modelo para a resposta G'' em função das variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada), sendo verificado que os valores de G'' não foram afetados pelas variações de concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada na região estudada.

A análise das amostras selecionadas com os maiores valores de solubilidade proteica, IAE e G'' em cada experimento, num total de seis (06) amostras, mostraram que o tratamento sob alta pressão diminuiu em maior ou menor grau o teor de sulfidril livre de todas as amostras analisadas. Para as amostras adicionadas de pectina os teores de sulfidril livre não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) antes e após o tratamento sob alta pressão mostrando que a pectina pôde ter exercido uma certa proteção à molécula de proteína. As mudanças na molécula de proteína foram confirmadas pelas alterações observadas através das análises de CDV, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e em alguns casos também, pela microscopia eletrônica.

Devido à boa solubilidade do IPS em pH ácido e acima de 6,00, houve indicativos sobre sua possível utilização tanto em bebidas com pH baixo como nas lácteas conferindo alto teor proteico. Nos produtos onde se requer uma boa capacidade de formar emulsão deve-se adicionar, preferencialmente, a pectina, observando-se a faixa de pH para a sua utilização. O aumento da concentração de pectina e pressão podem favorecer a obtenção de produtos com característica mais viscosa, na faixa de pH ácido. A κ -carragena pode ser utilizada em produtos onde se deseja controlar a solubilidade e o IAE.

5. Agradecimento

À Capes/Ministério da Educação pela concessão de bolsa sanduíche na Universidade de Reading.

6. Referências Bibliográficas

APICHARTSRANGKOON, A. Effects of high pressure on rheological properties of soy protein gels. **Food Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 55-60, 2003.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp. 1995. 299 p.

BEVERIDGE, T.; ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E.D. Protein structure development in relation to denaturation temperatures. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 18, n. 2, p. 189-191, 1985.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH and SS groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 39, v. 1, p. 49-51, 1974.

BIETZ, J. A. Separation of cereal proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, The Netherlands, v. 255, p. 219-238, 1983.

CAPITANI, C. D. **Interação de proteínas do soro de leite com polissacarídeo: fracionamento e estudo das propriedades funcionais dos complexos**. 2004. 153 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

DUMAY, E. M.; KALICHEVSKY, M. T.; CHEFTEL, J. C. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and baroprotective effects of sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 9, p. 1861-1868, 1994.

HARDHAM, J. F. The determination of total and reactive sulphhydryl of whey protein concentrates. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, v. 36, n. 4, p. 153-155, 1981.

HETTIARACHCHY, N.; KALAPATHY, U. Soybean protein products. In Liu, K. *Soybeans: chemistry, technology, and utilization*, Chapter 8. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. 1999. p. 379-411.

- HILL, S. E. Emulsions. In: HALL, G. M. (ed.). **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 153-185.
- KAJIYAMA, N.; ISOBE, S.; UEMURA, K.; NOGUCHI, A. Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 147-158, 1995.
- KOLAKOWSKI, P.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Effects of high pressure and low temperature on β -lactoglobulin unfolding and aggregation. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, n. 3, p. 215-232, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, p, 680-685, 1970.
- LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, physical, and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 5, p. 811-818, 2000.
- MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.
- MOLINA, E.; DEFAYE, A. B.; LEDWARD, D. A. Soy protein pressure-induced gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 625-632, 2002.
- MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 263-269, 2001.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

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**, Ottawa, v. 18, n. 2, p. 158-162, 1985.

OWUSU-APENTEN, R. K. The bicinchoninic acid protein assay. In: OWUSU-APENTEN, R. K. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 99-124, 2002. 463p.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 3, p. 716-723, 1978.

PENNA, A. L. B. **Hidrocolóides**: usos em alimentos. Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas. Disponível

http://www.revistafi.com.br/Main/revistas/ed_17/pdf/p&da.pdf. [acesso em 06/12/2003].

PETRUCCELLI, S.; AÑON, M. C. Soy protein isolate components and their interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 7, p. 1762-1767, 1995.

PUPPO, M. C.; ANON, M. C. Soybean protein dispersions at acid pH: thermal and rheological properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 1, p. 50 –56, 1999.

PUPPO, C.; CHAPLEAU, N.; SPERONI, F.; LAMBALLERIE-ANTON, M. de; MICHEL, F.; AÑON, C.; ANTON, M. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 6, p. 1564-1571, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1^a ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SOUZA, A. S. de. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos.** 2000. 108p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

TAKEITI, C. Y. **Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos.** 2002. 102 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Beta-conglycinin from soybean proteins: isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochimica et Biophysica Acta**, The Netherlands, v. 490, n.2, p. 370-384, 1977.

WAGNER, J.R.; AÑON, 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.

ZHANG, H.; LI, L.; TATSUMI, E.; ISOBE, S. High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 7-14, 2005.

Capítulo 4

Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre os fatores antinutricionais das proteínas de soja

Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre os fatores antinutricionais das proteínas de soja

RESUMO

A soja é uma excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal, porém, contém alguns componentes de ação antinutricional, como os inibidores de proteases, lectinas, fitatos e saponinas. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento sob alta pressão isostática, considerado brando em relação ao tratamento térmico, sobre os fatores antinutricionais teor de fitato e inibidor de tripsina de uma solução com 5% de isolado proteico de soja, processada na faixa de 200 a 700 MPa. Foram realizadas duas extrações de fitato e inibidor de tripsina de bateladas diferentes e as amostras foram analisadas em triplicata. Houve indícios que o tratamento sob alta pressão isostática seja eficiente para eliminar o fitato presente nas amostras de isolado proteico de soja, não se mostrando, porém, efetivo para alterar os teores de inibidor de tripsina.

Palavras-chave: isolado proteico de soja; fitato; inibidor de tripsina; alta pressão isostática.

SUMMARY

Soybean is an excellent protein source for human and animal consumption but it has as well some antinutritional factors such as protease inhibitors, lectins, phytate and saponin. In this work, the effects of isostatic high-pressure treatment (200-700 MPa), an alternative to thermal treatment, on antinutritional factors phytate and trypsin inhibitor content in 5% soy protein isolate (SPI) solution were evaluated. Two extractions of phytate and trypsin inhibitor of different batch were carried out and the analyses were repeated three times. There is an indication that high-pressure treatment was efficient to eliminate the phytate but could not change trypsin inhibitor content.

Keywords: soy protein isolate; phytate; trypsin inhibitor; isostatic high pressure.

1. Introdução

A soja constitui uma excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal. A soja, porém, contém, como a maioria das leguminosas, algumas proteínas tóxicas e outros componentes de ação antinutricional, como os inibidores de proteases, lectinas, oligossacarídeos, fitatos e saponinas (SGARBIERI, 1996; PANIZZI; MANDARINO, 1994).

O grão de soja cru possui naturalmente inibidores de proteases, como o inibidor de tripsina que inibe a ação da tripsina intestinal, estimulando a maior secreção de enzimas digestivas como a tripsina, quimotripsina e elastase, que são eliminadas nas fezes, representando uma perda endógena importante de aminoácidos sulfurados. Estas perdas podem causar alterações metabólicas que resultam até mesmo em redução de crescimento, hipertrofia e hiperplasia pancreática (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; LIENER, 1994; PEARSON, 1983).

Os grãos de soja contêm dois tipos de inibidores de tripsina, o de Kunitz e o de Bowman-Birk. Estes inibidores são sensíveis ao tratamento térmico, devido a presença de duas pontes dissulfeto na molécula do inibidor de Kunitz e de sete, no inibidor de Bowman-Birk (VEN; MATSER; BERG, 2005). Estes fatores antinutricionais são eliminados normalmente pelo tratamento térmico e sua presença é controlada nos produtos industrializados (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998).

Os fitatos representam uma complexa classe de componentes naturais que ocorrem principalmente em cereais e leguminosas e que afetam as suas propriedades funcionais e nutricionais. A maior parte dos grãos de leguminosas contém de 0,5 a 5,0% de fitato ou ácido fítico, pois podem armazenar o fósforo na forma de fitato. Os fitatos são sais do ácido fítico (mioinositol do ácido hexafosfórico – $C_6H_{18}O_{24}P_6$). Nutricionalmente, a presença de fitato é desfavorável, pois ocasiona a formação de complexos insolúveis com minerais e proteínas, diminuindo a biodisponibilidade destes nutrientes, sendo recomendado a sua remoção ou redução em produtos de soja (MAGA, 1982; KNUCKLES;

KUZMICKY; BETSCHART, 1985). O fitato pode ser eliminado utilizando-se métodos químicos ou físicos, porém estes tratamentos podem afetar as propriedades físico-químicas das proteínas (RHAM; JOST, 1979; BROOKS; MORR, 1985). Não há na literatura trabalhos avaliando o efeito do tratamento sob pressão sobre o teor de fitato.

Durante as últimas décadas têm sido desenvolvidos e estudados processos alternativos de preservação de alimentos que permitam a obtenção de produtos de características mais próximas aos dos produtos frescos, porém com a mesma segurança microbiológica dos produtos pasteurizados ou esterilizados. Uma destas técnicas é o processamento sob alta pressão que além de inativar microrganismos e enzimas, pode também alterar as estruturas proteicas, porém afetando menos as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (VEN; MATSER; BERG, 2005). Segundo Messens, Van Camp e Huyghebaert (1997), o tratamento sob alta pressão pode afetar as proteínas, alterando a sua conformação, levando assim à desnaturação, agregação ou geleificação, dependendo do sistema proteico (tipo de proteína, pH e força iônica), pressão aplicada, temperatura e duração deste tratamento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento sob alta pressão isostática, na faixa de trabalho de 200 a 700 MPa, sobre os fatores antinutricionais da proteína de soja teor de fitato e fator anti-tripsina em soluções contendo 5% de isolado proteico de soja.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Isolado proteico de soja

O isolado proteico de soja (IPS) foi obtido a partir da farinha desengordurada de soja (ProsamR®, Bunge Alimentos Ltda.), por extração alcalina (pH 8,0) seguido por precipitação a pH 4,5 e neutralização, conforme o descrito por Molina, Papadopoulou; Ledward (2001), com modificações. Após o seu preparo este

produto foi congelado em câmaras apropriadas (-18°C) e logo após liofilizado e triturado. O isolado proteico possuía a seguinte composição centesimal (em base seca): $94,65 \pm 1,70\%$ de proteína, $0,27 \pm 0,12\%$ de lipídeos e $3,32 \pm 0,07\%$ de cinzas.

2.1.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (p.a.) de várias procedências, salvo algumas especificações mencionadas nos próprios métodos.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo das amostras

Alíquotas de 50 g de dispersão de 5% de IPS (p/p), sem ajuste de pH (pH do IPS original= 6,60) foram preparadas e submetidas individualmente a pressões de 200, 300, 400, 500, 600 e 700 MPa por 20 minutos. As amostras preparadas foram embaladas em embalagens plásticas (Cryovac® W. R. Grace Ltd, Londres, Reino Unido), duplamente seladas e pressurizadas. Após o processamento sob alta pressão as amostras foram armazenadas sob refrigeração.

2.2.2. Tratamento sob alta pressão

O tratamento das amostras foi realizado em equipamento de alta pressão isostática destinado a pressurização de alimentos (Food Lab HP Rig, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido) utilizando como meio líquido para a transmissão de pressão ao alimento a mistura de óleo de rícino e etanol (20:80). As amostras foram tratadas sob alta pressão individualmente à 200, 300, 400, 500, 600 ou 700 MPa de acordo com a pressão requerida por cada amostra durante 20 minutos. O vaso de pressão foi operado via ar comprimido com mecanismo de elevação e retração do embolo, bomba de alta pressão e sistema de decompressão. A temperatura inicial do vaso de trabalho não foi alterada sendo mantida nas condições ambiente (cerca de 20,0°C).

2.2.3. Análise estatística

As médias foram comparadas com o uso da análise de variância. Os dados levantados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 5.5 da Statsoft Inc. (3225 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA).

2.2.4. Métodos analíticos

2.2.4.1. Teor de fitato

O teor de fitato foi determinado em triplicata tanto na amostra de isolado proteico de soja como nas amostras submetidas ao tratamento sob pressão (200, 300, 400, 500, 600 e 700 MPa) por 20 minutos, segundo o método de Latta e Eskin (1980) que se baseia na propriedade do fitato de quelar metais. No caso do IPS foram realizadas quatro (4) extrações e para as amostras pressurizadas foram realizadas duas (2) extrações de processamentos de bateladas diferentes. Todas as amostras foram analisadas com a mesma concentração de proteína, ou seja, 0,05 g de IPS / mL de HCl 0,65N.

Para a determinação da concentração de fitato nas amostras, foi inicialmente realizada uma curva padrão de fitato na concentração de 10 a 60 µg/mL em água desionizada (Figura C1, Anexo C), utilizando-se fitato de sódio da Sigma®(P3168), observando-se os mesmos procedimentos previstos no método adotado.

A extração do fitato das amostras foi realizada em solução de HCl 0,65N por 1 hora sendo a seguir, submetida a centrifugação a 15.000 g por 15 minutos. A solução foi filtrada em papel de filtro Whatman n.3 e alíquotas do filtrado foram diluídas em água desionizada e passadas em coluna de troca iônica pré-preparadas AG 1 – X8 resina, da Bio-Rad®, Reino Unido, para a separação do fitato. Alíquotas do 3 mL foram retiradas e foi adicionado 1 mL do reagente de Wade (0,03% FeCl₃.6H₂O e 0,3% de ácido sulfosalicílico em água desionizada) e realizada a leitura de absorbância a 500 nm em espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20, controlado pelo “software” Winlab.

2.2.4.2. Atividade de inibidor de tripsina

Foram realizadas duas extrações de cada amostra de bateladas diferentes e as determinações foram feitas em triplicata, segundo o descrito por Kakade et al. (1974), tanto da amostra de IPS quanto das amostras submetidas ao tratamento sob pressão (200, 300, 400, 500, 600 e 700 MPa) por 20 minutos.

A enzima utilizada foi a de pâncreas suíno (T 7409 E.C. 3.4.21.4, Sigma®) tendo como substrato BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitro-anilida). A atividade do inibidor de tripsina foi expressa em termos de unidades de tripsina inibida por miligrama de proteína (UTI/mg de proteína), sendo uma unidade de tripsina definida como o aumento de 0,01 unidades de absorbância a 410nm em 10 mL de reação, sob as condições utilizadas para a análise. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 20, controlado pelo “software” Winlab.

3. Resultados e Discussão

3.1. Teor de fitato

A Tabela 4.1 apresentou os valores de fitato da amostra inicial de IPS e das amostras tratadas sob alta pressão isostática. O valor inicial de fitato foi muito inferior ao relatado por Takeiti (2002) que encontrou 18,81 mg/g de proteína, porém estava próximo ao encontrado por Souza (2000), que obteve 5,44 mg/g de proteína. Pelos dados desta tabela, houve indícios que o tratamento sob alta pressão pode afetar ou alterar o teor de fitato presente em amostras de isolado proteico de soja. Porém, como foram realizadas duas extrações de cada amostra, julga-se necessário realizar novos estudos com outras concentrações de fitato inicial e maior número de repetições das análises para se chegar a um resultado mais abrangente.

TABELA 4.1 – Conteúdo de fitato (mg/g de proteína) em amostras de isolado proteico de soja (IPS) original e amostras de IPS tratadas sob alta pressão isostática (200 a 700 MPa), por 20 minutos, à temperatura ambiente.

Tratamento sob pressão das amostras de IPS (MPa)	Fitato ¹ (mg/g de proteína)
original, sem tratamento ²	3,02 ± 0,08
200 ³	Não detectado
300 ³	Não detectado
400 ³	Não detectado
500 ³	Não detectado
600 ³	Não detectado
700 ³	Não detectado

¹ Valores expressos em base seca.

² Valores médios de 4 extrações analisadas em triplicata.

³ Valores médios de 2 extrações analisadas em triplicata.

3.2. Inibidor de tripsina.

Os resultados encontrados para os teores de inibidor de tripsina foram apresentados na Tabela 4.2. Os valores obtidos para a amostra de IPS original foram de acordo aos citados por Souza (2000) que encontrou 81,4 UTI/mg de proteína para o IPS nativo e Henn e Netto (1998) que analisando o teor de inibidor de tripsina para IPSs comerciais encontram valores na faixa de 5,2 a 94,7 UTI/mg de proteína. O tratamento sob alta pressão não exerceu nenhuma influência para alterar significativamente ($p < 0,05$) estes teores em relação à amostra sem tratamento. Este resultado foi de acordo com o relatado por Ven, Matser e Berg (2005) que combinou os efeitos da alta pressão e temperatura para a inativação de inibidor de tripsina em grãos e extrato hidrossolúvel de soja, sendo que o tratamento sob alta pressão à temperatura ambiente resultou em menores ou não foram observadas reduções de atividade do inibidor de tripsina. Estes autores verificaram que a inativação do inibidor de tripsina só foi possível combinando-se o tratamento sob pressão com temperaturas mais elevadas (90% de inativação com tratamento, com menos de 2 minutos, a temperaturas entre 77 e 90°C e pressões entre 750 e 525 MPa).

Observou-se que, embora tenha havido aumento de temperatura durante o tratamento sob pressão (ver Tabela A10, Anexo A) em decorrência do efeito adiabático o aquecimento promovido não foi suficiente para afetar a atividade do inibidor de tripsina.

TABELA 4.2 – Conteúdo de Inibidor de Tripsina (UTI/mg de proteína) das amostras com isolado proteico de soja (IPS) e IPS tratados sob alta pressão isostática (200 a 700 MPa), por 20 minutos, à temperatura ambiente.

Tratamento sob pressão das amostras de IPS (MPa)	Inibidor de Tripsina ^{1, 2, 3} (UTI/mg de proteína)
Original, sem tratamento	85,18 ± 1,75 ^a
200	80,81 ± 1,05 ^a
300	86,38 ± 3,09 ^a
400	85,72 ± 2,63 ^a
500	86,21 ± 4,84 ^a
600	85,39 ± 2,86 ^a
700	88,28 ± 2,27 ^a

¹ Valores expressos em base seca.

² Valores médios de 2 extrações analisadas em triplicata.

³ Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. Conclusão

Houve indícios de que o tratamento sob alta pressão isostática seja eficiente para eliminar o fitato presente nas amostras com 5% de isolado proteico de soja em soluções aquosas (nas concentrações de até cerca de 3 mg de fitato/g de proteína), não se mostrando porém, efetivo para alterar os teores de inibidor de tripsina presentes nas amostras de isolado proteico de soja nas faixas de pressões estudadas de 200 a 700 MPa.

5. Agradecimento

À Capes/Ministério da Educação pela concessão de bolsa sanduíche na Universidade de Reading.

6. Referências Bibliográficas

BROOKS, J. R.; MORR, C. V. Effect of phytate removal treatments upon the molecular weight and subunit composition of major soy protein fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1128-1132, 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, n. 8, p. 3009-3015, 1998.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 50, n. 3, p. 376-382, 1974.

KNUCKLES, B. E. ; KUZMICKY, D. D.; BETSCHART, A. A. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on *in vitro* protein digestibility. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 4, p. 1080-1082, 1985.

LAJOLO, F. M.; TIRAPEGUI, J. Proteínas e aminoácidos. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. (org.) **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. p.40-69.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

MAGA, J. A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, n. 1, p. 1-9, 1982.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to

modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.

MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 263-269, 2001.

PANIZZI, M. C. C.; MANDARINO, J. M. G. Soybean for human consumption: nutritional quality, processing and utilization. In: **Tropical soybean: improvement and production**. FAO Plant Production and Protection Series, v. 43, n. 1, p. 165-170, 1994.

PEARSON, A. M. Soy proteins. In: HUDSON, B. J. F. (ed.). **Developments in food proteins** – vol 2. London: Applied Science Publishers Ltd, p. 67-108. 1983.

RHAM, O. de; JOST, T. Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 596-600, 1979.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SOUZA, A. S. de. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2000. 108p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

TAKEITI, C. Y. **Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2002. 102 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

VEN, C. van der; MATSER, A. M.; BERG, R. W. van den. Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1087-1092, 2005.

Capítulo 5

Efeito do tratamento sob alta pressão dinâmica sobre as propriedades funcionais tecnológicas da proteína de soja

Efeito do tratamento sob alta pressão dinâmica sobre as propriedades funcionais tecnológicas da proteína de soja

RESUMO

O isolado proteico de soja (IPS) é um produto com pelo menos 90% de proteínas que devido às suas características físico-químicas possui certas propriedades funcionais tecnológicas que influenciam a sua aceitação e utilização como ingrediente em produtos cárneos, alimentos infantis, bebidas e produtos de panificação. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento sob alta pressão dinâmica sobre as características funcionais (solubilidade e índice de atividade emulsificante) do IPS. Foram utilizados dois planejamentos fatoriais completos (2^2), um em cada faixa de pH estudada (2,80-4,20 e 5,30-6,70) cujas variáveis independentes foram o pH e o nível de pressão aplicada (80 a 220 MPa). De cada planejamento fatorial completo foram selecionados os ensaios que apresentaram as maiores respostas em cada característica funcional estudada (solubilidade e índice de atividade emulsificante) e uma amostra escolhida ao acaso e avaliadas também o teor de sulfidril livre, comportamento eletroforético, grau de desnaturação das proteínas (calorimetria diferencial de varredura - CDV), perfil cromatográfico e documentação da microestrutura. A solubilidade proteica foi fortemente influenciada pela variável pH em ambas as faixas de pH estudadas. O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi influenciado positivamente pelas variáveis pH e alta pressão, na faixa de pH 2,80-4,20. Já para a faixa de pH 5,30-6,7, o aumento de pH teve efeito negativo sobre os valores de IAE, enquanto que o aumento da pressão favoreceu o aumento de IAE. Observou-se que os maiores valores de IAE estavam próximos ao ponto isoelétrico da proteína de soja. A análise das amostras selecionadas mostrou que o tratamento sob alta pressão diminuiu drasticamente o teor de sulfidril livre de todas as amostras analisadas, evidenciando uma mudança na molécula da proteína, confirmada pelas alterações observadas nas demais análises realizadas (CDV, cromatografia, eletroforese e microscopia eletrônica).

Palavras-chave: proteína isolada de soja; alta pressão dinâmica, solubilidade; índice de atividade emulsificante.

SUMMARY

Soy protein isolate (SPI) contains at least 90% protein and its physico-chemical characteristics define some functional properties that influences its acceptance and use as an ingredient in meat products, baby foods, beverages and baking products. Simultaneous measurement of the effects of pH and dynamic high pressure treatment at room temperature on protein solubility and emulsifying activity index (EAI) of 1% of SPI were evaluated. Central composite rotatable designs (2^2) were employed over two pH ranges (2.80 to 4.20 and 5.30 to 6.70) with pH and pressure (80 to 220 MPa) as independent variables. The surface responses were obtained for protein solubility and emulsifying activity index. The samples with the highest effect on protein solubility and EAI and one other sample choose at random were evaluated as well by electrophoresis, differential scanning calorimetry (DSC), chromatography (HPLC), free sulphhydryl determination and scanning electronic microscopy (SEM). The pH was the main factor that affected protein solubility in both pH ranges. High pressure and pH positively influenced the EAI in pH range 2.80-4.20. In pH range 5.30-6.70 the increase of pH influenced negatively the EAI in opposite to the effect of high pressure whose increase supports the increase of EAI. The highest values of EAI are near to soy protein isoelectric point. The selected samples analysis showed that high pressure treatment drastically decreases the free sulphhydryl content of all analysed samples standing out a structural change confirmed by means of the other analyses (DSC, HPLC, electrophoresis and MEV).

Keywords: soy protein isolate (SPI); dynamic high pressure; protein solubility; emulsifying activity index (EAI).

1. Introdução

A tecnologia de alta pressão que promove a eliminação de microrganismos e inativa enzimas, sem expor o alimento a altas temperaturas, mostra-se como uma tecnologia viável e cada vez mais utilizada em todo o mundo para prolongar a vida-de-prateleira dos alimentos, afetando pouco o seu conteúdo de vitaminas, sabor, textura e cor. O tratamento sob alta pressão pode afetar também a funcionalidade tecnológica das proteínas, alterando a sua conformação, levando assim à desnaturação, agregação ou geleificação, dependendo do sistema proteico (tipo de proteína, pH, força iônica), pressão aplicada, temperatura e duração deste tratamento (MESSENS; VAN CAMP; HUYGHEBAERT, 1997).

Há dois métodos de processamento sob alta pressão: o isostático e o de homogeneização ou dinâmico. O método isostático, denominado também como processamento a pressão ultra alta, concentra a maior parte dos estudos já realizados e as pressões utilizadas estão na faixa de 400 a 700 MPa. O processo de alta pressão dinâmica (APD) ou contínuo é o sistema no qual dois pistões operam simultaneamente, sendo que, enquanto um é preenchido com o alimento, o outro o empurra contra a válvula de homogeneização. Esse processo baseia-se na movimentação dos fluídos e na ação de forças instantâneas que agem sobre os sólidos imersos nesses líquidos. A destruição dos microrganismos ocorre pela ruptura da célula causada pelo aumento da pressão e tensão de cisalhamento. O processo é instantâneo, ocorrendo em mili-segundos. As pressões utilizadas estão na faixa de 30 a 350MPa. O alimento deve ser embalado ao final do processo em embalagem asséptica (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003; WILLIAMS-CAMPBELL; SOLOMON, 2002; GRANT; PATTERSON; LEDWARD, 2000).

As propriedades funcionais tecnológicas têm sido definidas como qualquer propriedade dos alimentos ou de seus componentes, excetuando-se as nutricionais, que influenciam a sua aceitação e utilização (SGARBIERI, 1996). Essas dependem das propriedades físicas e químicas das proteínas, que são muito importantes para o preparo de determinados alimentos, afetando sua conservação, estocagem e aceitação pelos consumidores. Segundo Cheftel, Cuq

e Lorient (1989), as propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas em hidrofílicas, intermoleculares e interfásicas. As propriedades hidrofílicas dependem das interações proteína-água (solubilidade, capacidade de hidratação e de retenção de água, adesividade, dispersibilidade e viscosidade). As propriedades intermoleculares dependem da capacidade das interações proteína-proteína ou das moléculas de proteína com outros componentes (precipitação, geleificação, formação de fibras e pastas proteicas). Já as propriedades interfásicas ou de superfície dependem da capacidade de união das moléculas de proteínas para formarem película entre duas fases imiscíveis (tensão superficial, emulsificação e capacidade de formação de espuma).

O pH exerce forte influência sobre a funcionalidade das proteínas, visto que várias propriedades funcionais dependem do estado de ionização de grupos ionizáveis na molécula proteica e deveria ser sempre indicado em todas as descrições de métodos utilizados (HALL, 1996).

O homogeneizador de alta pressão (20 a 350 MPa) foi utilizado por Flourey, Desrumaux e Legrand (2002) para avaliar como a pressão dinâmica pode afetar a conformação da globulina da soja, analisando-se a estrutura das emulsões e reologia. Foi observado que a alta pressão dinâmica causa a desnaturação das proteínas devido a forte força mecânica do tratamento e aumento da temperatura que o material sofre ao passar pela válvula. Os tamanhos das gotículas das emulsões foram reduzidos e o comportamento Newtoniano das emulsões foi modificado para um tipo de gel nos tratamento acima de 250 MPa.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento sob alta pressão dinâmica sobre as características funcionais (solubilidade proteica e Índice de Atividade Emulsificante - IAE) do isolado proteico de soja em valores de pH na faixa de 2,80 a 4,20 e de 5,30 a 6,70. Para esta avaliação foi utilizada a metodologia de superfície de respostas em planejamentos fatoriais completos 2^2 , tendo como variáveis o pH e o nível de pressão aplicada, tendo-se fixado a concentração de IPS em 1% (p/p). Os ensaios que apresentaram as maiores respostas em cada característica funcional estudada (solubilidade e índice de

atividade emulsificante) e um ensaio escolhido aleatoriamente foram avaliados também quanto ao teor de sulfidril livre, comportamento eletroforético, grau de desnaturação das proteínas (calorimetria diferencial de varredura), perfil cromatográfico e documentação da microestrutura.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Isolado proteico de soja

O isolado proteico de soja (IPS) foi obtido a partir da farinha desengordurada de soja (ProsamR®, Bunge Alimentos Ltda.), por extração alcalina (pH 8,0) seguido por precipitação a pH 4,5 e neutralização, conforme o descrito por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001), com modificações mostradas na Figura 5.1. As etapas de centrifugação foram realizadas em centrífuga mantida à 4°C (Sorvall®, RC-5C), em rotor GS-3, com 06 frascos de 500 mL. A etapa de filtração foi realizada em funil revestido com algodão hidrófilo. Após o seu preparo este produto foi acondicionado em bandejas de inox e mantido em freezer doméstico, por cerca de 16 horas, sendo a seguir liofilizado. Após a liofilização o material foi triturado para a granulometria de 100 mesh, em moinho de laboratório Tecnal modelo 630 (Brasil), embalado em porções de 100 g em frascos bem fechados e armazenados em local seco e arejado.

2.1.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (p.a.) de várias procedências, salvo algumas especificações mencionadas nos próprios métodos.

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS) e do isolado proteico de soja (IPS).

A FDS e o IPS foram analisados quanto a sua composição centesimal. O conteúdo proteico foi determinado pelo método micro Kjeldahl (A.O.A.C., 1997). Para a conversão de nitrogênio em proteína, o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25 (SMITH; CIRCLE, 1972). O teor de gordura foi determinado pelo método de Bligh-Dyer (BLIGH; DYER, 1959), umidade por secagem em estufa e cinzas por incineração em mufla segundo os métodos da A.O.A.C. (1997). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.2. Preparo das amostras.

Foram preparadas amostras de 1200 g de dispersão de IPS em água desionizada (p/p) na concentração de 1% de IPS, nas duas faixas de pH estudadas (abaixo e acima do ponto isoelétrico da proteína de soja - pI), conforme o especificado na Tabela 5.1. O pH foi ajustado pela adição de soluções 0,2 ou 2N de HCl ou NaOH, conforme o caso. As amostras preparadas foram passadas pelo equipamento de alta pressão e foram recolhidas alíquotas de 150 mL para a execução das análises. As amostras foram embaladas em frascos plásticos fechados e armazenadas sob refrigeração por, no máximo, 2 dias.

2.2.3. Tratamento sob alta pressão

O tratamento das amostras foi realizado em equipamento de alta pressão dinâmica destinado a pressurização de alimentos (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido), com velocidade de fluxo de 250 mL/min. e pressão máxima de trabalho não inferior a 320 MPa, munido de sistema duplo sincronizado de elevação e transmissão de pressão, válvula de homogeneização, intensificador de pressão de pulsos prolongados e um trocador de calor que permite a saída do fluido à temperatura ambiente. O equipamento conta com três termopares para controle de temperatura, colocados nos seguintes pontos:

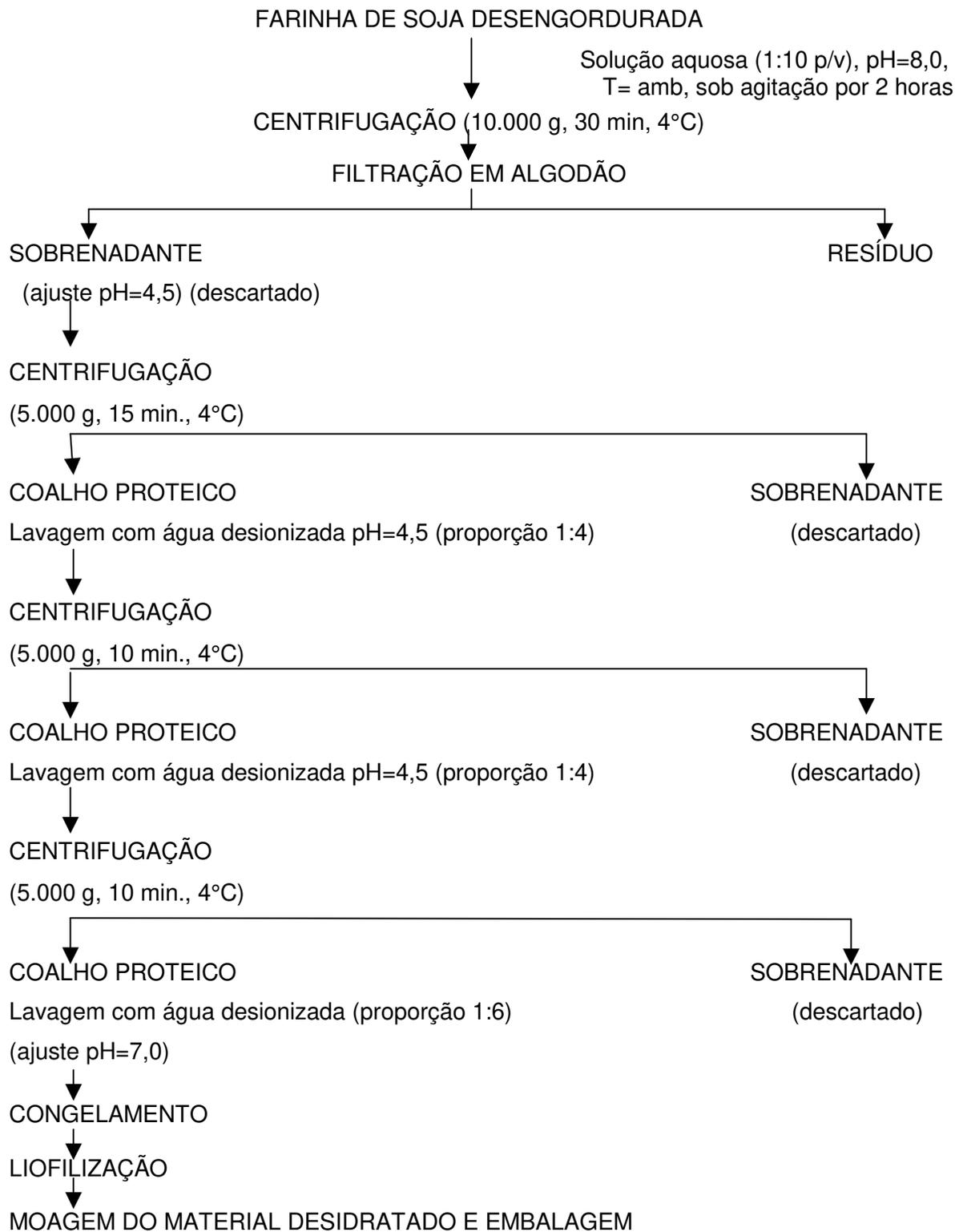


FIGURA 5.1 – Fluxograma de produção do isolado proteico de soja.

- 1 – Entrada da válvula de homogeneização;
- 2 - Saída da válvula de homogeneização /entrada do trocador de calor;
- 3 – Saída do trocador de calor.

Adicionalmente foi colocado um outro termopar no ambiente para controlar a temperatura no momento do processamento.

As amostras foram tratadas sob alta pressão de acordo com a pressão requerida em cada ensaio (Tabela 5.1) durante o tempo necessário para recolher alíquotas de 150 mL de amostra de cada ensaio. Após o processamento dos ensaios, o sistema foi limpo com água, álcool, solução de NaOH 2,5% (p/v) e mantido em imersão em álcool. A temperatura inicial de trabalho não foi alterada, sendo mantida nas condições ambientais (cerca de 23,0°C). O registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão está documentado nas Tabelas A11, A12, A13 e A14 (Anexo A).

2.2.4. Análise estatística

Para a avaliação do tratamento sob pressão dinâmico sobre as proteínas da soja foram montados e executados dois delineamentos composto central rotacional (2^2), incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, em duas diferentes faixas de pH (2,80 – 4,20 e 5,30 – 6,70), totalizando 11 ensaios cada, conforme mostra a Tabela 5.1. As variáveis independentes foram o pH e o nível de pressão aplicada (80 a 220 MPa). A distância dos pontos axiais foi de $\pm 1,41$, calculada conforme o descrito por Rodrigues e lemma (2005). Em todos os experimentos realizados, a concentração de IPS foi fixada em 1% e o tempo de processo foi o suficiente para recolher 150 mL de material na saída do equipamento. Foi utilizada a metodologia de superfícies de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995) para o planejamento e análise dos resultados.

Todos os experimentos foram realizados de maneira aleatória. As respostas solubilidade proteica e IAE foram descritas por um modelo de segunda ordem e examinadas em termos de ajuste do modelo através de Análise de Variância

(ANOVA). Os dados levantados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 5.5 da Statsoft Inc. (3225 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). Este mesmo programa também foi utilizado para a comparação das médias de alguns resultados experimentais por análise de variância e quando diferentes, pelo Método de Tukey (COCKRAN; COX, 1957).

TABELA 5.1 – Delineamento Experimental Fatorial Completo (2^2) para o sistema contendo 1% de isolado proteico de soja, processado sob alta pressão dinâmica.

Variável independente	Nível codificado				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Experimento I					
pH	2,80	3,00	3,50	4,00	4,20
Nível de pressão (MPa)	80	100	150	200	220
Experimento II					
pH	5,30	5,50	6,00	6,50	6,70
Nível de pressão (MPa)	80	100	150	200	220

2.2.5. Métodos analíticos

Todas as amostras dos ensaios tratadas sob alta pressão dinâmica foram analisadas quanto à solubilidade proteica e Índice de Atividade Emulsificante (IAE). Foram coletados também dados reológicos, no entanto, após a análise destes dados (determinação de G' e G''), estes tiveram que ser eliminados, pois não se mostraram coerentes devido à falta de sensibilidade do equipamento utilizado (viscosímetro Haake, modelo CV 20N, RC 20, com placas paralelas de 45 mm e distância entre as placas de 1 mm) para este tipo de amostra. As amostras que apresentaram em cada delineamento composto central rotacional os maiores valores de solubilidade e IAE e uma amostra adicional, escolhida aleatoriamente, tendo-se assim, 3 amostras selecionadas em cada experimento, num total de 6 amostras, foram também analisadas quanto ao teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica. As amostras selecionadas foram especificadas na

Tabela 5.2 e foram armazenadas sob refrigeração após o tratamento sob alta pressão. No caso específico das análises de microscopia eletrônica, calorimetria diferencial de varredura e cromatografia, as amostras após o tratamento sob alta pressão foram congeladas e posteriormente liofilizadas e trituradas.

O IPS original também foi submetido à análise de solubilidade proteica, IAE e teor de sulfidril livre, cromatografia e microscopia eletrônica antes do tratamento sob alta pressão. As amostras de IPS foram analisadas em triplicata no mesmo dia de sua preparação. As amostras referentes a cada ensaio experimental foram preparadas e analisadas em uma única amostra e as determinações realizadas em duplicata ou triplicata, conforme o caso. As amostras submetidas ao tratamento sob pressão foram armazenadas sob refrigeração e analisadas no período máximo de 2 dias após o seu processamento. As amostras selecionadas foram preparadas sempre que necessário para atender ao cronograma das análises realizadas.

TABELA 5.2 – Amostras selecionadas a partir dos experimentos completos I e II para a execução das análises de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese, análises cromatográficas e microscopia eletrônica de varredura.

Experimento/ Ensaio	pH	Nível de Pressão (MPa)
Experimento I		
5	2,80	150
6	4,20	150
11	3,50	150
Experimento II		
2	6,50	100
3	5,50	200
6	6,70	150

2.2.5.1. Solubilidade proteica em água

A porcentagem de solubilidade proteica em água foi determinada segundo o proposto por Morr et al. (1985) com modificações. A concentração de proteína na amostra foi padronizada e fixada em 0,01g de IPS/mL de água e a proteína solúvel dosada segundo o método BCA (“Bicinchoninic acid protein assay”) proposto por Owusu-Apenten (2002), utilizando para isto o kit da Sigma® (BCA-1 e B9643) com o protocolo de 2,1 mL. A quantidade de proteína solúvel foi calculada através das curvas de calibração levantadas (Anexo B) que determinam a quantidade de proteína presente na amostra analisada e da relação entre a quantidade de proteína adicionada e presente na amostra.

2.2.5.2. Índice de Atividade Emulsificante

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi determinado pelo método espectrofotométrico de Pearce e Kinsella (1978), acrescido de informações extraídas de Hill (1996) e Molina, Papadopoulou e Ledward (2001), com modificações. A concentração de proteína na amostra foi padronizada e fixada em 0,005g de IPS/mL de água. As emulsões foram formadas por 10 mL da solução proteica e 30 mL de óleo de milho (marca Liza®, Brasil). Esta mistura foi agitada em homogeneizador Turrax® a 10.000 rpm por 30 segundos. A absorbância da solução de emulsão diluída (1:500) e do branco (solução de SDS 0,1%) foram imediatamente determinadas pela leitura em espectrofotômetro (Beckman DU-70, Beckman Instruments Inc., EUA), a 500nm. A solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi preparada com SDS com grau de pureza de 99,5%, marca Sigma®, sendo esta solução mantida sob temperatura ambiente. A turbidez da amostra (T), a fração de volume de óleo e o IAE foram determinados conforme as equações mencionadas por Hill (1996) e Molina, Papadopoulou e Ledward (2001).

2.2.5.3. Determinação do conteúdo de sulfidril livre

Os teores de sulfidril livre foram determinados no IPS original e nas amostras selecionadas (Tabela 5.2), segundo o descrito por Beveridge, Toma e Nakai

(1974) com as modificações propostas por Hardham (1981). As amostras foram analisadas em duplicata e as determinações realizadas em triplicata. Foram dissolvidas 10 mg de amostra em 10 mL de tampão TRIS-glicina (pH 8.00), contendo 8M de uréia. À dispersão foi adicionado 100 µL do Reagente de Ellman (4 mg de ácido 2,2' dinitro-5,5'ditiodibenzoico – DTNB dissolvido em 1 mL de tampão TRIS-glicina). Decorridos 30 minutos, as dispersões foram filtradas em membrana Millipore® 0,45µm, sendo tomadas alíquotas para a realização da leitura de absorvância em espectrofotômetro (Beckman DU-70, Beckman Instruments Inc., EUA), a 412 nm contra o branco (10 mL do tampão TRIS-glicina (8M de uréia) e 100 µL do Reagente de Ellman). Para a determinação da quantidade de sulfidril livre nas amostras analisadas, utilizou-se a seguinte relação (Equação 5.1):

$$\mu\text{moles/g amostra} = \frac{735,3 \times \text{Abs (412 nm)}}{\text{Peso amostra(mg)}} \quad \text{Equação 5.1}$$

2.2.5.4. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)

Os termogramas foram obtidos, conforme o descrito por Molina, Defaye e Ledward (2002), utilizando um analisador Perkin Elmer DSC-7 calibrado com indium (faixa de 130 a 170°C) e zinco (faixa de 400 a 450°C). As amostras selecionadas (Tabela 5.2), na concentração de 20% (p/p), foram precisamente pesadas (20 a 25 mg) e colocadas diretamente em cápsulas de alumínio hermeticamente seladas. As amostras foram aquecidas de 30 a 100°C na velocidade de 5°C/minuto, utilizando uma cápsula vazia como referência. As leituras de entalpia (ΔH) e da temperatura de desnaturação (T_d) foram obtidas em duplicatas diretamente no analisador utilizado e analisadas através do “software Pyris Series” (1998), “Thermal Analysis System”, da Perkin Elmer.

2.2.5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

O perfil cromatográfico foi determinado apenas para as amostras selecionadas (Tabela 5.2) utilizando-se a técnica de CLAE-FR, de acordo com Bietz (1983),

utilizando-se solução de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água Milli-Q como solvente A e 100% de acetonitrila como solvente B. Esses solventes foram previamente filtrados em membrana de 0,45 µm de poro, com 47mm de diâmetro (PVDF, ref. HVLP 04700, Millipore®, Brasil) e submetidos a tratamento com ultrassom para eliminação das bolhas de ar antes de serem bombeados na coluna.

Primeiramente, as amostras foram padronizadas para a concentração de 0,02 g de IPS/mL com água Milli-Q, sendo a seguir estas soluções filtradas em filtro de 0,45 µm de poro (HV Millex®, em polietileno com membrana Durapore®, 13mm de diâmetro, não estéril, Millipore®, Brasil) e injetados 100µL em coluna C-18 (Modelo Ultracarb, 5µOSD20, com 150mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, 5µm de tamanho de partícula, Phenomenex, EUA). Os solventes foram alimentados utilizando bomba LC 10 AT, Forno CTO-10AS, em cromatógrafo Shimadzu com detector UV/Vis SPD-10A, interface SCL-10A (Japão). As condições da corrida obedeceram a um gradiente linear de 20-65% do solvente B, durante 60 minutos. O fluxo foi de 1,0 mL/min, com detecção à 280 nm. Após cada análise, a coluna foi retornada às condições iniciais para equilibrá-la através de um gradiente linear (65-20% do solvente B) por 10 minutos.

2.2.5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A determinação do perfil eletroforético das proteínas totais foi conduzida em gel de poliacrilamida adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS), em condições redutoras, denominado como SDS-PAGE e sem a adição SDS denominado Native PAGE, segundo o descrito por Laemmli (1970). A concentração total do monômero (%T) no gel de empacotamento foi de 4% e do gel de separação de 12%, sendo a concentração do “crosslinking” (%C) nos dois casos de 2,67%. As amostras selecionadas estavam na concentração de 1% de IPS em água desionizada e foram diluídas na proporção 1:1 com tampão redutor com SDS (62,5 mM Tris-HCl, 20% de glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, pH 6,8). As amostras diluídas foram imersas em água em ebulição por 3 minutos sendo a

seguir resfriadas (somente para SDS PAGE). Alíquotas de 15 μ L de cada amostra foram aplicadas ao gel.

A eletroforese foi conduzida em tampão (0,025M Tris, 0,192M glicina, 0,1% SDS, pH 8.3) a 120V. A coloração dos géis foi realizada em solução aquosa com 0,1% de cosmassie brilhante G-250, 40% de metanol e 10% de ácido acético. Os géis foram descorados em solução aquosa contendo 10% de ácido acético e 40% de metanol. Foram utilizados marcadores de pesos moleculares comerciais na faixa de 14.400 a 97.400 Da da Bio-Rad® (Ref. 161-0304). Após o descoramento os géis foram imediatamente secos em solução de gelatina e documentados.

2.2.5.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a observação ao MEV, as amostras selecionadas (Tabela 5.2) foram separadas em duas porções distintas, uma antes do tratamento sob pressão e outra após o tratamento sob pressão. Estas amostras foram preparadas e liofilizadas e trituradas para observação ao MEV. As amostras foram espalhadas sobre “stubs” de alumínio preparado com adesivo de carbono e revestidas com pó de ouro sob vácuo. A observação foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura submetido a alto vácuo (Jeol – JSM – 5800 LV Scanning Microscope, Japão), aceleração de voltagem de 10 kV, equipado com programa ARC 58 Jeol Jus versão 2.2 1996-1997 para a visualização das imagens.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS), produção do isolado proteico de soja (IPS) e sua caracterização.

A Tabela 5.3 mostrou os valores das quantidades de farinha desengordurada de soja utilizadas e o rendimento em isolado proteico de soja durante a sua preparação e liofilização. Estes valores revelaram que o rendimento para o preparo de IPS a partir da FDS foi de aproximadamente 29%, semelhante ao obtido no Capítulo 2 (27%). Este valor foi próximo ao obtido por Souza (2000) que foi de 26,57% e os mencionados por Singh, Singh e Chauhan (1994) que

encontraram rendimentos de IPS em massa de farinha seca na faixa de 24,3 a 41,5%.

TABELA 5.3 – Preparo do isolado proteico de soja.

Batelada	Quantidade de FDS (g)	Massa após 1 ^a lavagem (g)	Massa após 2 ^a lavagem (g)	Massa final de coalho (g)	Massa IPS após liofilização (g)
1	120	114,43	94,41	87,21	35,24
2	200	187,18	154,31	150,72	52,42
3	280	250,11	216,48	206,05	82,13
4	160	141,71	116,01	104,96	43,23
5	270	255,15	214,54	200,00	83,58
6	280	266,42	214,59	198,05	80,02
7	280	271,42	227,21	212,45	81,68
8	280	275,96	230,00	214,14	86,58
9	280	268,71	222,87	210,46	83,60
10	280	263,29	220,44	214,27	82,47
11	280	268,28	227,65	218,00	87,53

A composição centesimal da farinha desengordurada de soja (FDS) e do isolado proteico de soja produzido foram apresentados na Tabela 5.4.

TABELA 5.4 – Composição centesimal média da farinha desengordurada de soja e do isolado proteico de soja.

Determinação	Amostra	Farinha desengordurada de soja	Isolado proteico de soja
	% Proteína ^{1,2,3}		54,40 ± 0,21
% Lipídeos ^{1,3}		2,26 ± 0,07	1,38 ± 0,02
% Cinzas ^{1,3}		6,66 ± 0,07	3,26 ± 0,04
% Umidade ¹		6,20 ± 0,01	6,04 ± 0,03

¹ Valores médios de três determinações ± desvio padrão;

² N x 6,25;

³ Valores expressos em Base Seca.

Os valores de proteína e umidade encontrados para FDS foram inferiores aos obtidos por Souza (2000) e Takeiti (2002) que apresentaram respectivamente valores de 57,9% e 68,74% de proteína e 7,46% e 8,56% de umidade, porém os valores de proteína foram superiores aos encontrados por García et al. (1998) que obteve 46,5%. Os valores de lipídeos encontrados foram superiores aos encontrados por Souza (2000) e Takeiti (2002) que obtiveram respectivamente 1,84% e 1,59%, utilizando o mesmo método de determinação. Os valores de cinzas estão próximos aos obtidos por Takeiti (2002) e Souza (2000) que encontraram respectivamente 6,29% e 5,98%.

Os valores de proteína encontrados para o isolado proteico de soja foram semelhantes aos obtidos por Takeiti (2002) e Souza (2000) que encontraram respectivamente 96,88% e 96,90% para o IPS nativo. Os valores de cinzas foram compatíveis com os valores obtidos por Souza (2000) e Takeiti (2002) que obtiveram respectivamente valores de 2,65% e 3,22%. Os valores de umidade foram superiores em cerca de 2% aos obtidos por Souza (2000) e Takeiti (2002), porém esta diferença pode ser atribuída ao processo de liofilização da proteína. No caso da análise de lipídeos o valor encontrado foi inferior ao encontrado por Souza (2000) e Takeiti (2002) que encontraram respectivamente valores de 2,07% e 2,39%, utilizando o mesmo método de análise.

A Tabela 5.5 apresentou os valores de solubilidade proteica das amostras de IPS obtidas pelo método de determinação de proteínas por Kjeldahl e utilizando o método de BCA. Como estes valores não diferiram significativamente ao nível de 5% e sendo o método de BCA mais rápido de se realizar do que o método de Kjeldahl, adotou-se a partir destes resultados, apenas o método de BCA para a determinação do teor de proteína solúvel (análise de solubilidade proteica) para todas as amostras analisadas. O valor de solubilidade proteica para o IPS foi próximo ao obtido por Souza (2006) que foi de cerca de 88% e ao relatado por Wagner e Añon (1990) que variou entre 47,2 a 83,6% a pH 7,0.

TABELA 5.5 – Comparação entre os métodos de determinação de proteína solúvel.

Amostra de IPS	Determinação de proteína para cálculo da solubilidade	
	Método de Kjeldhal ¹	Método BCA ²
% de solubilidade proteica ³	94,87 ± 0,30 ^a	91,42 ± 5,01 ^a

¹ média de três determinações, realizadas em triplicata ± desvio padrão, pH da solução de IPS=6,8.

² média de duas determinações analisadas em duplicata ± desvio padrão, pH da solução de IPS=6,8.

³ valores com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

O IPS original apresentou valor médio de IAE de $88,93 \pm 4,12 \text{ m}^2/\text{g}$ (média de duas amostras, com três determinações cada), que é um pouco inferior ao encontrado no Capítulo 2 e ao relatado por Souza (2006) e Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) que foi de cerca de $100 \text{ m}^2/\text{g}$.

3.2. Ensaios experimentais

Os valores obtidos para as respostas solubilidade proteica e IAE nos Experimentos I e II foram expostos respectivamente nas Tabelas 5.6 e 5.7.

3.2.1. Solubilidade proteica

A Figura 5.2 mostrou a influência das variáveis estudadas (pH e pressão aplicada) sobre a resposta solubilidade proteica para os Experimentos I e II. Nas faixas de menores valores de pH (Figuras 5.2a e 5.2b) observou-se a forte influência da variável pH sobre a resposta solubilidade, tendo esta um efeito negativo, isto é, a medida em que se aumentou o pH diminuiu-se a solubilidade proteica, para a faixa de pH estudada (2,8 a 4,2). O maior valor de solubilidade proteica foi observado na faixa de $\text{pH} < 3,00$. Para o Experimento II (Figuras 5.2c e 5.2d) foi observado que os valores de solubilidade proteica aumentaram à medida que aumentou o pH e atingiu valores máximos (dentro da faixa de pH estudada: 5,3 a 6,7) para os maiores valores de pH ($\text{pH} > 6,5$). Se o $\text{pH} > 3,5$ ou $\text{pH} < 5,5$ a solubilidade proteica é bem baixa. Este comportamento pode ser atribuído ao conhecido fenômeno de agregação proteica próximo ao ponto isoelétrico (pH 4,2 a 4,6), sendo que a

solubilidade proteica aumenta em valores de pH abaixo ou acima do pI (HETTIARACHCHY; KALAPATHY, 1999).

TABELA 5.6 - Resultados do Experimento I (Delineamento Composto Central).

Ensaio	pH	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	Aspecto visual da amostra ²
1	-1 (3,00)	-1 (100)	74,45	82,45	Homogênea, translúcida, bege.
2	+1 (4,00)	-1 (100)	6,87	81,26	Separação de fases com pequenos precipitados, branca.
3	-1 (3,00)	+1 (200)	71,43	68,59	Homogênea, translúcida, bege.
4	+1 (4,00)	+1 (200)	3,42	290,11	Separação de fases com pequeníssimos precipitados, branca.
5	-1,41 (2,80)	0 (150)	79,62	90,65	Homogênea, translúcida, bege.
6	+1,41 (4,20)	0 (150)	2,67	441,32	Separação de fases com pequenos precipitados, branca.
7	0 (3,50)	-1,41 (80)	29,04	77,53	Homogênea, opaca e branca.
8	0 (3,50)	+1,41 (220)	37,99	54,70	Homogênea, opaca e branca.
9	0 (3,50)	0 (150)	30,62	73,35	Homogênea, opaca, branca, com espuma.
10	0 (3,50)	0 (150)	28,81	85,13	Homogênea, opaca, branca, com espuma.
11	0 (3,50)	0 (150)	36,35	83,45	Homogênea, opaca, branca, com espuma.

¹ Valores expressos em média das determinações;

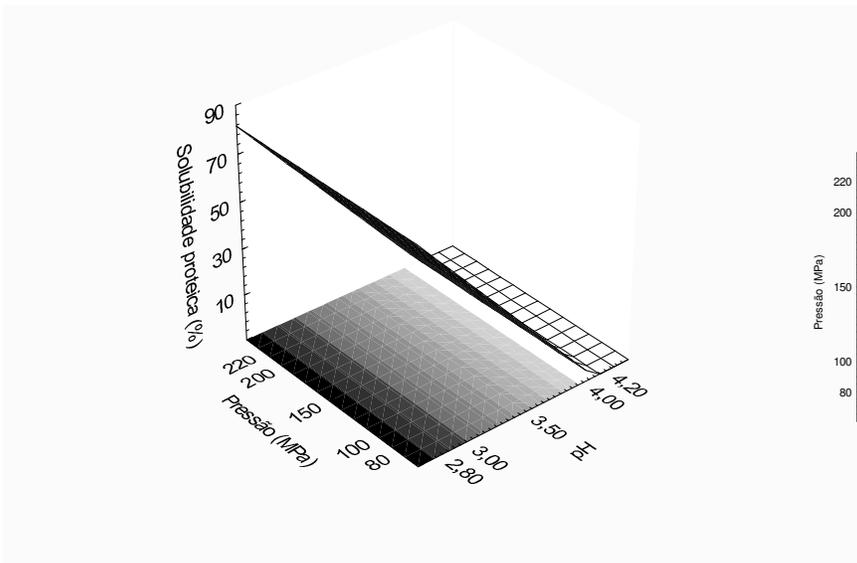
² após tratamento sob alta pressão.

TABELA 5.7 - Resultados do Experimento II (Delineamento Composto Central).

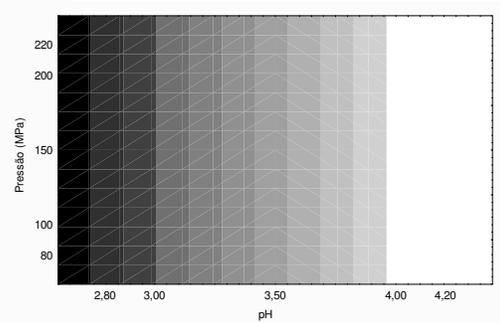
Ensaio	pH	Pressão (MPa)	Solubilidade (%) ¹	IAE (m ² /g) ¹	Aspecto visual da amostra ²
1	-1 (5,50)	-1 (100)	7,27	61,35	Branca, com separação de fases, opaca, com pequeníssimos precipitados.
2	+1 (6,50)	-1 (100)	93,08	68,45	Homogênea, bege, ligeira translucidez.
3	-1 (5,50)	+1 (200)	7,12	119,38	Separação em três fases: precipitado branco no fundo, material líquido e translúcido no centro de cor bege e precipitado branco na superfície.
4	+1 (6,50)	+1 (200)	77,39	69,69	Homogênea, translúcida, bege.
5	-1,41 (5,30)	0 (150)	5,53	83,88	Separação em três fases: precipitado branco no fundo, material líquido bege no centro e leve precipitado branco na superfície.
6	+1,41 (6,70)	0 (150)	80,58	54,41	Homogênea, translúcida, bege.
7	0 (6,00)	-1,41 (80)	64,75	56,41	Homogênea, opaca, bege.
8	0 (6,00)	+1,41 (220)	59,54	71,26	Homogênea, opaca, bege.
9	0 (6,00)	0 (150)	64,98	83,23	Homogênea, opaca, levemente branca.
10	0 (6,00)	0 (150)	64,02	77,26	Homogênea, opaca, levemente branca.
11	0 (6,00)	0 (150)	67,72	81,76	Homogênea, opaca, levemente branca.

¹ Valores expressos em média das determinações;

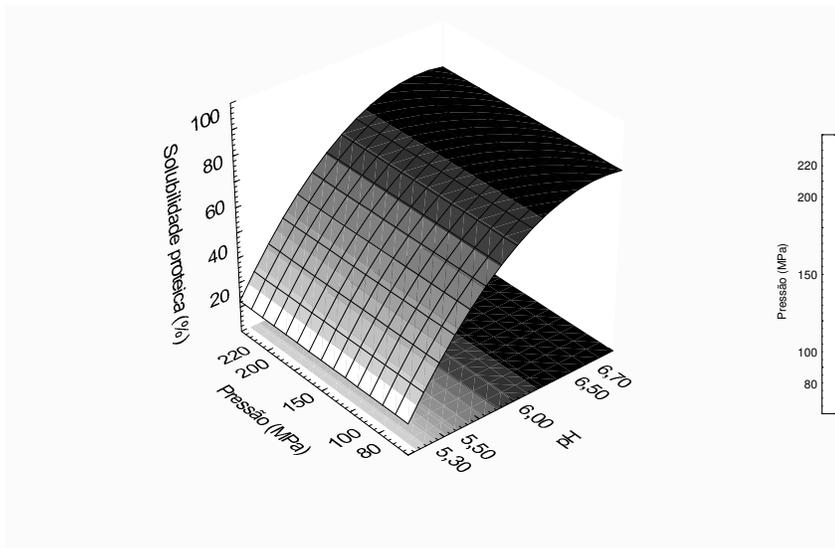
² após tratamento sob alta pressão.



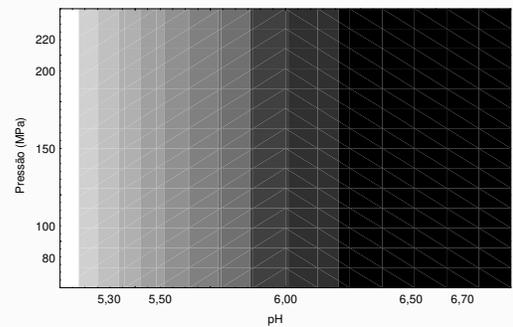
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 5.2 – Superfícies de resposta (a e c) e curvas de contorno (b e d) para a solubilidade proteica em função das variáveis pH e alta pressão para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d).

As Tabelas 5.8 e 5.9 mostram respectivamente os coeficientes de regressão linear e a Análise de Variância (ANOVA) para a resposta solubilidade proteica no Experimento I em função das variáveis estudadas (pH e pressão aplicada). Pelo exposto na Tabela 5.8, apenas os termos média e pH linear foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os termos que não se mostraram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 5.9). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (31,34) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (37,18) não é significativo ($p > 0,05$) e sendo muito boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 96%), foi possível concluir que o modelo de primeira ordem obtido se ajustou muito bem aos dados experimentais. Valores de R^2 acima de 0,90 são considerados como muito bons (BURKERT et al., 2005). O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,40%). A equação codificada (Equação 5.2) que expressou a solubilidade proteica em função das variáveis estudadas para o Experimento I foi:

$$\text{Solubilidade proteica} = 36,48 - 30,55 \text{ pH} \quad (\text{Equação 5.2})$$

No Experimento II (Tabela 5.10) somente os termos média, pH linear e pH quadrático foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$) para a resposta solubilidade proteica. Os demais termos que não se mostraram estatisticamente significativos ($p > 0,01$) foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 5.11). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (63,19) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (26,76) não foi significativo ($p > 0,05$) e sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 94%, semelhante à obtida no Experimento I), pôde-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou muito bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,07%). A equação codificada (Equação 5.3) que expressou a solubilidade proteica em função das variáveis estudadas para o Experimento II foi:

$$\text{Solubilidade proteica} = 62,46 + 32,78(\text{pH}) - 11,88(\text{pH})^2 \quad (\text{Equação 5.3})$$

TABELA 5.8 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média	31,93*	2,2725	14,0488	0,005028	22,1487	41,7046
pH (L)	-30,55*	1,3916	-21,9537	0,002068	-36,5395	-24,5639
pH (Q)	5,04	1,6564	3,0411	0,093249	-2,0896	12,1642
Pressão (L)	0,77	1,3916	0,5557	0,634255	-5,2144	6,7612
Pressão (Q)	1,22	1,6564	0,7379	0,537397	-5,9046	8,3492
1L x 2L	-0,11	1,9681	-0,0546	0,961405	-8,5755	8,3605

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= pH; 2= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 5.9 – Análise de variância (ANOVA) do Experimento I do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	1	954643,7	954643,70	31,34	10,56*
Resíduo	9	274164,3	30462,70		
Fator de ajuste	7	272073,4	38867,63	37,18	19,35**
Erro Puro	2	2090,9	1045,45		
Total	10	1228808,0			

% variação explicada (R^2) = 95,88%. *F_(1, 9; 0,01) e **F_(7, 2; 0,05)

TABELA 5.10 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta solubilidade proteica.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média	65,57*	1,1085	59,1533	0,000286	60,8037	70,3430
pH (L)	32,78*	0,6788	48,2843	0,000429	29,8563	35,6979
pH (Q)	-12,86*	0,8080	-15,9107	0,003927	-16,3319	-9,3790
Pressão (L)	-2,90	0,6788	-4,2735	0,050633	-5,8218	0,0198
Pressão (Q)	-3,31	0,8080	-4,0972	0,054726	-6,7868	0,1660
1L x 2L	-3,89	0,9600	-4,0468	0,055984	-8,0156	0,2456

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= pH; 2= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

TABELA 5.11 – Análise de variância (ANOVA) do Experimento II do modelo estatisticamente válido (erro puro) para a resposta solubilidade proteica.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	2	9467,43	4.733,71	63,19	8,65*
Resíduo	8	599,26	74,91		
Fator de ajuste	6	591,88	98,65	26,76	19,33**
Erro Puro	2	7,37	3,68		
Total	10	10.066,69			

% variação explicada (R^2) = 94,05%. *F_(2, 8; 0,01) e **F_(6, 2 ; 0,05)

Como foi observado na Figura 5.2 e nas Equações 5.2 e 5.3, o tratamento sob pressão não teve influência sobre a resposta solubilidade proteica como já relatado por outros autores. Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) estudaram a influência do tratamento sob alta pressão isostática nas globulinas 7S e 11S e nos IPS a pH 7,5 and pH 6,5 e relataram que o tratamento sob alta pressão isostática não exerceu grande influência sobre a solubilidade proteica nos valores de pH estudados, com exceção da globulina 11S a pH 7,5. Apichartsrangkoon (2003) tratou concentrado de soja a 80% de umidade sob pressões isostáticas de 200 e 800 MPa, por 50 min. a 20°C e não encontrou grandes alterações nos valores de solubilidade entre os tratamentos aplicados. No entanto, Puppo et al. (2004), trabalharam com IPS a pH 8 e a pH 3 e tratamento sob alta pressão isostática e observaram que em pH 8 a solubilidade proteica sofre um ligeiro aumento à 200 MPa, ficando estável entre 200 e 400 MPa. Já o IPS pH 3 aumentou a solubilidade nos tratamentos entre 200 e 400 MPa.

De maneira geral, os valores de solubilidade proteica foram maiores na faixa de pH próximo da neutralidade (Experimento II). Na faixa de pH ácido (Experimento I) o maior valor de solubilidade proteica observado foi de 79,62% (Tabela 5.6) que é cerca de 13% menor do que o observado para o IPS original (91,42% – Tabela 5.5). Na faixa de pH próximo à neutralidade o maior valor de solubilidade proteica após o tratamento sob alta pressão foi de 93,08% (Tabela 5.7), o que significa um aumento de 1,8% em relação à solubilidade proteica do IPS original.

3.2.2. Índice de Atividade Emulsificante (IAE)

A Figura 5.3 mostrou a influência das variáveis estudadas (pH e pressão aplicada) sobre a resposta IAE para os Experimentos I e II. Nos valores mais baixos de pH (Figura 5.3a e 5.3b) tanto o pH como a alta pressão influenciaram positivamente os valores de IAE, isto é, o aumento do pH e pressão aplicada favoreceram o aumento dos valores de IAE. Já para o Experimento II, onde o pH era mais elevado (5,30 a 6,70) do que no Experimento I, o aumento de pH teve efeito negativo sobre os valores de IAE, enquanto que o aumento da pressão favoreceu

o aumento de IAE (Figura 5.3c e 5.3d). Observou-se que os maiores valores de IAE foram próximos aos ponto isoelétrico da proteína de soja (Figura 5.3), que foi um comportamento semelhante ao exibido no Capítulo 2, nas mesmas faixas de pH quando se observa os gráficos de pH x pressão aplicada para a resposta IAE (Figura 2.3b e 2.3d).

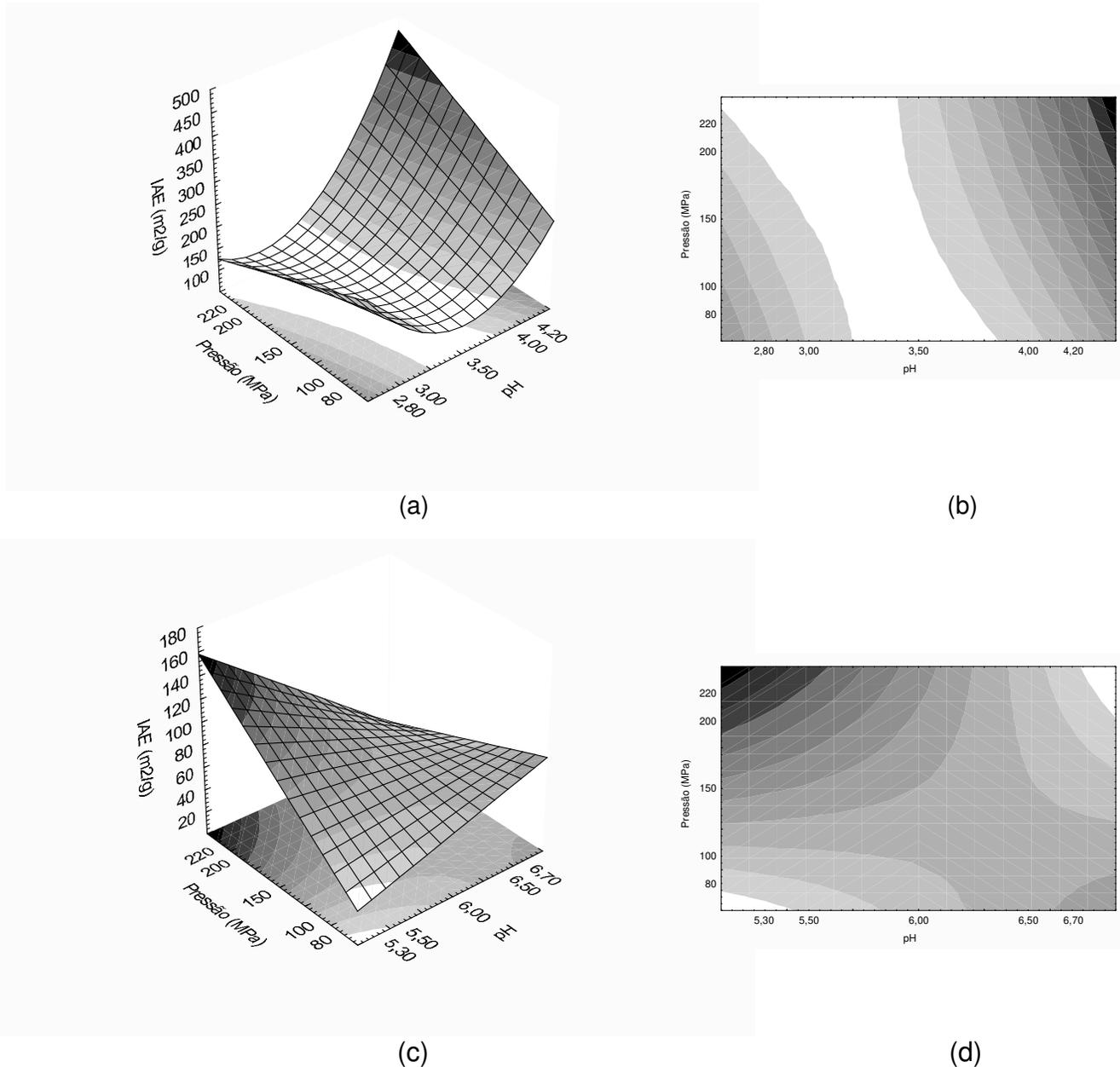


FIGURA 5.3 – Superfícies de resposta (a e c) e curvas de contorno (b e d) para o IAE em função das variáveis pH e alta pressão para o Experimento I (a e b) e Experimento II (c e d).

A Tabela 5.12 exibiu os coeficientes de regressão para a resposta IAE obtida no Experimento I. Neste Experimento, apenas o termo pressão quadrática não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) para a resposta IAE, sendo este termo incorporado aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 5.13). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (10,15) foi significativo ($p < 0,01$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (94,31) não foi significativo ($p > 0,01$) e sendo boa a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 87%), pôde-se concluir que o modelo de segunda ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais foi baixo (cerca de 0,07%). A equação codificada de segunda ordem (Equação 5.4) que expressou o IAE em função da concentração de IPS, pH e pressão aplicada para o Experimento I foi:

$$\text{IAE} = 61,33 + 89,53(\text{pH}) + 20,34(\text{pressão}) + 91,31(\text{pH})^2 + 55,67(\text{pH})(\text{pressão})$$

(Equação 5.4)

Na faixa de pH ácido (Experimento I), observou-se pela Equação 5.4 e Figura 5.3 (a, b) que a variável pressão influenciou pouco o aumento dos valores de IAE, sendo a variável pH preponderante. Os valores de IAE foram mínimos para os valores médios de pH. Pelos resultados da Tabela 5.6, o maior valor de IAE (441,32 m^2/g) no Experimento I foi obtido pelo ensaio 6, no qual foi aplicada o valor médio de pressão (150MPa), pH (4,20 próximo ao pI), tendo-se fixado a concentração de IPS em 1%. Este valor foi semelhante ao maior valor obtido no Experimento I do capítulo 2 (434,49 m^2/g), no qual a concentração de proteína era de 1% de IPS, pH igual a 4,00 a pressão isostática aplicada de 300 MPa. Este fato indicou que o tipo de tratamento sob alta pressão (isostático ou dinâmico) pode não exercer influência determinante sobre os valores de IAE, visto que a própria variável pressão influenciou pouco os valores de IAE.

TABELA 5.12 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento I) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	72,84*	4,1303	17,6343	0,003200	55,0638	90,6063
pH (L)	89,53*	2,5293	35,3984	0,000797	78,6501	100,4154
pH (Q)	87,71*	3,0104	29,1363	0,001176	74,7606	100,6665
Pressão (L)	20,34*	2,5293	8,0409	0,015117	9,4550	31,2203
Pressão (Q)	-12,22	3,0104	-4,0600	0,055650	-25,1755	0,7304
1L x 2L	55,67*	3,5770	15,5648	0,004102	40,2840	71,0648

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= pH; 2= pressão aplicada.

*Coeficientes estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

TABELA 5.13 – Análise de variância (Anova) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento I.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	4	131.375,73	32.843,93	10,15	9,15*
Resíduo	6	19.410,47	3.235,08		
Fator de ajuste	4	19.308,11	4.827,03	94,31	99,25**
Erro Puro	2	102,36	51,18		
Total	10	150.786,20			

% variação explicada (R^2) = 87,13%. * $F_{(4, 6; 0,01)}$ e ** $F_{(4, 2; 0,01)}$

No Experimento II, os termos quadráticos de pH e pressão não foram significativos ($p > 0.05$) para a resposta IAE (Tabela 5.14). Estes termos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabela 5.15). Observou-se que o termo pressão quadrática também não se mostrou estatisticamente significativo ($p > 0.05$) no Experimento I, indicando que a pressão exerceu pouca influência sobre os valores de IAE nas condições estudadas. Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (8,24) foi significativo ($p < 0,05$) e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (14,24) não foi significativo ($p > 0,05$) e sendo razoável a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo (cerca de 78%), pôde-se concluir que o modelo de primeira ordem obtido se ajustou bem aos dados experimentais. O erro puro calculado através dos pontos centrais em relação a soma dos quadrados foi baixo (cerca de 0,60%), indicando uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais. A equação codificada (Equação 5.5) que expressou o IAE em função das variáveis estudadas para o Experimento II foi:

$$\text{IAE} = 75,19 - 10,53(\text{pH}) + 10,03(\text{pressão}) - 14,20(\text{pH})(\text{pressão}) \quad (\text{Equação 5.5})$$

Para o Experimento II, o pH exerceu influência negativa sobre a resposta IAE, enquanto que o aumento de pressão favoreceu o aumento de IAE. Pela Figura 5.3, observou-se que, os maiores valores de IAE estavam associados a tratamentos sob pressões mais elevadas. O maior valor de IAE obtido ($119,38 \text{ m}^2/\text{g}$) foi alcançado pelo ensaio 3 (Tabela 5.7), no qual foi utilizada a condição de $\text{pH}=5,50$ e pressão de 200 MPa. Esse valor de IAE foi cerca de 32% maior do que do IPS original ($88,93 \text{ m}^2/\text{g}$). Este comportamento foi de acordo com os resultados encontrados por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) que estudaram a influência da alta pressão isostática nos valores de IAE do IPS a pH 7,5 e 6,5 concluindo que o tratamento sob alta pressão a pH próximo da neutralidade melhorou a atividade emulsionante das proteínas de soja. Não foi possível, neste caso, estabelecer uma comparação direta entre o maior valor de IAE do Experimento II em relação a do equipamento isostático (Capítulo 2), pois no caso do maior valor de IAE do ensaio do Capítulo 2, a amostra apresentava outra concentração de proteína (0,32% de IPS) e valor de pH diferente (6,00). No

entanto, quando se comparou o valor de IAE obtido pelo ensaio 3 que foi de 119,38 m²/g (Tabela 5.7) com o ensaio 1 do Capítulo 2 (Tabela 2.7), que estava no mesmo valor de pH (5,50) e concentração de proteína (1% de IPS), observou-se que o valor obtido foi da mesma ordem de grandeza (154,48 m²/g). As diferenças de valores, neste caso, podem ser atribuídas a diferença de pressão aplicada (300 MPa – Capítulo 2) e tipo de equipamento utilizado.

De modo geral, observou-se que os valores de pH ácidos favoreceram a obtenção de IAE mais elevados, comportamento semelhante ao obtido no Capítulo 2, onde se utilizou o equipamento de alta pressão isostática.

TABELA 5.14 – Coeficientes de regressão para o Planejamento Composto Central Rotacional (Experimento II) calculados pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE).

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão (Erro Puro)	t (2)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média	80,75*	1,7956	44,9704	0,000494	73,0213	88,4726
pH (L)	-10,53*	1,0996	-9,5798	0,010722	-15,2644	-5,8025
pH (Q)	-2,49	1,3087	-1,9063	0,196874	-8,1258	3,1362
Pressão (L)	10,03*	1,0996	9,1258	0,011796	5,3033	14,7653
Pressão (Q)	-5,15	1,3087	-3,9340	0,058958	-10,7796	0,4824
1L x 2L	-14,20*	1,5550	-9,1294	0,011787	-20,8868	-7,5055

Onde: L= termo linear; Q= termo quadrático; 1= pH; 2= pressão aplicada; *Coeficientes estatisticamente significativos (p<0,05).

TABELA 5.15 – Análise de variância (ANOVA) do modelo estatisticamente válido pelo erro puro para a resposta Índice de Atividade Emulsificante (IAE) para o Experimento II.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3	2499,25	833,08	8,24	4,35*
Resíduo	7	707,91	101,13		
Fator de ajuste	5	688,56	137,71	14,24	19,30**
Erro Puro	2	19,34	9,67		
Total	10	3207,16			

% variação explicada (R²) = 77,93%. *F_(3, 7; 0,05) e **F_(5, 2; 0,05).

3.2.3. Resultados das análises específicas das amostras selecionadas

Conforme relatado no item 2.2.5 (Métodos analíticos) foram tomadas as amostras que apresentaram em cada delineamento composto central rotacional (Experimentos I e II) os maiores valores de solubilidade e IAE e uma outra amostra escolhida aleatoriamente (Tabela 5.2). Desta forma, foram selecionadas três (3) amostras em cada experimento, num total de seis (6) amostras. Estas amostras foram analisadas também quanto ao teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica.

Observou-se que, de maneira geral, as amostras selecionadas com maior valor de IAE apresentaram um valor baixo de solubilidade proteica. Este resultado foi de acordo com o observado por Molina, Papadopoulou e Ledward (2001) que não encontraram correlação entre os valores de solubilidade e IAE quando utilizaram o equipamento sob alta pressão isostática para o processamento de proteína de soja.

3.2.3.1. Conteúdo de sulfidril livre.

Os valores do teor de sulfidril livre apresentados por estas amostras antes e após o tratamento sob alta pressão foram colocados na Tabela 5.16. Observou-se que todas as amostras analisadas exibiram o mesmo tipo de comportamento, isto é, os valores de sulfidril livre diminuíram drasticamente (>50%) após o tratamento sob alta pressão, evidenciando que após este tratamento novas ligações S-S tenham sido formadas. Este fato também foi observado por Kajiyama et al. (1995) em extrato hidrossolúvel de soja e por Puppo et al. (2004) que afirmaram que o efeito do desdobramento da molécula de proteína induzido pela alta pressão isostática foi acompanhado pela formação de pontes dissulfídicas (S-S).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores dos teores de sulfidril livre antes e após o tratamento sob alta pressão para todas as amostras analisadas. Observou-se que os valores de sulfidril livre do IPS original diferiram

significativamente ($p < 0,05$) de todas as amostras analisadas, mostrando que a preparação da amostra e principalmente o ajuste de pH causaram perdas de sulfidril livre antes do tratamento sob alta pressão. A menor perda de sulfidril livre foi a do ensaio 5 do Experimento I (56,23%). De maneira geral, as perdas de sulfidril livre ocorreram independente da faixa de pH. Observou-se também, que o percentual de perdas dos teores de sulfidril livre no processamento sob alta pressão dinâmica foram, de maneira geral, maiores do que as obtidos para o processamento isostático (Capítulo 2 – Tabela 2.20), indicando que o efeito do cisalhamento, provocado pelo processamento dinâmico possa ter contribuído para a alteração da molécula de proteína.

O conteúdo de sulfidril livre do IPS original foi superior ao relatado por Takeiti (2002) que obteve 3,82 ($\mu\text{moles/g}$ de proteína), porém foi próximo ao relatado por Liu, Xiong e Butterfield (2000) que encontraram valores de cerca de 10 $\mu\text{moles/g}$ de proteína.

TABELA 5.16 – Conteúdo de sulfidril livre ($\mu\text{moles/g}$ de proteína) do IPS e das amostras selecionadas dos delineamentos completos, antes e após o tratamento sob alta pressão dinâmica.

Amostra/ Ensaio	Teor de sulfidril livre antes do tratamento ¹ ($\mu\text{moles/g}$ de proteína)	Teor de sulfidril livre após tratamento ¹ ($\mu\text{moles/g}$ de proteína)	Perda do teor de sulfidril livre após tratamento sob alta pressão dinâmica (%)
IPS	$7,22 \pm 0,14^2$	-	
Experimento I			
5 ³	$4,89 \pm 0,28^a$	$2,14 \pm 0,16^b$	56,23
6 ³	$4,48 \pm 0,09^a$	$1,11 \pm 0,20^b$	75,22
11 ³	$4,37 \pm 0,11^a$	$1,12 \pm 0,24^a$	74,37
Experimento II			
2 ³	$4,50 \pm 0,12^a$	$1,29 \pm 0,30^b$	71,33
3 ³	$3,94 \pm 0,38^a$	$1,12 \pm 0,26^b$	71,57
6 ³	$4,41 \pm 0,18^a$	$1,06 \pm 0,31^b$	75,96

¹ valores médios de três determinações realizadas em triplicata \pm desvio padrão.

² o valor de sulfidril livre difere significativamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey de todas as demais amostras.

³ Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Sendo: Experimento I : Ensaio 5= 1% de IPS, pH=2,80, 150 MPa; Ensaio 6= 1% de IPS, pH=4,20, 150 MPa; Ensaio 11= 1% IPS, pH=3,50, 150 MPa. Experimento II: Ensaio 2= 1% de IPS, pH=6,50, 100 MPa; Ensaio 3= 1% de IPS, pH=5,50, 200 MPa; Ensaio 6= 1% IPS, pH=6,70, 150 MPa.

3.2.3.2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV).

Os valores de entalpia e de temperatura de desnaturação das médias das duas amostras analisadas para cada um dos ensaios selecionados dos Experimentos I e II foram apresentados na Tabela 5.17. Os termogramas obtidos durante a análise de calorimetria diferencial de varredura foram colocados no Anexo D. As curvas levantadas para todos os ensaios apresentaram as mesmas concentrações de proteína (20% - p/p). No entanto, como os valores de pH entre os ensaios foram diferentes, as comparações dos valores de T_d e ΔH foram feitas apenas para cada ensaio antes e após o tratamento sob alta pressão.

Observou-se na curva do IPS (Anexo D) e na Tabela 5.17 que os valores médios da temperatura de desnaturação foram de 73,87°C, correspondente a fração 7S e 93,25°C, para a fração 11S. Estes valores embora diferentes, foram próximos aos obtidos por Souza, 2000 (75,7°C e 92,6°C, para respectivamente as frações 7S e 11S) e também por Takeiti, 2002 (75,39°C para a fração 7S e 93,17°C para a fração 11S). Os valores de temperatura de desnaturação mencionados por Puppo et al. (2004) foram de 73,9°C para a fração 7S e de 86,7°C para a fração 11S.

Pela análise de variância, observou-se que todas as amostras não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação à temperatura de desnaturação antes e após o processamento sob alta pressão tanto para a fração 7S quanto para a fração 11S, indicando que o tratamento sob alta pressão dinâmica não afetou a estabilidade térmica. Em relação aos valores de ΔH , com exceção da amostra do ensaio 6 (Experimento I), para a fração 11S, todas as demais amostras não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de ΔH antes e após o tratamento sob alta pressão tanto para a fração 7S quanto para a fração 11S, indicando que o tratamento sob alta pressão não contribuiu, de maneira geral, para a desnaturação da proteína. A fração 7S foi desnaturada em quase todas as amostras submetidas a alta pressão dinâmica apresentando grau de desnaturação maior ou igual a 50%, com exceção da amostra do ensaio 6 do Experimento I (Tabela 5.17). No entanto, observou-se pelo termograma desta

amostra (Figura D.14 - Anexo D), que houve alterações ao longo da sua análise, revelando que a amostra sofreu algum tipo de distúrbio após o tratamento sob alta pressão. Apenas no caso da amostra do ensaio 3, do Experimento II, após o tratamento sob alta pressão, não foi possível visualizar o pico correspondente à fração 7S, pois esta amostra foi tratada à pressão de 200 MPa, superior às demais amostras analisadas. Esse resultado foi coerente com os obtidos por Zhang et al. (2005) que observaram que a fração 7S foi muito sensível ao tratamento sob alta pressão, sendo desnaturada acima de 300 MPa, quando trabalharam com proteínas do extrato hidrossolúvel de soja utilizando o equipamento isostático, não havendo dados na literatura sobre o equipamento dinâmico.

A entalpia é um parâmetro termodinâmico que indica mudanças ocorridas na proteína, como ruptura de pontes de hidrogênio, de interações hidrofóbicas e agregação (MURRAY; ARNTFIELD; ISMOND, 1985). Valores mais altos de entalpia estão associados a maiores porcentagens de proteína nativa ou pouco desnaturada (WAGNER; AÑÓN, 1990). No entanto, essa técnica também apresenta limitações para a caracterização da agregação associada à desnaturação térmica (BEVERIDGE; ARNTFIELD; MURRAY, 1985).

Apenas as amostras dos ensaios 5 (Experimento I) e 3 e 6 (Experimento II) apresentaram algum grau de desnaturação para a fração 11S, as demais amostras apresentaram aumento no valor da entalpia. Este fato também foi relatado por Dumay, Kalichevsky e Cheftel (1994) que observaram que a alta pressão induz tanto o desdobramento como a agregação de β -lactoglobulinas (concentração de 2,5%) que podem ser parcialmente reversíveis com o tempo de estocagem após a pressurização. Foi observado aumento nos valores de entalpia em relação à amostra pressurizada inicialmente (2,5% de proteína, 0% de sacarose) com o aumento do tempo de estocagem. Kolakowski, Dumay e Cheftel (2001) verificaram que as amostras pressurizadas de β -lactoglobulinas estocadas por mais de 24 horas também apresentaram um ligeiro aumento no valor da entalpia.

TABELA 5.17 – Temperatura (Td) e entalpia (ΔH) de desnaturação das amostras seleccionadas antes e depois do tratamento sob alta pressão.

Ensaio	Td (°C) ^{1,2/7S}	ΔH (J/g de proteína) ^{1,2/7S}	% D ^{3/7S}	Td (°C) ^{1,2/11S}	ΔH (J/g de proteína) ^{1,2/11S}	%D ^{3/11S}
IPS	73,87 ± 0,65	0,477 ± 0,093	-	93,25 ± 1,06	0,307 ± 0,047	-
<i>Experimento I</i>						
5 – antes AP	71,96 ± 3,59 ^a	0,467 ± 0,074 ^a		92,08 ± 0,94 ^a	0,417 ± 0,005 ^a	
após AP	73,58 ± 0,59 ^a	0,065 ± 0,028 ^a	86,08	90,54 ± 0,76 ^a	0,380 ± 0,038 ^a	8,87
6 – antes AP	73,83 ± 0,24 ^b	0,824 ± 0,482 ^b		90,92 ± 0,82 ^b	2,009 ± 0,928 ^b	
após AP	74,41 ± 2,36 ^b	1,102 ± 0,005 ^b	-	92,37 ± 1,12 ^b	3,384 ± 0,930 ^c	-
11 – antes AP	75,58 ± 3,30 ^c	0,194 ± 0,116 ^c		91,42 ± 0,00 ^c	0,106 ± 0,023 ^d	
após AP	71,12 ± 1,83 ^c	0,097 ± 0,028 ^c	50,00	91,04 ± 0,29 ^c	0,190 ± 0,106 ^d	-
<i>Experimento II</i>						
2 – antes AP	75,25 ± 0,24 ^d	0,648 ± 0,167 ^d		94,04 ± 0,53 ^d	0,093 ± 0,009 ^e	
após AP	74,62 ± 0,06 ^d	0,139 ± 0,037 ^d	78,55	93,50 ± 0,47 ^d	0,648 ± 0,264 ^e	-
3 – antes AP	75,04 ± 2,89	1,259 ± 0,440		93,00 ± 3,42 ^e	0,787 ± 0,023 ^f	
após AP	ND	ND	100,00	91,96 ± 0,06 ^e	0,551 ± 0,052 ^f	29,99
6 – antes AP	74,58 ± 0,24 ^e	0,560 ± 0,093 ^e		92,50 ± 0,59 ^f	0,991 ± 0,259 ^g	
após AP	76,50 ± 2,24 ^e	0,194 ± 0,019 ^e	65,36	93,46 ± 0,41 ^f	0,444 ± 0,199 ^g	55,20

Sendo: AP=tratamento sob alta pressão; ND= não detectado; ¹ Valores médios de 2 determinações ± desvio padrão; ²Valores com letras diferentes na mesma coluna, para o mesmo ensaio diferem significativamente pelo Teste de Tukey (p<0,05); ³ % D = percentagem de desnaturação da amostra após o tratamento sob alta pressão em relação à amostra do mesmo ensaio antes do tratamento sob alta pressão. Experimento I (1% IPS): Ensaio 5= pH=2,80, 150 MPa; Ensaio 6= pH=4,20, 150 MPa; Ensaio 11= pH=3,50, 150 MPa. Experimento II (1% IPS): Ensaio 2= pH=6,50, 100 MPa; Ensaio 3= pH=5,50, 200 MPa; Ensaio 6= pH=6,70, 150 MPa.

3.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.

A Figura 5.4 exibiu o cromatograma do IPS original enquanto que as Figuras 5.5 e 5.6 exibem os cromatogramas das amostras antes e após o tratamento sob alta pressão para respectivamente os ensaios selecionados dos Experimentos I e II. O cromatograma da Figura 5.4 mostrou que o IPS original apresentou quatro (4) picos bem definidos obtidos aproximadamente nos tempos de retenção de 7, 12, 15 e 22 minutos. Os picos correspondentes aos picos 1, 2 e 4 do IPS original estavam presentes em todas as amostras analisadas tanto antes como após o tratamento sob alta pressão, apresentando maior ou menor intensidade. Nas amostras dos ensaios 6 (Experimento I) e 3 (Experimento II) após o tratamento sob alta pressão não foi possível visualizar-se o pico 3. As amostras apresentaram o mesmo tipo de comportamento dentro dos seus respectivos experimentos, ou seja, baixa solubilidade e maior valor de IAE.

Observou-se que tanto o preparo das amostras com a mudança de pH (amostras antes do tratamento sob alta pressão) quanto o tratamento sob alta pressão causaram alterações na intensidade dos picos e outras mudanças nos perfis cromatográficos que puderam ser notadas quando se comparou os perfis do IPS original (Figura 5.4) e os de antes e após o tratamento sob alta pressão (Figuras 5.5 e 5.6). De maneira geral, todas as amostras dos ensaios analisados (Figuras 5.5 e 5.6) apresentaram menores alturas de picos quando comparadas ao IPS original (Figura 5.4). A exceção foi a amostra 6 do Experimento II cujas intensidades dos picos 3 e 4 foram maiores ou bastante próximas às do IPS original tanto antes como após o tratamento sob alta pressão.

Os perfis cromatográficos que se mostraram mais próximos ao IPS original foram os das amostras dos ensaios 2 e 6 do Experimento II, que apresentavam valor de pH mais próximo ao IPS original ($pH_{IPS}=6,8$) e que também apresentaram valores de altura de picos similares antes e após o tratamento sob alta pressão. Este comportamento também foi observado nas amostras dos ensaios selecionados no

Capítulo 2. Em todos os cromatogramas apresentados não houve a formação de novos picos.

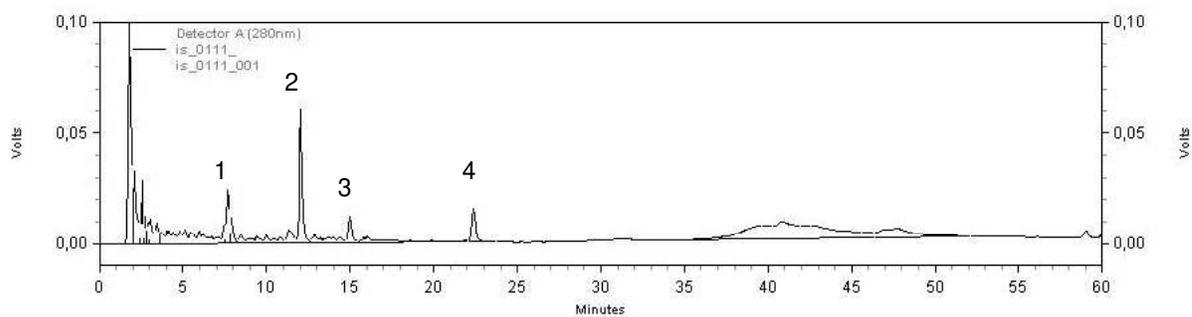
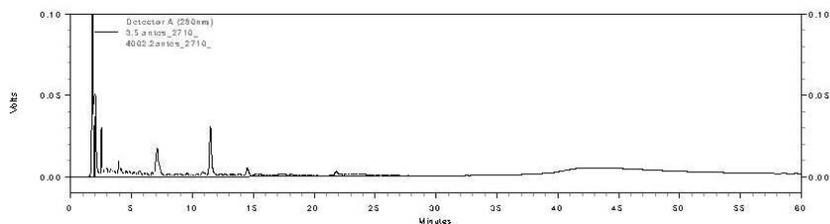
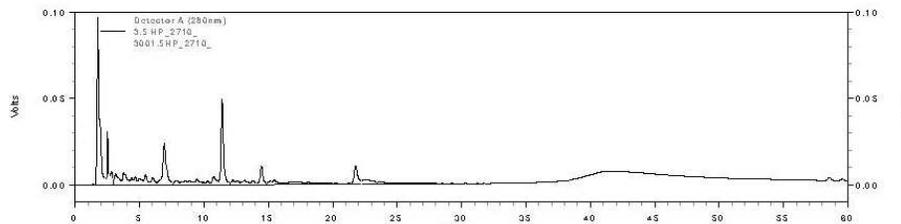


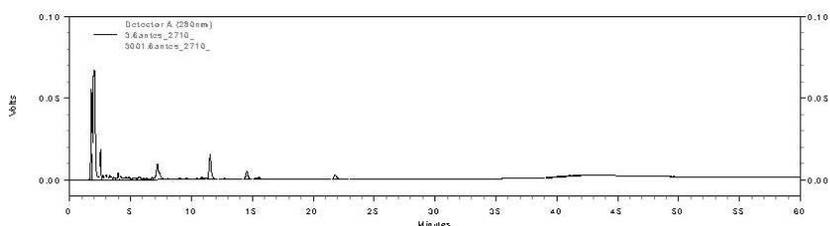
FIGURA 5.4 – Cromatogramas de CLAE-FR do isolado proteico de soja original (pH=6,8), mostrando os picos mais bem definidos 1, 2, 3 e 4



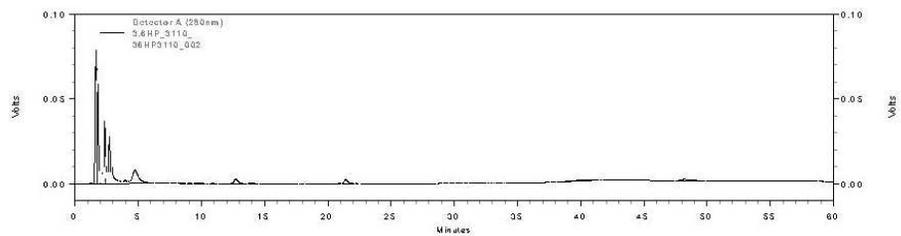
Ensaio 5 (antes do tratamento sob pressão): 1% de IPS, pH=2,80



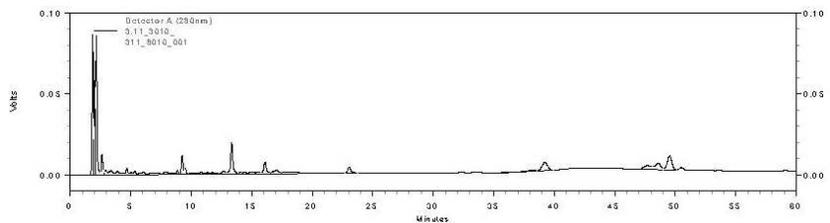
Ensaio 5 após o tratamento sob pressão de 150 MPa.



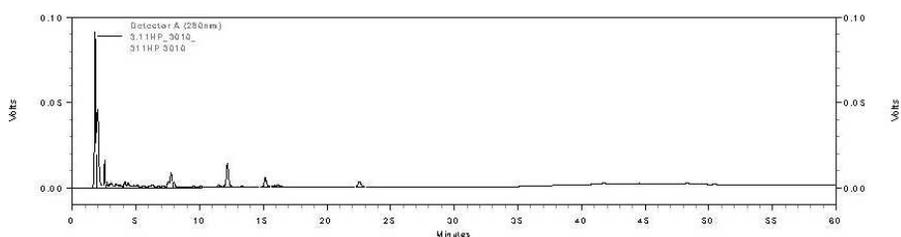
Ensaio 6 (antes do tratamento sob pressão): 1% de IPS, pH=4,20



Ensaio 6 após o tratamento sob pressão de 150 MPa.

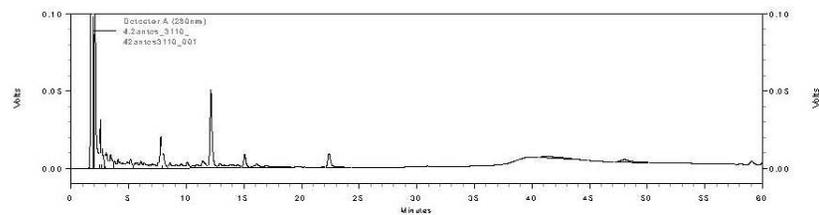


Ensaio 11 (antes do tratamento sob pressão): 1% IPS e pH=3,50

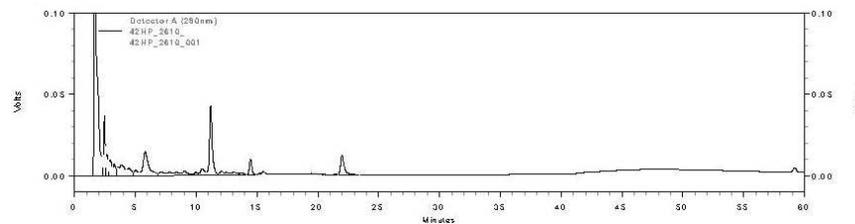


Ensaio 11 após o tratamento sob pressão de 150 MPa.

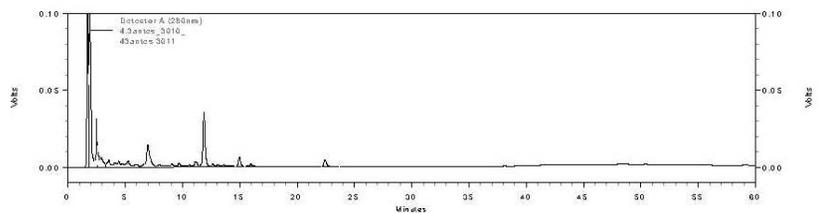
FIGURA 5.5 – Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento I.



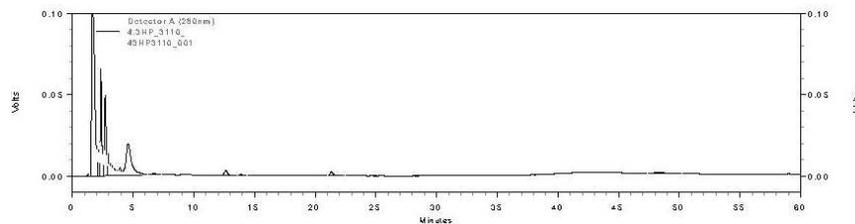
Ensaio 2 (antes do tratamento sob pressão): 1% de IPS, pH=6,50



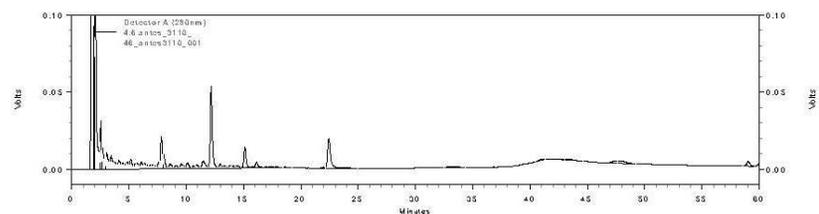
Ensaio 2 após o tratamento sob pressão de 100 MPa.



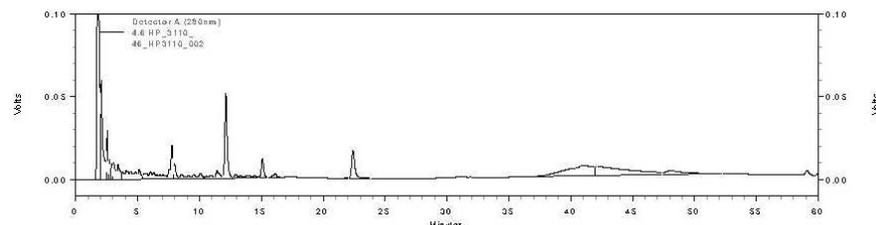
Ensaio 3 (antes do tratamento sob pressão): 1% de IPS, pH=5,50



Ensaio 3 após o tratamento sob pressão de 200 MPa.



Ensaio 6 (antes do tratamento sob pressão): 1% IPS e pH=6,70



Ensaio 6 após o tratamento sob pressão de 150 MPa.

FIGURA 5.6 – Cromatogramas de CLAE-FR para os ensaios do Experimento II.

3.2.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras selecionadas dos Experimentos I e II antes e após o tratamento sob alta pressão foram colocados na Figura 5.7. Observou-se que a maioria das amostras apresentaram mudanças nos perfis eletroforéticos após o tratamento sob alta pressão, com exceção da amostra do ensaio 11 do Experimento I, na qual não se observaram alterações após o tratamento sob alta pressão. De modo geral, a banda designada como A (destacada na Figura 5.7) permaneceu intacta em todas as amostras analisadas, independente da pressão aplicada ou composição das amostras, comportamento similar ao também demonstrado quando se utilizou o equipamento de alta pressão isostática (Capítulo 2 e 3).

Com exceção da amostra do ensaio 11 (pH=3,5 e Pressão=150 MPa) do Experimento I, todas as demais amostras apresentaram uma intensificação de faixas após o tratamento sob alta pressão. Todas as amostras antes do tratamento sob pressão do Experimento I apresentaram bandas definidas no topo do gel (Figura 5.7). Na amostra do ensaio 5 (pH=2,8 e Pressão=150 MPa) do Experimento I, que apresentou o menor valor de pH dentre os ensaios deste experimento, as cargas eletrostáticas inibiram a formação de agregados, resultando em maior número de bandas ao longo do gel. PUPPO et al. (2004) observaram que em condições de baixo pH, houve um alto número de unidades móveis em 11S que poderiam dissociar-se quando submetidas ao tratamento sob alta pressão isostática o que não foi observado para a fração 7S. Houve indicações que o tratamento sob alta pressão dinâmica poderia dissociar as proteínas e quebrar os agregados em unidades menores, o que também pôde ser observado na amostra do ensaio 6 (pH=6,7 e Pressão=150 MPa) do Experimento II.

No Experimento II (Figura 5.7), a amostra do ensaio 3 (pH=5,5 e Pressão=200 MPa) que possuía o menor valor de pH quando comparada com as demais amostras selecionadas deste Experimento (ensaios 2 e 6), aproximando-se do pl

da proteína de soja, apresentou banda mais escura após o tratamento sob alta pressão. No valor de pI as proteínas tem menor carga eletrostática o que resulta em maior agregação, o que poderia explicar o aparecimento desta banda mais escura no topo do gel. As amostras dos ensaios 2, 3 e 6 após o tratamento sob alta pressão mostraram uma intensificação das bandas do topo do gel evidenciando uma certa agregação, sugerindo que alguns agregados foram formados ou permaneceram intactos após este tratamento.

A Figura 5.8 comparou o perfil eletroforético SDS-PAGE, em condições redutoras das amostras dos ensaios selecionados nos Experimentos I e II, antes e após o tratamento sob alta pressão. As amostras dos ensaios selecionados do Experimento I, não apresentaram mudanças entre os perfis antes e após o tratamento sob alta pressão. No entanto, observou-se que a amostra do ensaio 5 ($pH=2,8$ e Pressão=150 MPa) possuía mais faixas de menor PM (na faixa de 21,5 a 31 kDa) do que as demais amostras, ensaio 6 ($pH=4,2$ e Pressão=150 MPa) e 11 ($pH=3,5$ e Pressão=150 MPa). Todos os perfis das amostras dos ensaios selecionados do Experimento II foram bastante similares antes e após o tratamento sob alta pressão. Estes resultados confirmaram os obtidos por Apichartsrangkoon (2003), que não observou mudanças entre os perfis eletroforéticos de SDS-PAGE entre amostras controle de proteína concentrada de soja e as submetidas ao processo de alta pressão isostática (200-800 MPa), tratadas a temperatura ambiente.

Experimento I						Experimento II						
⁽¹⁾	5A	5D	6A	6D	11A	11D	2A	2D	3A	3D	6A	6D
⁽²⁾	2,8	2,8	4,2	4,2	3,5	3,5	6,5	6,5	5,5	5,5	6,7	6,7
⁽³⁾	-	150	-	150	-	150	-	100	-	200	-	150

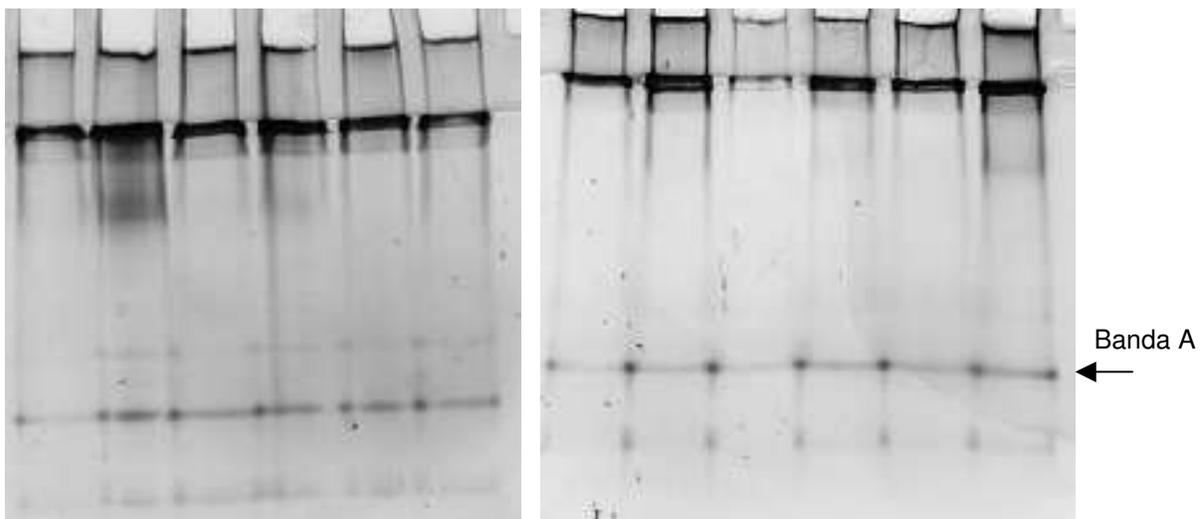


FIGURA 5.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) das amostras com 1% de IPS selecionadas dos Experimentos I e II, sendo (A) antes e (D) após o tratamento sob alta pressão dinâmica e (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) pressão aplicada.

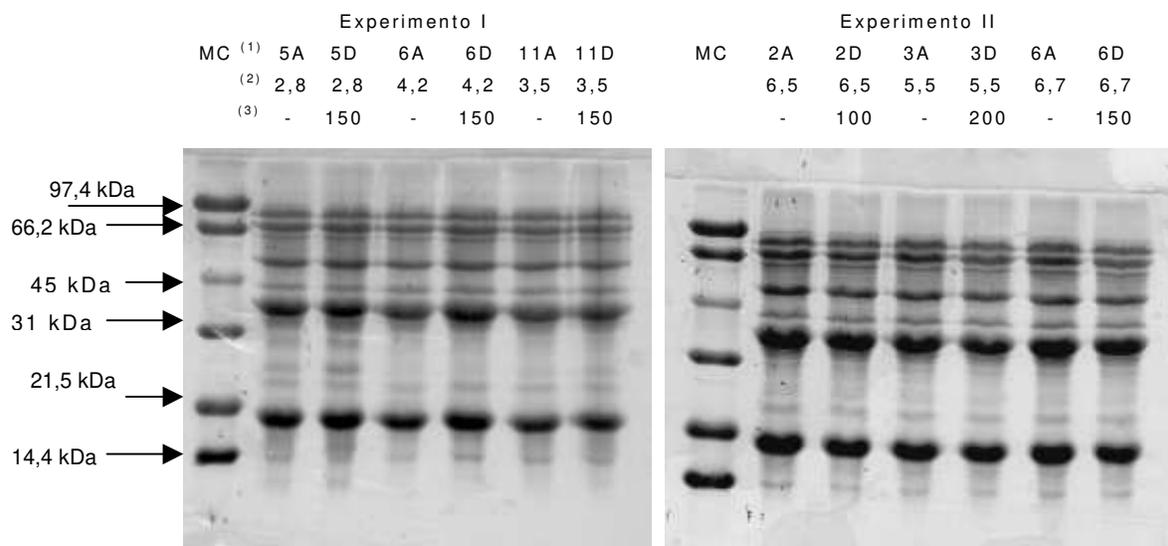


FIGURA 5.8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE), em condições redutoras, das amostras selecionadas dos Experimentos I e II (A) antes e (D) após o tratamento sob alta pressão, sendo MC=marcadores de peso molecular comercial, (1) número do ensaio; (2) pH da amostra; (3) pressão aplicada.

3.2.3.5 Microestrutura das amostras selecionadas.

A Figura 5.9 apresentou a microestrutura da amostra de IPS e as Figuras 5.10 e 5.11 apresentaram, respectivamente, as microestruturas das amostras selecionadas dos Experimentos I e II. Observou-se que a amostra de IPS apresentou uma conformação plana e bastante característica dos produtos liofilizados (Figura 5.9) que foi facilmente visualizada nas demais microestruturas documentadas.

Para o Experimento I, observou-se que as amostras dos ensaios 5 e 6 (Figura 5.10 a, b, c, d) apresentaram pequenos sinais de agregação após o tratamento sob alta pressão. A amostra do ensaio 11 não apresentou diferença na aparência antes e após o tratamento sob pressão (Figura 5.10 e, f). Embora não haja uma relação direta entre microestrutura e características físico-químicas, alguns destes resultados confirmaram, de certa forma, os obtidos nas análises de conteúdo de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia e eletroforese,

pois evidenciaram também mudanças na molécula de proteína em menor ou maior grau. A amostra do ensaio 5 após o tratamento sob alta pressão apresentou perdas de SH livre, diminuição da altura do pico 2 e aumento da altura dos demais picos cromatográficos, intensificação das bandas de menor PM na eletroforese Native-Page e algum grau de desnaturação das proteínas 7S e 11S através da calorimetria diferencial de varredura. A amostra do ensaio 6 que também apresentou sinais de agregação na sua microestrutura, apresentou aumento da entalpia após o tratamento sob alta pressão e intensificação das bandas no topo de gel na eletroforese Native-PAGE, perda de teor de sulfidril livre (75,22%) e a diminuição dos picos 1, 2 e 4 e desaparecimento do pico 3 através da análise do perfil cromatográfico. Já a amostra do ensaio 11, embora não tenha apresentado diferença na sua microestrutura, apresentou também perda do teor de sulfidril livre (74,37%), diminuição da intensidade dos picos após o tratamento sob alta pressão pela análise dos perfis cromatográficos e diminuição da entalpia da fração 7S com ligeiro aumento da entalpia da fração 11S, mudanças essas não evidenciadas pela eletroforese Native-Page.

A amostra do ensaio 2 do Experimento II (Figura 5.11 a, b) embora não tenha evidenciado nenhuma diferença na sua microestrutura, apresentou também perda de SH livre, intensificação de bandas no topo do gel após o tratamento sob alta pressão pelo Native-Page, aumento de intensidade dos picos 3 e 4 e diminuição da altura dos picos 1 e 2 pela comparação dos perfis cromatográficos antes e após o tratamento sob alta pressão, desnaturação da fração 7S e aumento da entalpia da fração 11S após o tratamento sob alta pressão. As amostras dos ensaios 3 e 6 que apresentaram pequenos sinais de agregação nas suas microestruturas após o tratamento sob alta pressão exibiram perdas similares de SH livre (71,57% e 75,96% respectivamente) e desnaturação das frações 7S e 11S. A intensificação das bandas no topo do gel pela eletroforese Native Page após o tratamento sob pressão foi mais evidente para a amostra do ensaio 3, porém a amostra do ensaio 6 apresentou nova banda de menor PM após o tratamento sob alta pressão. A comparação dos perfis cromatográficos antes e após o tratamento sob alta pressão mostraram o desaparecimento do pico 3,

aumento do pico 1 e diminuição dos picos 2 e 4 para a amostra do ensaio 3, enquanto que na amostra do ensaio 6 todos os picos diminuíram sua altura após o tratamento sob alta pressão.

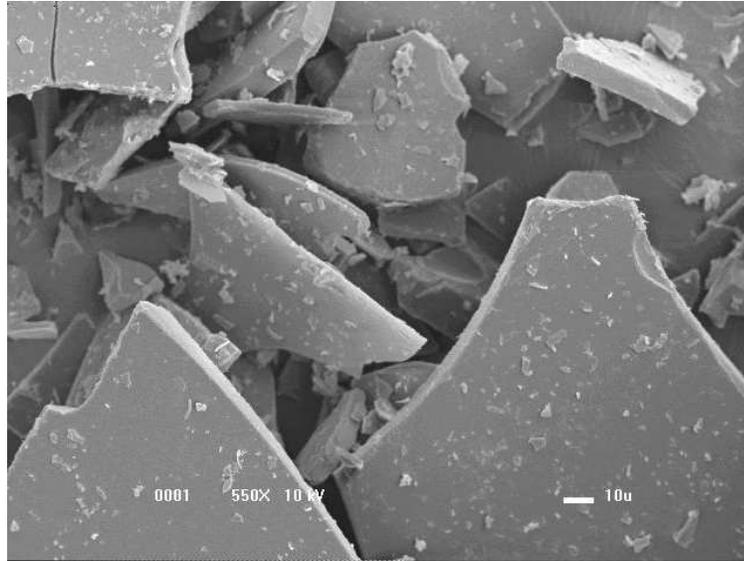
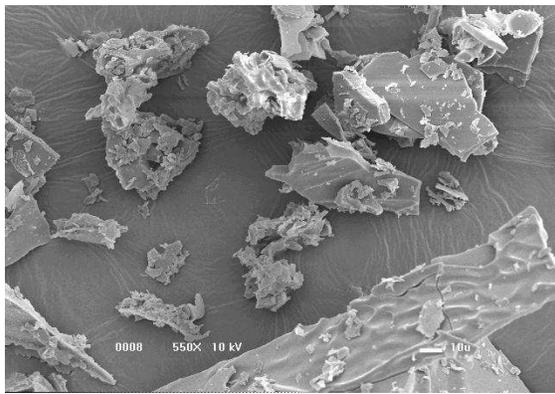
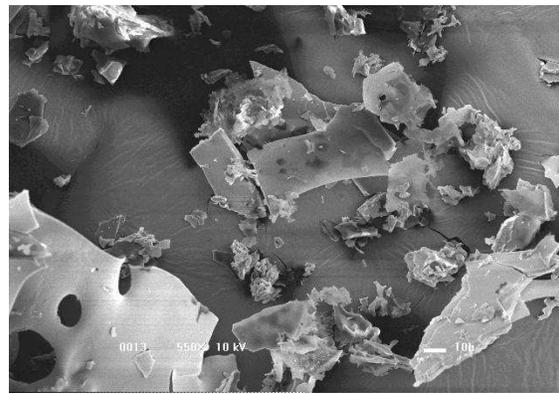


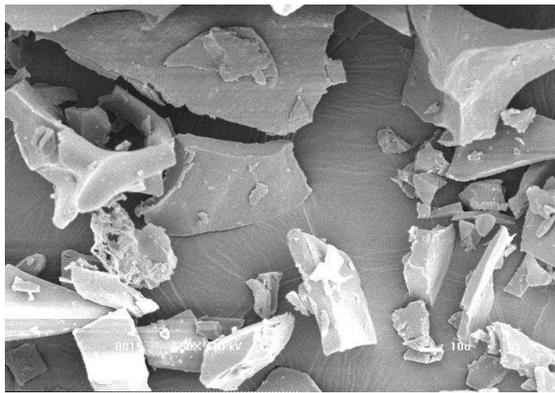
FIGURA 5.9 – Microestrutura do IPS original, sem tratamento, liofilizado, pH=6,80, aumento de 550 vezes.



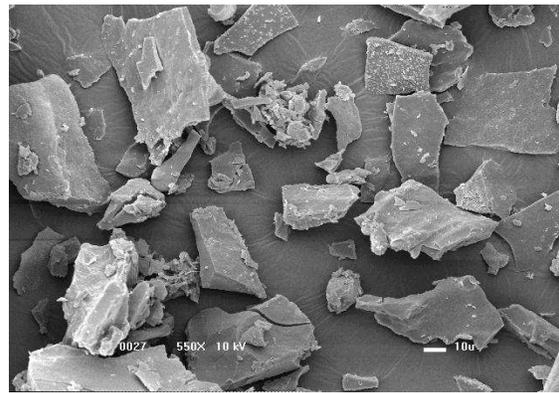
(a) pH=2,80, sem tratamento.



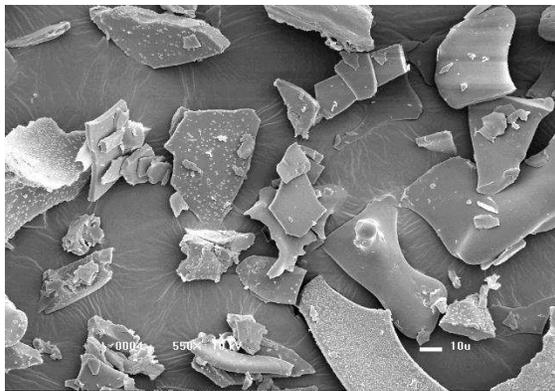
(b) pH=2,80, tratada à 150 MPa de pressão.



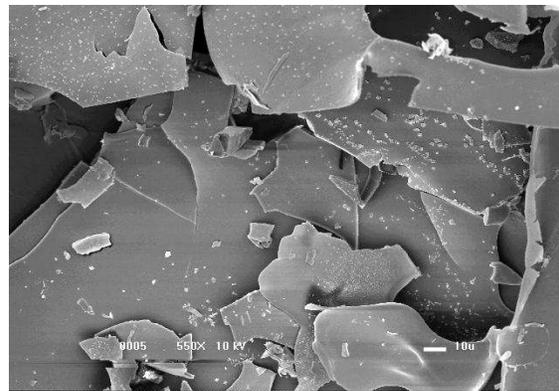
(c) pH=4,20, sem tratamento.



(d) pH=4,20, tratada à 150 MPa de pressão.

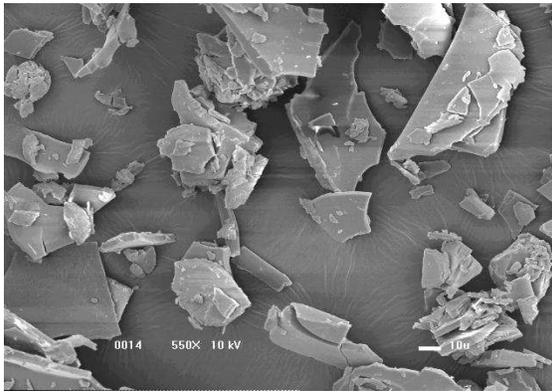


(e) pH=3,50, sem tratamento.

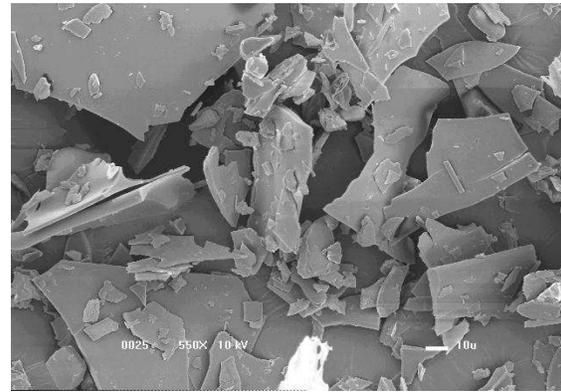


(f) pH=3,50, tratada à 150 MPa de pressão.

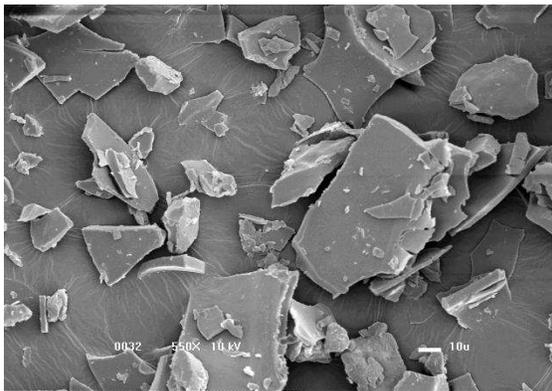
FIGURA 5.10 - Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento I, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 550 vezes: a) Ensaio 5 (pH=2,80); (b) Ensaio 5 (pH=2,80, 150 MPa); (c) Ensaio 6 (pH=4,20) e (d) Ensaio 6 (pH=4,20, 150 MPa); (e) Ensaio 11 (pH=3,50) e (f) Ensaio 11 (pH=3,50, 150 MPa).



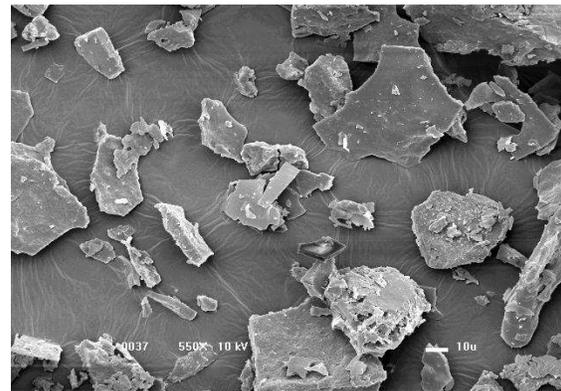
(a) pH=6,50, sem tratamento.



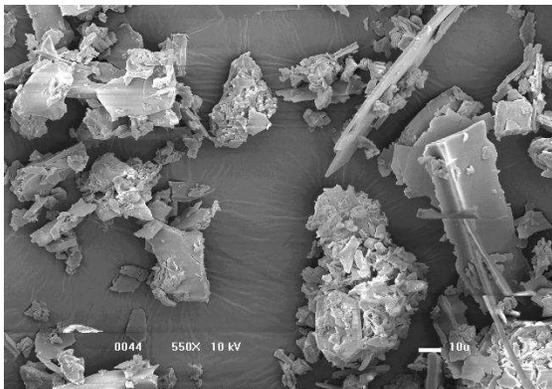
(b) pH=6,50, tratada à 100 MPa de pressão.



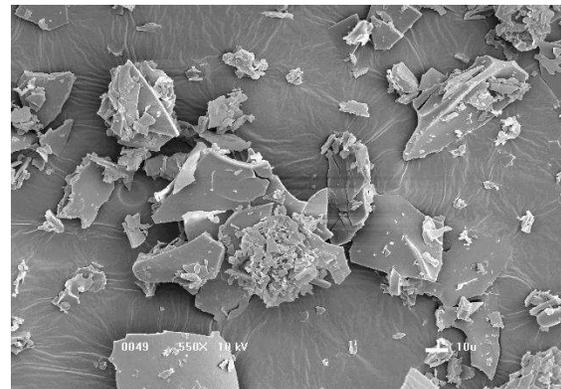
(c) pH=5,50, sem tratamento.



(d) pH=5,50, tratada à 200 MPa de pressão.



(e) pH=6,70, sem tratamento.



(f) pH=6,70, tratada à 150 MPa de pressão.

FIGURA 5.11 – Micrografias obtidas por MEV das amostras selecionadas do Experimento II, contendo 1% de IPS, antes e após o tratamento sob pressão, com aumento de 550 vezes: a) Ensaio 2 (pH=6,50); (b) Ensaio 2 (pH=6,50, 100 MPa); (c) Ensaio 3 (pH=5,50) e (d) Ensaio 3 (pH=5,50, 200 MPa); (e) Ensaio 6 (pH=6,70) e (f) Ensaio 6 (pH=6,70, 150 MPa).

4. Conclusão

A solubilidade proteica foi fortemente influenciada pela variável pH em ambas as faixas de pH estudadas, sendo que o tratamento sob alta pressão dinâmica não teve influência sobre a resposta solubilidade proteica.

Na faixa de pH 2,80-4,20 a variável pH teve um efeito negativo, isto é, a medida em que se aumentou o pH diminuiu-se a solubilidade proteica. Para a faixa de pH 5,3-6,7 foi observado que os valores de solubilidade proteica aumentaram a medida em que aumentou o pH e atingem valores máximos quando a concentração de IPS estava na sua faixa média.

Nos valores mais baixos de pH (2,8-4,20) tanto o pH como a alta pressão dinâmica influenciaram positivamente os valores do Índice de Atividade Emulsificante (IAE), isto é, o aumento do pH e pressão aplicada favoreceram o aumento dos valores de IAE. Já nos valores de pH mais elevados (5,3-6,7), o aumento de pH teve efeito negativo sobre os valores de IAE, enquanto que o aumento da pressão favoreceram o aumento de IAE. Foi observado que os maiores valores de IAE estiveram próximos ao ponto isoelétrico da proteína de soja.

A análise das amostras selecionadas com os maiores valores de solubilidade proteica e IAE e uma outra amostra escolhida aleatoriamente em cada experimento mostraram que o tratamento sob alta pressão dinâmica diminuiu drasticamente (>50%) o teor de sulfidrila livre de todas as amostras analisadas, evidenciando uma mudança na molécula da proteína confirmada pelas alterações observadas através das análises de calorimetria diferencial de varredura (CDV), cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e microscopia eletrônica.

Devido à boa solubilidade do IPS em pH ácido e acima de 6,00 é possível a sua utilização tanto em bebidas com pH baixo como nas lácteas conferindo alto teor proteico. Nos produtos onde se requer uma boa capacidade de formar emulsão

pode-se trabalhar na faixa de pH próxima ao ponto isoelétrico e em faixas de pressões dinâmicas elevadas (> 200 MPa).

5. Referências Bibliográficas

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC**. 16^a ed. Arlington: AOAC International, 1997.

APICHARTSRANGKOON, A. Effects of high pressure on rheological properties of soy protein gels. **Food Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 55-60, 2003.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp. 1995. 299 p.

BEVERIDGE, T.; ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E.D. Protein structure development in relation to denaturation temperatures. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 18, n. 2, p. 189-191, 1985.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH and SS groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 39, v. 1, p. 49-51, 174.

BIETZ, J. A. Separation of cereal proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, The Netherlands, v. 255, p. 219-238, 1983.

BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BURKERT, J. F. de M., MALDONADO, R. R., MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Londres, v. 80, n.1, p. 61-67, 2005.

CAMPOS, F. P.; DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n.2, p. 351-357, 2003.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional e modificaciones químicas**. Zaragoza: Editorial Acribia S. A. 1989. 346 p.

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

DUMAY, E. M.; KALICHEVSKY, M. T.; CHEFTEL, J. C. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and baroprotective effects of sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 9, p. 1861-1868, 1994.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LEGRAND, J. Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 9, p. 3388-3395, 2002.

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

GRANT, S.; PATTERSON, M.; LEDWARD, D. Food processing gets freshly squeezed. **Chemistry & Industry**, Londres, v. 2, p. 55-58, 2000.

HALL, G. M. Basic concepts. In: HALL, G. M. (ed.) **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 1-10.

HARDHAM, J. F. The determination of total and reactive sulphhydryl of whey protein concentrates. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, v. 36, n. 4, p. 153-155, 1981.

- HETTIARACHCHY, N.; KALAPATHY, U. Soybean protein products. In Liu, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**, Chapter 8. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. 1999. p. 379-411.
- HILL, S. E. Emulsions. In: HALL, G. M. (ed.). **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional. 1996. p. 153-185.
- KAJIYAMA, N.; ISOBE, S.; UEMURA, K.; NOGUCHI, A. Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 147-158, 1995.
- KOLAKOWSKI, P.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Effects of high pressure and low temperature on β -lactoglobulin unfolding and aggregation. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, n. 3, p. 215-232, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, p, 680-685, 1970.
- LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, physical, and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 5, p. 811-818, 2000.
- MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.
- MOLINA, E.; DEFAYE, A. B.; LEDWARD, D. A. Soy protein pressure-induced gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 625-632, 2002.
- MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 263-269, 2001.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

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**, Ottawa, v. 18, n. 2, p. 158-162, 1985.

OWUSU-APENTEN, R. K. The bicinchoninic acid protein assay. In: OWUSU-APENTEN, R. K. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 99-124, 2002. 463p.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 3, p. 716-723, 1978.

PUPPO, C.; CHAPLEAU, N.; SPERONI, F.; LAMBALLERIE-ANTON, M. de; MICHEL, F.; AÑON, C.; ANTON, M. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 6, p. 1564-1571, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1^a ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SINGH, N.; SINGH, D.; CHAUHAN, G. S. Effects of defatting, coagulants and coagulation pHs on soy protein isolates. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 31, n. 2, p. 117-121, 1994.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: chemistry and technology**. Connecticut: The AVI Publishing Co. Inc, 1972. 470 p.

SOUZA, A. S. de. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2000. 108p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SOUZA, A. S. de. **Efeito da irradiação na composição e propriedades funcionais da soja**. 2006. 99p. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TAKEITI, C. Y. **Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2002. 102p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

WAGNER, J.R.; AÑON, 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.

WILLIAMS-CAMPBELL, A. M.; SOLOMON, M. B. Reduction of spoilage microorganisms in fresh beef using hydrodynamic pressure processing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 3, p. 571-574, 2002.

ZHANG, H.; LI, L.; TATSUMI, E.; ISOBE, S. High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 7-14, 2005.

Conclusão Geral

Conclusão Geral

A solubilidade proteica foi fortemente influenciada pela variável pH, tanto quando se utilizou apenas a proteína de soja quanto da sua utilização adicionada de pectina e κ -carragena, em ambos os equipamentos de alta pressão utilizados, isostático (198 a 702 MPa) e dinâmico (80 a 220 MPa).

Na faixa de pH 5,16-6,84 a concentração de isolado proteico de soja (IPS) exerceu também influência sobre a solubilidade proteica, quando se utilizou apenas a proteína de soja e o equipamento sob alta pressão isostática.

A adição de pectina ao sistema fez com que outras variáveis além do pH influenciassem a solubilidade proteica na faixa de pH estudada (2,66 a 4,34), embora o efeito do pH seja ainda o mais relevante. O pH teve um efeito negativo sobre a solubilidade proteica, isto é, à medida em que se aumentou o pH diminuiu-se a solubilidade proteica em presença de pectina e utilizando-se o equipamento sob alta pressão isostática, o que acompanhou a tendência verificada anteriormente para esta mesma faixa de pH, quando se utilizou apenas a proteína de soja.

Embora o efeito do pH sobre a resposta solubilidade proteica seja o mais relevante, a adição de κ -carragena também influenciou negativamente esta resposta. Em presença de κ -carragena e na faixa de pH estudada (5,16-6,84), o pH teve um efeito positivo sobre a solubilidade proteica, isto é, à medida em que se aumentou o pH aumentou-se também a solubilidade proteica.

Quando se utilizou o equipamento sob alta pressão dinâmica, foi comprovado que a variável pressão não influenciou a resposta solubilidade proteica. Na faixa de pH 2,80-4,20 a variável pH teve um efeito negativo, isto é, à medida em que se aumentou o pH diminuiu-se a solubilidade proteica. Para a faixa de pH 5,3-6,7 foi observado que os valores de solubilidade proteica aumentaram à medida em que se aumentou o pH e atingiu valores máximos quando a concentração de IPS estava na sua faixa média.

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi influenciado pelas variáveis estudadas concentração de IPS, pH e pressão isostática aplicada, quando se trabalhou apenas com a proteína de soja. Em ambas as faixas de pH estudadas a concentração de IPS influenciou negativamente o IAE. Na faixa de pH mais baixa (2,66 – 4,34) o valor de IAE foi máximo nos tratamentos sob baixa pressão. Na faixa de pH de 5,16 a 6,84 os valores mais altos de IAE foram obtidos na região de valores centrais de pressão e de mais baixo pH.

Quando se adicionou pectina ao sistema, os maiores valores de IAE foram encontrados para os valores médios de pH e concentração de pectina, sendo que o IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos sob pressão isostática nos pontos extremos (mais baixos ou nos mais altos).

A adição de κ -carragena ao sistema, fez com que a resposta IAE fosse influenciada pelas variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão aplicada). Os maiores valores de IAE foram encontrados para os valores médios de pH e baixas concentrações de κ -carragena. O IAE atingiu valores mais altos para os tratamentos sob pressão isostática nos pontos extremos (mais baixos ou nos mais altos).

Quando se utilizou o equipamento sob alta pressão dinâmica foi observado que nos valores mais baixos de pH (2,8-4,20) tanto o pH como a alta pressão influenciaram positivamente os valores do IAE, isto é, o aumento do pH e pressão aplicada favoreceram o aumento dos valores de IAE. Já nos valores de pH mais elevados (5,3-6,7), o aumento de pH teve efeito negativo sobre os valores de IAE, enquanto que o aumento da pressão favoreceu o aumento de IAE. Foi observado que os maiores valores de IAE estavam próximos ao ponto isoelétrico da proteína de soja.

Em todos os experimentos realizados com o equipamento sob alta pressão isostática o módulo de perda ou componente viscoso (G'') foi o componente dominante, exibindo um comportamento predominantemente viscoso. Apesar dos efeitos serem pequenos, quando se trabalhou apenas com a proteína de soja, o

módulo G'' foi influenciado por todas as variáveis estudadas (concentração de IPS, pH e pressão). A concentração de IPS influenciou positivamente os valores de G'' em ambas as faixas de pH estudadas e o aumento dos valores de pressão influenciaram positivamente os valores de G'' na faixa de pH 2,66-4,34. Na faixa de pH 5,16-6,84 o valor de G'' é máximo nos extremos dos valores de pressão.

Embora os efeitos das variáveis sejam pequenos, observou-se que a incorporação de pectina ao sistema fez com que as variáveis concentração de pectina (0,032 a 0,368 g/g de IPS), pH (2,66 a 4,34) e pressão isostática (198 a 702 MPa) tivessem efeitos positivos no aumento do G'' .

Não foi possível estabelecer um modelo para a resposta G'' em função das variáveis estudadas (concentração de κ -carragena, pH e pressão isostática aplicada), sendo verificado que os valores de G'' não foram afetados pelas variações de concentração de κ -carragena (0,032 a 0,368 g/g de IPS), pH (5,16 a 6,84) e pressão aplicada (198 a 702 MPa).

A análise das amostras selecionadas com os maiores valores de solubilidade proteica, IAE e G'' (experimentos sob alta pressão isostática) e solubilidade proteica e IAE e uma outra amostra escolhida aleatoriamente (experimentos sob alta pressão dinâmica), utilizando apenas a proteína de soja ou a proteína de soja adicionada de pectina e κ -carragena, mostrou que o tratamento sob alta pressão diminuiu em maior ou menor grau o teor de sulfidrila livre de todas as amostras analisadas, sendo que as perdas mais drásticas foram observadas no processamento sob alta pressão dinâmica. Para as amostras adicionadas de pectina os teores de sulfidrila livre não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) antes e após o tratamento sob alta pressão mostrando que a pectina pôde ter exercido uma certa proteção à molécula de proteína. Foi evidenciada uma mudança na molécula da proteína confirmada pelas alterações observadas através das análises de calorimetria diferencial de varredura (CDV), cromatografia líquida de fase reversa, eletroforese e em alguns casos também na microscopia eletrônica.

Devido a boa solubilidade do IPS em pH ácido e acima de 6,00 é possível a sua utilização tanto em bebidas com pH baixo como nas lácteas conferindo alto teor proteico. Nos produtos onde se requer uma boa capacidade de formar emulsão pode-se trabalhar, preferencialmente, na faixa de pH ácida ou próxima ao ponto isoelétrico, em pressões isostáticas moderadas ou em faixas de pressões dinâmicas elevadas (> 200 MPa) e adicionar-se, preferencialmente, a pectina, observando-se a faixa de pH para a sua utilização. O aumento da concentração de proteína e pressão isostática e também da concentração de pectina podem favorecer a obtenção de produtos com característica mais viscosa, na faixa de pH ácido. A κ -carragena pode ser utilizada em produtos onde se deseja controlar a solubilidade e o IAE.

Houve indícios que o tratamento sob alta pressão isostática seja eficiente para eliminar o teor de fitato presente nas amostras com 5% de isolado proteico de soja em soluções aquosas (nas concentrações de até cerca de 3 mg de fitato/g de proteína). Esse tratamento porém, não se mostrou efetivo para alterar os teores de inibidor de tripsina presentes nas amostras de isolado proteico de soja nas faixas de pressões estudadas de 200 a 700 MPa.

ANEXO A

TABELA A1 – Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento I do Capítulo 2.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
1	300	19,6	33,8	32,3	30,4	28,3	26,5	24,8	23,7	22,2	21,1	20,5	19,9	19,7	19,4	7,1
2	300	20,0	34,1	33,4	31,0	28,7	26,7	24,8	23,6	21,6	20,5	19,9	19,4	19,2	18,9	6,7
3	300	19,6	33,9	32,6	30,7	28,5	-	25,2	23,9	22,2	21,1	20,5	19,9	19,7	19,5	7,1
4	300	19,1	33,0	32,1	29,1	27,2	24,9	23,4	22,3	20,5	19,9	19,5	19,0	18,9	18,8	6,6
5	600	19,5	41,3	36,8	33,2	30,0	27,6	25,8	24,5	22,8	21,8	21,3	20,8	20,5	20,4	2,1
6	600	19,6	42,4	38,3	35,1	31,9	29,5	27,4	25,7	23,6	22,2	21,4	20,6	20,3	19,9	1,2
7	600	20,9	43,0	38,1	35,1	32,4	29,7	27,4	25,8	23,7	22,4	21,5	20,8	20,5	20,1	4,6
8	600	19,6	42,2	37,0	32,8	29,9	27,6	26,0	24,8	23,8	22,2	21,5	20,9	20,7	20,4	1,9
9	450	19,7	38,4	36,6	34,0	31,2	29,1	27,1	24,9	23,0	21,9	21,1	20,5	20,4	20,0	4,8
10	450	20,5	37,6	34,8	32,5	30,2	27,6	26,3	24,8	23,4	22,0	21,4	20,6	20,4	20,1	5,0
11	450	19,4	37,1	34,4	31,4	28,7	26,4	24,7	23,4	21,8	20,7	20,1	19,6	19,4	19,1	3,7
12	450	19,6	37,7	35,8	33,3	30,2	28,0	26,1	24,7	22,7	21,6	20,8	20,1	19,7	19,5	3,7
13	198	20,5	31,5	29,6	28,5	27,2	25,4	23,9	22,6	21,5	20,5	20,1	19,7	19,6	19,4	10,3
14	702	19,6	44,0	41,5	37,8	35,5	30,4	28,3	25,9	24,0	22,6	21,5	20,1	19,5	19,2	-1,5
15	450	19,2	37,3	35,5	33,3	30,9	28,7	27,8	25,5	23,5	22,2	21,4	20,8	20,4	20,2	5,1
16	450	19,6	38,7	35,9	33,0	30,2	28,0	26,3	24,9	23,0	21,7	21,0	20,4	20,1	19,7	4,4
17	450	19,9	38,0	34,2	31,1	28,3	26,1	24,5	23,2	21,6	20,6	20,2	19,7	19,5	19,4	3,9

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A2 – Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento II do Capítulo 2.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T Amostra	T inicial	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
1	300	21,3	36,2	33,6	31,1	28,6	26,7	25,2	24,0	22,4	21,5	20,9	20,5	20,4	20,1	6,2
2	300	20,8	35,8	33,9	31,7	29,4	27,7	26,0	24,7	23,0	22,0	21,3	20,8	20,7	20,5	8,4
3	300	19,4	38,2	36,0	32,6	29,8	27,3	25,6	24,1	22,2	21,4	20,8	20,4	20,1	19,8	4,3
4	300	20,0	34,4	32,0	29,1	26,8	24,9	23,5	22,6	21,4	20,7	20,2	19,9	19,8	19,6	7,5
5	600	19,5	41,9	39,0	35,6	32,6	29,8	27,6	25,9	23,7	22,2	21,4	20,7	20,4	20,0	4,2
6	600	21,3	43,1	39,9	36,7	33,2	30,6	28,5	27,1	24,9	23,6	22,9	22,2	21,8	21,5	3,0
7	600	18,5	41,0	36,1	34,2	31,6	29,1	27,1	25,5	23,2	22,0	21,3	20,7	20,4	20,1	6,3
8	600	20,4	42,0	37,8	33,9	30,8	28,4	26,6	25,3	23,6	22,5	21,9	21,3	21,1	20,8	2,2
9	450	19,4	38,2	36,0	32,6	29,8	27,3	25,6	24,1	22,2	21,4	20,8	20,4	20,1	19,8	4,3
10	450	19,6	38,6	36,2	33,7	31,3	29,0	26,9	25,2	23,2	21,9	21,2	20,5	20,4	20,1	4,6
11	450	20,1	38,4	35,5	32,8	30,3	27,7	25,9	24,6	23,0	21,8	21,3	20,6	20,5	20,2	4,8
12	450	20,6	39,3	36,3	33,6	31,1	28,7	26,9	25,4	23,4	22,2	21,5	20,9	20,7	20,5	4,9
13	198	20,5	30,7	29,1	27,5	25,9	24,3	23,1	22,2	20,8	20,1	19,6	19,3	19,1	18,9	13,5
14	702	20,1	44,9	40,7	37,2	33,9	31,1	28,8	27,0	24,6	23,2	22,3	21,5	21,1	20,6	5,0
15	450	20,8	39,4	36,2	32,8	30,0	27,7	26,0	24,8	23,2	22,2	21,6	21,2	21,0	20,6	5,4
16	450	21,3	39,3	37,0	33,4	30,7	28,5	26,7	25,5	23,9	22,9	22,2	21,6	21,4	20,9	5,4
17	450	19,4	37,4	34,0	31,2	28,6	26,3	24,7	23,5	22,0	21,1	20,6	20,1	19,8	19,6	8,5

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A3 – Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento I do Capítulo 3.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{Amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
1	300	18,0	29,1	27,1	24,9	-	-	20,4	-	18,7	-	18,0	17,7	17,7	17,7	8,5
2	600	19,7	26,8	24,5	23,6	23,2	22,8	22,3	-	21,9	-	21,4	21,6	21,5	21,5	6,6
3	600	19,0	41,0	36,3	33,0	30,0	27,4	25,6	24,1	22,0	21,0	20,2	19,6	19,5	19,2	5,7
4	300	17,1	30,7	29,3	27,2	-	23,6	22,8	-	20,6	-	19,4	19,0	18,9	18,8	9,6
5	600	18,9	40,7	37,2	33,5	30,2	27,7	25,8	24,3	22,4	21,2	20,5	19,8	19,6	19,4	5,6
6	300	17,8	32,2	30,8	28,3	26,1	24,2	22,8	21,8	20,5	19,7	19,2	18,8	18,5	18,4	9,9
7	300	20,0	33,2	31,0	29,0	27,1	25,7	24,7	-	22,9	-	22,1	21,7	21,7	21,6	12,2
8	600	18,8	41,1	36,8	33,0	29,7	27,2	25,5	24,1	22,2	21,3	20,6	19,9	19,7	19,6	5,7
9	450	18,4	35,9	34,4	33,0	29,9	26,6	24,6	-	20,9	-	19,6	19,1	18,8	18,6	6,7
10	450	19,0	35,3	33,0	30,5	27,9	25,9	24,2	-	21,3	-	19,3	18,8	18,0	18,1	6,2
11	450	20,4	38,8	36,0	34,3	31,3	29,0	27,1	-	24,2	-	22,8	22,3	22,2	21,9	10,0

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A4 – Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento II do Capítulo 3.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{Amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
1	300	19,4	34,3	32,9	31,7	31,1	29,8	29,2	-	27,1	26,4	25,9	25,4	25,2	25,0	12,0
2	600	19,4	44,2	-	-	36,0	33,7	32,7	-	29,2	27,6	26,7	25,9	25,5	25,1	8,4
3	600	19,4	42,5	39,3	37,0	35,3	33,8	32,3	-	29,0	27,6	26,6	25,6	25,4	25,0	4,9
4	300	20,4	34,9	32,1	29,4	26,6	24,8	23,5	22,6	21,6	21,1	20,6	20,3	20,1	19,9	10,5
5	600	18,7	41,8	39,6	36,4	33,4	31,9	28,7	27,0	24,8	23,5	22,6	21,8	21,6	21,3	6,6
6	300	21,6	34,8	31,6	28,7	26,7	24,9	23,7	22,8	21,3	20,6	20,4	20,1	20,1	19,9	10,9
7	300	20,4	34,5	33,0	31,0	28,5	26,9	25,0	23,9	22,3	21,5	21,0	20,6	20,5	20,1	11,3
8	600	20,3	43,0	39,5	36,6	32,7	30,0	28,1	26,7	24,5	23,3	22,6	21,9	21,6	21,4	7,0
9	450	19,4	38,3	35,4	33,6	32,2	31,1	30,1	-	27,7	26,8	26,1	25,5	25,2	25,0	9,0
10	450	19,4	39,4	37,3	35,2	33,4	32,2	31,0	-	28,5	27,3	26,6	25,8	25,6	25,2	8,9
11	450	22,1	40,6	37,3	35,3	33,6	32,7	31,5	30,4	29,0	27,8	27,1	26,3	26,1	25,8	9,4

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A5 – Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento III do Capítulo 3.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
1	300	19,6	33,4	31,7	29,6	27,2	25,3	23,7	22,6	21,2	20,4	19,9	19,5	19,4	19,1	10,7
2	300	20,0	34,4	31,8	29,1	27,0	25,2	23,9	22,9	21,7	21,0	20,5	20,2	20,1	19,9	8,1
3	300	21,4	36,0	33,6	31,3	29,0	27,3	25,9	24,8	23,6	22,9	22,4	22,2	22,0	21,9	13,0
4	300	20,5	34,8	33,3	30,6	28,7	26,7	25,4	24,2	22,5	21,6	21,0	20,5	20,4	20,2	8,5
5	600	22,2	44,7	41,0	36,3	32,9	30,3	28,4	27,1	25,4	24,5	23,8	23,2	22,9	22,6	8,1
6	600	20,4	42,6	38,6	35,0	31,7	28,9	27,0	25,4	23,5	22,3	21,6	21,0	20,7	20,5	5,7
7	600	20,6	42,4	38,1	34,9	32,1	29,6	27,7	26,2	24,1	22,8	22,1	21,7	21,1	20,8	7,7
8	600	20,1	42,4	39,2	36,2	33,4	30,5	28,9	27,6	25,0	23,7	22,7	22,0	21,7	21,4	7,4
9	450	20,8	40,1	35,9	32,6	29,7	27,5	25,9	24,6	23,0	22,2	21,6	21,3	21,1	20,8	6,5
10	450	19,7	38,0	-	31,1	28,0	25,8	24,3	23,4	22,2	21,5	21,1	20,8	20,5	20,5	8,1
11	450	21,1	39,9	38,0	35,2	32,2	29,7	27,8	26,2	24,2	22,9	22,2	21,7	21,4	21,2	6,6
12	450	20,5	39,6	36,0	32,9	30,0	27,9	26,3	25,0	23,4	22,5	22,0	21,5	21,4	21,2	6,8
13	198	21,4	31,8	31,2	29,8	27,4	25,8	24,6	23,5	22,2	21,7	21,3	20,8	20,6	20,5	12,3
14	702	20,8	45,5	41,7	38,1	34,8	32,1	29,7	27,9	25,7	24,1	23,2	22,6	22,0	21,6	5,1
15	450	20,2	38,3	36,0	33,1	30,5	28,3	26,4	25,3	23,6	22,6	21,9	21,3	21,1	20,9	9,7
16	450	19,5	38,6	34,6	30,9	28,3	26,1	24,7	23,5	22,0	21,3	20,8	20,4	20,2	20,0	8,0
17	450	19,7	38,9	36,2	33,3	30,3	28,1	26,2	25,1	23,0	22,0	21,8	20,6	20,5	20,4	7,9

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A6 – Registro das temperaturas durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para o Experimento IV do Capítulo 3.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
1	300	20,8	35,6	33,7	30,5	27,9	25,9	24,3	23,2	21,0	20,8	20,2	19,7	19,6	19,4	11,0
2	300	19,7	34,7	33,4	30,6	28,4	26,3	24,7	23,6	21,9	20,9	20,4	19,9	19,7	19,6	10,5
3	300	20,4	35,1	32,9	30,0	27,7	25,6	24,0	22,8	21,3	20,4	19,9	19,6	19,4	19,2	10,3
4	300	19,6	34,2	31,8	29,5	27,2	25,4	23,8	22,8	21,4	20,6	20,1	19,7	19,6	19,5	10,3
5	600	19,6	42,4	38,9	35,7	31,9	29,2	26,3	25,8	23,7	22,4	21,7	21,1	20,6	20,4	5,5
6	600	19,6	42,4	39,3	35,9	32,9	30,2	28,0	26,4	24,1	22,8	21,9	21,2	20,8	20,5	5,8
7	600	20,0	42,2	37,0	33,9	30,5	28,4	26,7	25,3	23,5	22,5	21,8	21,2	21,1	20,7	5,9
8	600	20,7	42,4	38,7	35,4	32,5	29,9	27,8	26,2	23,7	22,6	22,0	21,3	21,1	20,8	6,1
9	450	19,9	38,2	34,4	31,4	29,0	27,0	25,2	23,9	22,2	21,3	20,7	20,1	19,9	19,7	7,6
10	450	19,7	38,4	34,4	30,9	28,4	26,2	24,6	23,5	22,2	21,4	20,8	20,5	20,2	19,9	8,0
11	450	19,2	37,4	34,9	32,1	29,2	27,0	25,1	23,7	21,9	20,9	20,2	19,7	19,6	19,3	8,2
12	450	19,0	38,2	34,3	31,5	28,7	26,4	24,7	23,5	21,9	20,9	20,5	19,9	19,7	19,5	8,1
13	198	20,1	30,6	29,2	28,1	26,1	24,1	23,2	22,0	20,5	19,9	19,4	19,0	18,9	18,8	13,0
14	702	19,9	45,5	41,4	37,6	34,1	31,2	28,7	27,0	24,3	22,6	21,6	20,9	20,5	20,1	4,6
15	450	19,5	38,0	35,2	31,9	29,2	26,8	25,0	23,6	21,8	20,8	20,4	19,8	19,6	19,4	8,4
16	450	19,6	37,8	34,7	32,3	29,8	27,8	25,9	24,6	22,5	21,5	20,8	20,2	19,9	19,7	8,2
17	450	19,6	37,7	33,4	30,4	28,0	25,9	24,6	23,4	21,9	21,1	20,5	20,1	19,9	19,7	8,4

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A7 - Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 2) e Experimentos III e IV (Capítulo 3) - 1º lote - – para as análises de teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese e cromatografia.

Exp./ Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{Amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
I.3	300	20,2	34,4	32,9	29,8	27,6	25,7	24,0	22,6	21,0	19,9	19,4	18,9	18,8	18,7	10,0
I.11	450	18,9	38,0	33,8	30,4	28,4	26,4	24,6	23,5	21,7	20,6	20,2	19,7	19,5	19,2	7,5
I.14	702	19,6	43,5	38,2	34,7	31,4	29,0	27,0	25,6	23,8	22,6	21,9	21,3	21,1	20,8	4,3
II.5	600	18,9	41,3	37,8	34,6	31,6	29,2	27,2	25,6	23,5	22,2	21,4	20,7	20,4	20,1	5,7
II.9	450	17,8	36,6	34,8	32,2	28,8	26,7	25,0	23,7	22,0	21,0	20,3	19,7	19,5	19,3	7,6
II.12	450	18,9	37,8	35,4	32,7	30,1	27,7	25,9	24,5	22,4	21,3	20,7	19,9	19,7	19,5	7,9
V.5	600	18,4	41,1	37,8	34,4	31,5	29,2	27,2	25,8	23,5	22,2	21,4	20,8	20,5	20,2	5,7
V.8	600	18,4	41,2	37,7	34,2	31,1	28,4	26,6	25,2	23,3	22,2	21,5	20,9	20,6	20,5	5,9
V.14	702	18,9	44,4	40,7	37,2	33,9	31,2	29,0	27,2	24,8	23,4	22,5	21,7	21,5	21,1	4,2
VI.3	300	18,4	32,8	31,3	29,4	27,2	25,3	23,7	22,6	20,9	20,1	19,6	19,1	18,9	18,7	10,0
VI.7	600	19,2	42,0	38,4	35,1	32,1	29,6	27,5	25,9	23,8	22,6	21,8	21,2	20,9	20,5	6,1
VI.9	450	18,5	37,4	34,4	31,5	28,9	26,7	25,2	23,8	22,2	21,2	20,8	20,1	19,9	19,7	7,9

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A8 - Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 2) e Experimentos III e IV (Capítulo 3) - 2º lote – para as análises de teor de sulfidril livre, calorimetria diferencial de varredura, eletroforese e cromatografia.

Exp./ Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{Amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
I.3	300	20,7	34,6	32,4	30,0	27,3	25,2	23,7	22,6	21,3	20,4	19,9	19,5	19,3	19,1	10,4
I.11	450	19,7	38,1	35,5	32,1	29,4	27,3	25,4	23,9	22,2	21,3	20,6	20,0	19,7	19,6	7,5
I.14	702	19,2	44,7	41,1	37,8	34,2	31,3	29,0	27,2	24,6	23,2	22,3	21,5	21,2	20,8	4,3
II.5	600	19,3	42,2	38,2	34,8	31,2	28,7	26,7	25,2	23,1	21,9	21,2	20,5	20,4	20,1	5,5
II.9	450	19,2	37,4	34,1	31,3	28,7	26,4	24,8	23,7	21,9	21,1	20,5	20,1	19,8	19,6	7,9
II.12	450	18,7	37,6	35,1	32,1	29,5	27,3	25,7	24,3	22,5	21,5	20,8	20,3	20,1	19,8	7,8
V.5	600	18,4	41,3	37,3	33,7	30,4	28,0	26,6	24,6	22,8	21,8	21,2	20,5	20,4	20,2	5,6
V.8	600	19,5	42,1	39,4	36,4	33,1	30,3	28,4	26,5	24,1	22,7	21,9	21,1	20,8	20,5	5,9
V.14	702	19,9	43,3	38,0	34,0	31,2	29,0	27,1	25,9	23,8	22,8	22,1	21,5	21,1	20,8	4,3
VI.3	300	20,8	35,3	33,4	30,8	28,5	26,4	24,8	23,5	21,8	20,8	20,1	19,7	19,5	19,4	10,6
VI.7	600	19,9	42,1	38,8	35,1	32,2	29,7	27,6	25,8	23,7	22,2	21,5	20,7	20,4	20,1	5,4
VI.9	450	19,2	37,6	35,2	32,5	29,8	27,4	25,8	24,4	22,5	21,4	20,8	20,1	19,8	19,7	8,0

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A9 - Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 2) e Experimentos III e IV (Capítulo 3) - 3° lote – para as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Exp./ Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{Amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
I.3	300	19,8	34,2	31,5	28,7	26,5	24,7	23,3	22,4	21,2	20,5	20,1	19,8	19,7	19,6	10,8
I.11	450	19,4	38,7	35,0	32,1	28,7	26,3	24,2	23,0	21,5	20,7	20,1	19,7	19,7	19,6	7,9
I.14	702	19,9	46,0	41,0	36,5	34,0	31,8	30,1	26,9	24,1	22,9	22,0	21,3	20,9	20,7	6,5
II.5	600	19,4	40,1	35,6	30,8	27,8	25,6	24,1	22,7	21,1	20,4	19,8	19,3	19,1	18,9	4,7
II.9	450	19,8	38,8	34,8	31,5	28,5	26,1	24,5	23,2	21,6	20,6	20,1	19,6	19,4	19,2	7,6
II.12	450	20,2	39,4	35,6	32,8	31,5	28,5	26,0	23,6	21,8	20,5	19,7	19,1	18,7	18,6	7,3
V.5	600	20,5	44,0	39,0	33,9	30,1	27,6	25,7	24,5	22,6	21,6	20,9	20,4	20,2	19,9	5,7
V.8	600	19,7	41,3	36,7	32,6	29,2	27,0	25,2	23,9	22,4	21,5	20,9	20,5	20,4	20,2	5,9
V.14	702	20,4	44,0	38,6	33,6	30,1	27,4	25,8	24,5	22,9	21,8	21,4	20,8	20,6	20,5	4,2
VI.3	300	20,1	32,8	29,7	26,2	23,4	22,0	20,8	20,1	19,1	18,6	18,2	18,1	18,0	18,0	9,6
VI.7	600	20,3	35,6	29,4	25,8	23,7	22,3	21,5	20,9	20,2	19,7	19,6	19,4	19,3	19,2	3,4
VI.9	450	19,7	37,7	34,4	31,3	28,6	26,0	24,3	23,0	21,2	20,1	19,6	18,9	18,7	18,5	7,0

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A10 - Controle de temperatura durante os 20 minutos de tratamento sob alta pressão isostática para a execução das análises de teor de fitato e de inibidor de tripsina (Capítulo 4).

Amostra	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)														
		T _{Amostra}	T _{inicial}	T _{1min}	T _{2min}	T _{3min}	T _{4min}	T _{5min}	T _{6min}	T _{8min}	T _{10min}	T _{12min}	T _{15min}	T _{17min}	T _{20min}	T _{final}
1	200	21,6	31,9	28,9	26,8	24,9	23,5	22,5	21,6	20,6	20,0	19,7	19,5	19,3	19,2	12,6
2	300	20,1	34,6	32,7	30,2	27,4	25,8	24,2	23,2	21,5	20,7	20,2	19,8	19,7	19,5	10,7
3	400	20,2	38,4	35,6	32,8	30,0	27,4	25,6	24,3	22,4	21,3	20,8	20,3	20,0	19,9	8,8
4	500	19,6	40,2	37,7	34,9	31,9	29,4	27,4	25,9	23,7	22,1	21,5	20,8	20,5	20,3	7,1
5	600	19,7	42,9	39,6	36,2	33,2	30,4	28,1	26,3	24,2	22,9	22,2	21,4	21,1	20,8	5,6
6	700	20,1	45,7	41,7	38,0	34,9	31,9	29,6	27,8	25,2	23,6	22,7	21,8	21,5	21,1	4,0
Repetição																
1	200	21,5	31,9	30,4	28,2	26,5	24,9	23,8	22,9	21,6	21,1	20,7	20,4	20,2	20,1	13,9
2	300	20,8	35,0	33,4	31,0	28,7	27,0	25,5	24,2	22,5	21,9	21,3	20,8	20,6	20,5	11,8
3	400	20,7	37,9	35,6	32,6	30,0	27,6	26,1	24,8	23,1	22,2	21,5	21,1	20,8	20,7	10,3
4	500	20,8	41,5	38,1	34,7	31,8	29,4	27,5	26,1	24,2	23,2	22,4	21,7	21,5	21,3	8,5
5	600	20,4	44,0	41,4	38,2	34,9	32,1	29,7	27,9	25,5	23,9	23,1	22,2	22,0	21,6	6,5
6	700	20,9	46,5	42,0	38,3	35,1	32,5	30,2	28,5	26,1	24,6	23,6	22,7	22,4	22,0	5,1

Sendo: T_{amostra} = temperatura da amostra dentro do equipamento antes da pressurização; T_{inicial} = temperatura dentro do equipamento quando se atinge a pressão desejada e T_{final} = temperatura mínima que a amostra atinge dentro do equipamento após o termino do processamento sob alta pressão.

TABELA A11 – Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para o Experimento I do Capítulo 5.

Ensaio	Pressão (MPa)	T _{ambiente}	Temperatura (°C)												Variação de pressão (MPa)
			Leitura 1			Leitura 2			Leitura 3			Leitura 4			
			T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	
1	100	22,4	26,5	50,4	26,9	26,6	49,9	26,8	27,2	48,2	26,8	26,4	47,7	26,6	90-140
2	100	22,2	26,7	46,9	26,4	26,9	48,6	26,3	26,7	48,6	26,4	26,3	49,1	26,1	70-130
3	200	21,4	25,4	63,7	28,3	25,4	63,2	28,3	25,4	63,2	28,4	25,5	63,6	28,4	195-210
4	200	21,9	26,3	63,5	28,3	26,4	63,4	28,5	26,2	63,3	28,5	26,1	63,7	28,6	185-210
5	150	23,7	27,7	59,7	28,4	27,7	56,9	28,3	27,8	59,8	28,3	27,4	59,6	28,3	140-180
6	150	23,6	27,1	58,7	28,2	27,1	52,8	28,2	27,1	58,9	28,2	27,1	58,2	28,2	150-180
7	80	23,7	26,5	44,2	26,8	26,5	44,3	26,7	26,4	45,4	26,7	26,4	45,4	26,8	70-100
8	220	23,3	27,7	68,2	29,8	27,9	69,3	29,8	27,8	69,3	29,9	27,8	69,3	29,9	205-235
9	150	22,2	25,9	54,7	27,3	25,9	57,6	27,3	26,1	58,2	27,2	26,4	59,1	27,2	130-170
10	150	23,4	26,9	56,9	28,4	26,9	56,9	28,3	27,0	57,4	28,2	26,9	57,1	28,3	150-180
11	150	23,5	27,0	57,5	28,5	27,1	58,7	28,5	26,9	56,9	28,6	26,9	57,0	28,5	145-170

Sendo: T_{ambiente} = temperatura no momento do processamento da amostra; Canal 1 = temperatura da amostra na entrada da válvula de homogeneização; Canal 2 = temperatura da amostra na saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor; Canal 3 = temperatura da amostra na saída do trocador de calor. As leituras das temperaturas nos canais foram seqüenciais e o tempo entre estas leituras foi de 10 segundos.

TABELA A12 – Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para o Experimento II do Capítulo 5.

Ensaio	Pressão (MPa)	T _{ambiente}	Temperatura (°C)												Variação de pressão (MPa)
			Leitura 1			Leitura 2			Leitura 3			Leitura 4			
			T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	
1	100	23,7	24,3	44,7	27,2	24,3	46,2	27,1	24,3	45,3	27,2	24,3	45,2	27,1	90-110
2	100	23,8	24,9	44,7	26,9	24,9	45,8	26,9	24,8	37,9	26,9	24,8	45,2	26,7	90-115
3	200	23,9	27,3	64,3	28,9	27,9	65,1	29,2	27,3	65,8	29,2	27,4	63,9	29,3	180-220
4	200	16,8	19,6	58,0	26,8	19,7	57,8	26,8	19,8	57,9	26,8	19,8	58,9	26,8	190-220
5	150	24,0	25,9	55,2	28,2	26,4	55,2	28,2	26,0	54,5	28,4	25,9	55,2	28,5	135-165
6	150	17,2	19,7	50,4	25,6	19,7	50,2	25,7	19,7	49,4	25,7	19,8	49,9	25,7	140-160
7	80	23,6	23,9	40,3	26,2	23,9	40,7	26,3	23,9	40,6	26,2	23,8	40,4	26,3	75-90
8	220	23,8	28,3	68,7	29,8	27,8	69,8	29,7	28,4	70,7	29,8	28,2	70,2	29,8	205-235
9	150	17,3	20,3	50,8	25,6	20,4	40,9	25,6	20,4	54,7	25,4	20,5	52,7	25,6	130-170
10	150	17,8	21,2	50,7	26,1	21,2	50,8	26,0	21,2	51,8	26,0	21,3	52,9	26,0	145-180
11	150	24,3	26,4	55,8	28,1	26,4	57,8	28,1	26,5	56,1	28,1	26,3	56,4	28,2	145-165

Sendo: T_{ambiente} = temperatura no momento do processamento da amostra; Canal 1 = temperatura da amostra na entrada da válvula de homogeneização; Canal 2 = temperatura da amostra na saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor; Canal 3 = temperatura da amostra na saída do trocador de calor. As leituras das temperaturas nos canais foram seqüenciais e o tempo entre estas leituras foi de 10 segundos.

TABELA A13 – Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II (Capítulo 5) - 1º lote – para as análises de teor de sulfidril livre e eletroforese.

Ensaio	Pressão (MPa)	T _{ambiente}	Temperatura (°C)												Variação de pressão (MPa)
			Leitura 1			Leitura 2			Leitura 3			Leitura 4			
			T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	
Exp. I															
5	150	22,7	24,6	55,0	27,2	24,6	54,3	27,3	24,7	56,1	27,3	24,7	54,5	27,3	130-170
6	150	22,0	23,4	53,1	27,4	23,6	55,3	27,4	23,4	52,7	27,4	23,4	-	27,5	140-165
11	150	21,9	23,3	54,8	26,9	23,4	54,6	27,1	23,3	52,9	27,2	23,3	50,4	27,1	120-160
Exp. II															
2	100	22,4	23,9	45,4	26,2	23,9	44,7	26,1	23,9	44,5	26,2	-	-	-	80-120
3	200	21,7	24,3	62,6	27,8	24,1	63,0	27,9	24,1	62,4	27,9	24,1	62,5	28,0	180-220
6	150	22,8	24,8	57,4	27,4	24,7	55,1	27,4	24,4	54,2	27,4	-	-	-	140-170

Sendo: T_{ambiente} = temperatura no momento do processamento da amostra; Canal 1 = temperatura da amostra na entrada da válvula de homogeneização; Canal 2 = temperatura da amostra na saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor; Canal 3 = temperatura da amostra na saída do trocador de calor. As leituras das temperaturas nos canais foram seqüenciais e o tempo entre estas leituras foi de 10 segundos.

TABELA A14 – Registro das temperaturas durante o tratamento sob alta pressão dinâmica para as amostras selecionadas dos Experimentos I e II do Capítulo 5 - 2º lote – para as análises de calorimetria diferencial de varredura, microscopia eletrônica de varredura e cromatografia.

Ensaio	Pressão (MPa)	T _{ambiente}	Temperatura (°C)												Variação de pressão (MPa)
			Leitura 1			Leitura 2			Leitura 3			Leitura 4			
			T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	T _{canal 1}	T _{canal 2}	T _{canal 3}	
Exp. I															
5	150	23,6	25,8	56,6	27,4	25,8	56,6	27,5	25,9	56,4	27,3	26,1	56,3	27,3	135-160
6	150	23,4	25,4	56,6	27,3	25,5	55,2	27,4	25,6	56,5	27,3	25,7	56,7	27,3	140-155
11	150	23,7	26,5	57,3	27,6	26,3	56,1	27,6	26,3	56,3	27,6	26,3	57,3	27,6	140-175
Exp. II															
2	100	23,8	25,8	47,1	26,4	25,8	47,3	26,4	25,8	47,6	26,3	25,8	46,6	26,4	90-110
3	200	23,3	26,0	63,3	28,0	25,9	63,2	28,0	26,1	62,6	28,1	26,1	63,3	28,1	180-215
6	150	23,7	26,2	55,8	27,4	26,3	56,6	27,4	26,1	56,6	27,4	26,2	57,1	27,4	145-165

Sendo: T_{ambiente} = temperatura no momento do processamento da amostra; Canal 1 = temperatura da amostra na entrada da válvula de homogeneização; Canal 2 = temperatura da amostra na saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor; Canal 3 = temperatura da amostra na saída do trocador de calor. As leituras das temperaturas nos canais foram seqüenciais e o tempo entre estas leituras foi de 4 segundos.

ANEXO B

TABELA B1 – Dados levantados para a construção de curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA utilizada nos Experimentos sob alta pressão isostática (Capítulos 2 e 3).

Tubo	Média Absorbância	Y = Net Absorbância	Proteína/ μ g	X = padrão BSA
1	0,1743	0	0	0
2	0,701	0,5267	20	200
3	1,2805	1,1062	40	400
4	1,6025	1,4282	60	600
5	1,9975	1,8232	80	800
6	2,1094	1,9351	100	1000

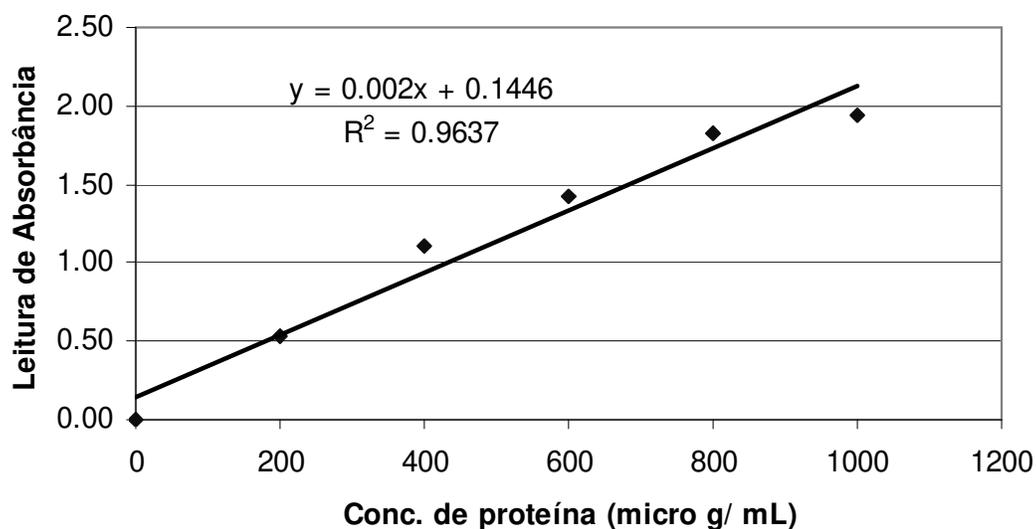


FIGURA B1 – Curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA, utilizada nos Experimentos sob alta pressão isostática (Capítulos 2 e 3).

TABELA B2 – Dados levantados para a construção de curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA, utilizada nos Experimentos sob alta pressão dinâmica (Capítulo 5).

Tubo	Leitura de Absorbância 1	Leitura de Absorbância 2	Média Absorbância	Y = Net Absorbância	Proteína/ μ g	X = padrão BSA
1	0,1983	0,2458	0,22205	0	0	0
2	0,6423	0,7036	0,67295	0,4509	20	200
3	1,0435	1,0549	1,04920	0,8272	40	400
4	1,4614	1,4708	1,46610	1,2441	60	600
5	1,7691	1,7985	1,78380	1,5618	80	800
6	2,0606	2,0997	2,08015	1,8581	100	1000

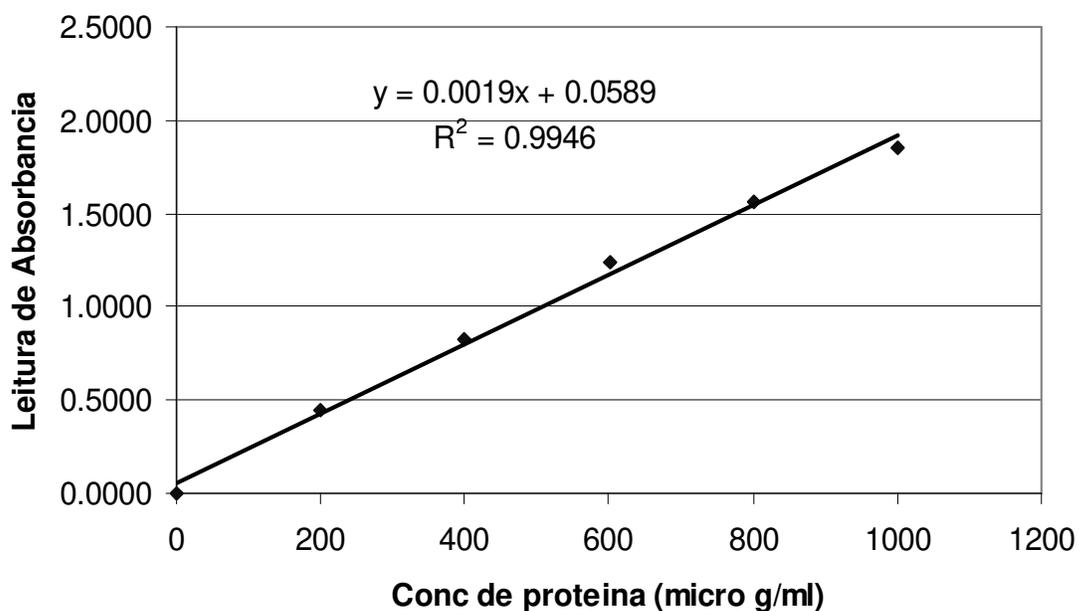


FIGURA B2 – Curva de calibração para determinação de proteína solúvel pelo método de BCA, utilizada nos Experimentos sob alta pressão dinâmica (Capítulo 5).

ANEXO C

TABELA C1 - Levantamento da curva de calibração de fitato.

Amostra	Leitura Absorbância 500 nm			Media	Desvio
Branco	0,5313	0,5333	0,5333	0,532633	0,001155
10	0,4167	0,4134	0,4105	0,413533	0,003102
20	0,3737	0,3799	0,3784	0,377333	0,003235
30	0,3996	0,3942	0,3961	0,396633	0,002739
40	0,3327	0,3258	0,3287	0,329067	0,003465
50	0,2968	0,2997	0,2998	0,298767	0,001704
60	0,2601	0,2592	0,2580	0,259100	0,001054

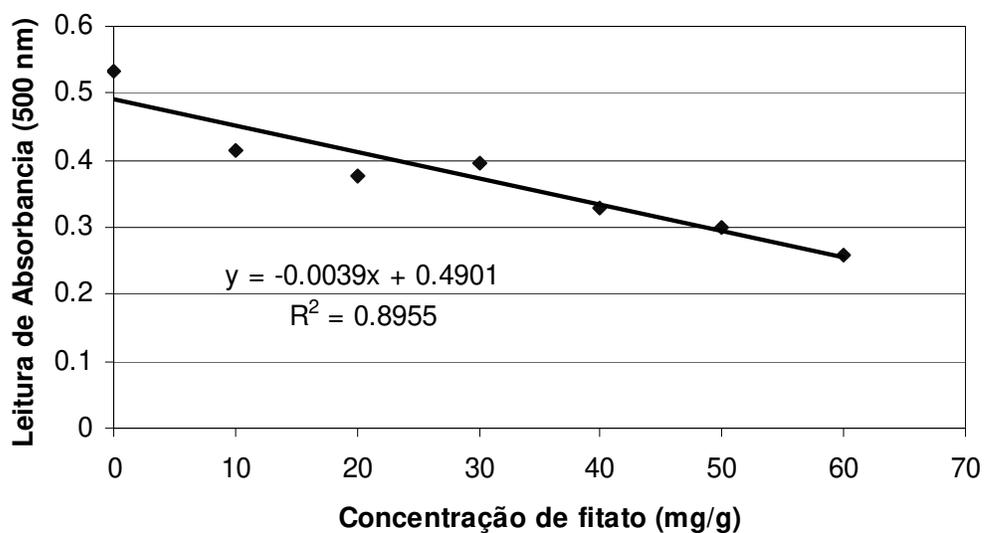


FIGURA C1 - Curva padrão para a determinação do teor de fitato (Capítulo 4).

ANEXO D

Tratamentos sob alta pressão isostática

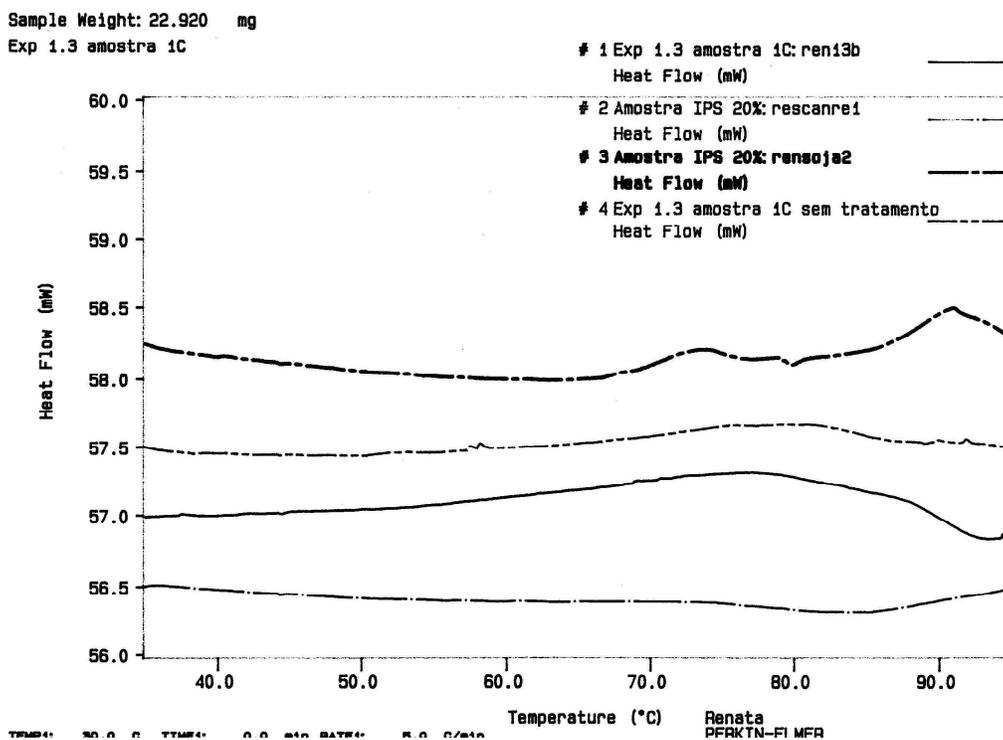


FIGURA D1 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 3 (1% de IPS, pH=4,00 e 300 MPa de pressão) do Experimento I (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

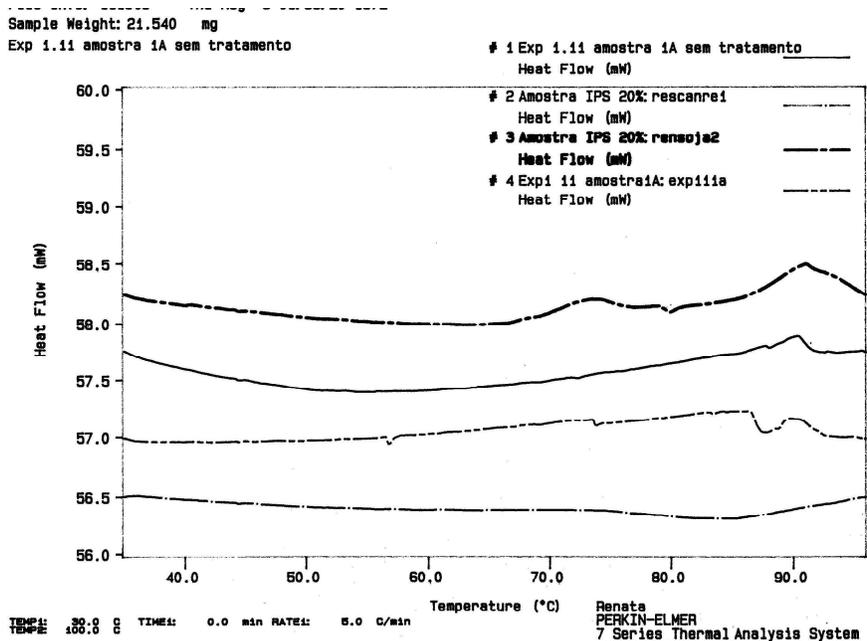


FIGURA D2 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 11 (2% de IPS, pH=2,66 e 450 MPa de pressão) do Experimento I (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

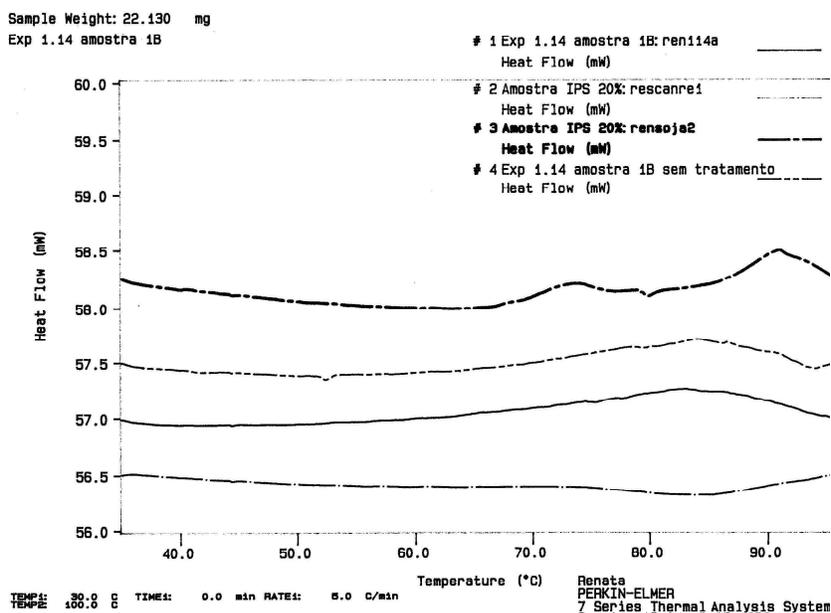


FIGURA D3 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 14 (2% de IPS, pH=3,50 e 702 MPa de pressão) do Experimento I (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

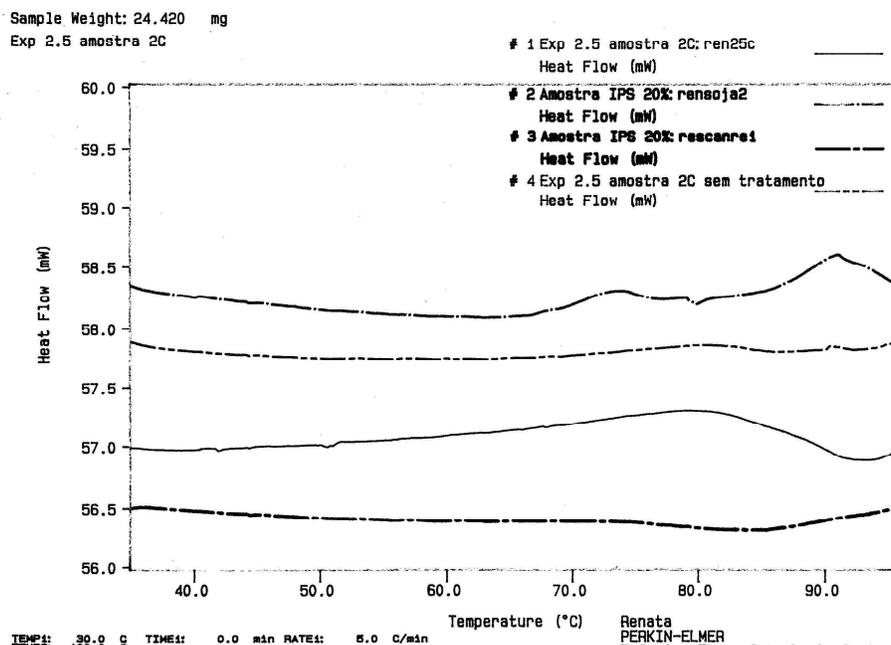


FIGURA D4 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 5 (1% de IPS, pH=5,50 e 600 MPa de pressão) do Experimento II (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

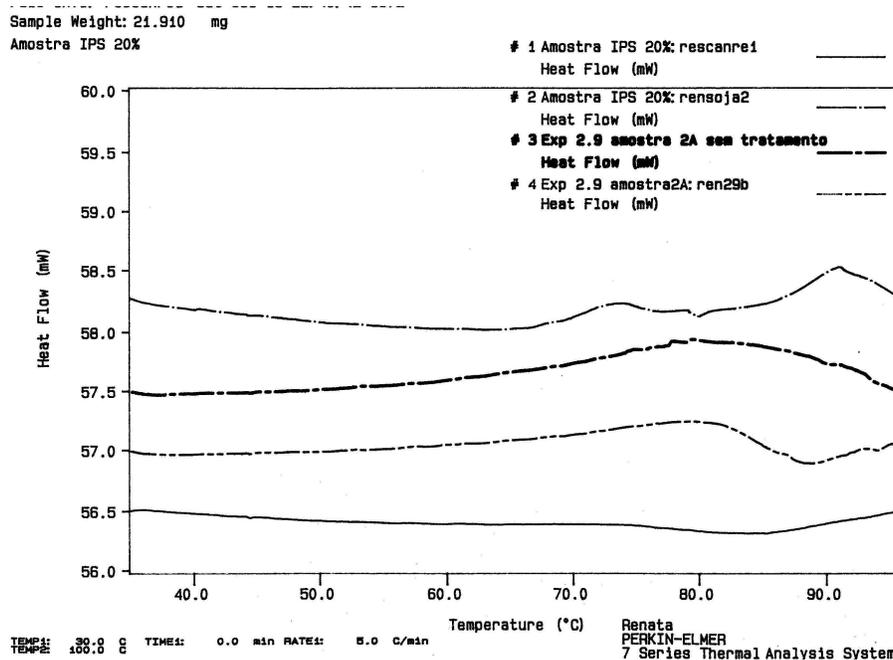


FIGURA D5 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 9 (0,32% de IPS, pH=6,00 e 450 MPa de pressão) do Experimento II (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

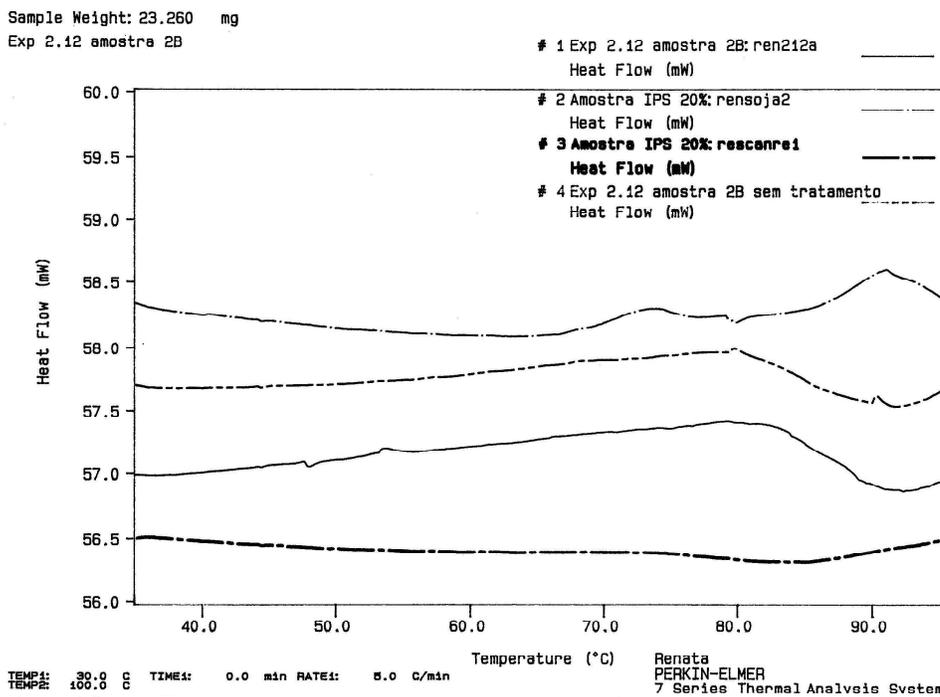


FIGURA D6 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 12 (2% de IPS, pH=6,84 e 450 MPa de pressão) do Experimento II (Capítulo 2), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

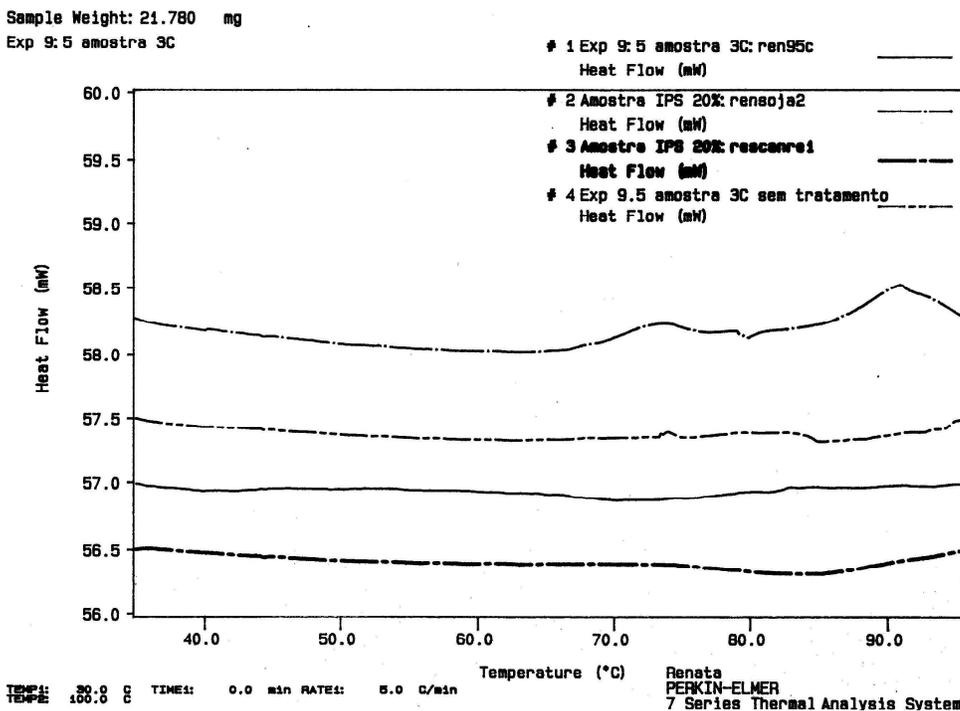


FIGURA D7 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 5 (1% de IPS, pH=3,00, 0,1 g de pectina e 450 MPa de pressão) do Experimento III (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

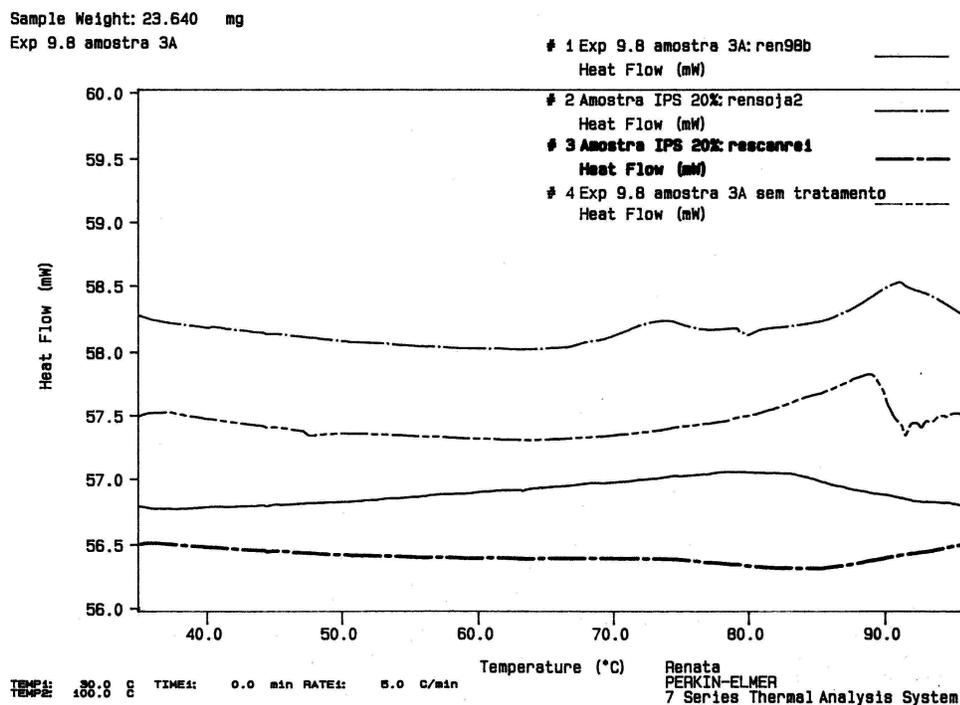


FIGURA D8 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 8 (1% de IPS, pH=4,00, 0,3 g de pectina e 600 MPa de pressão) do Experimento III (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

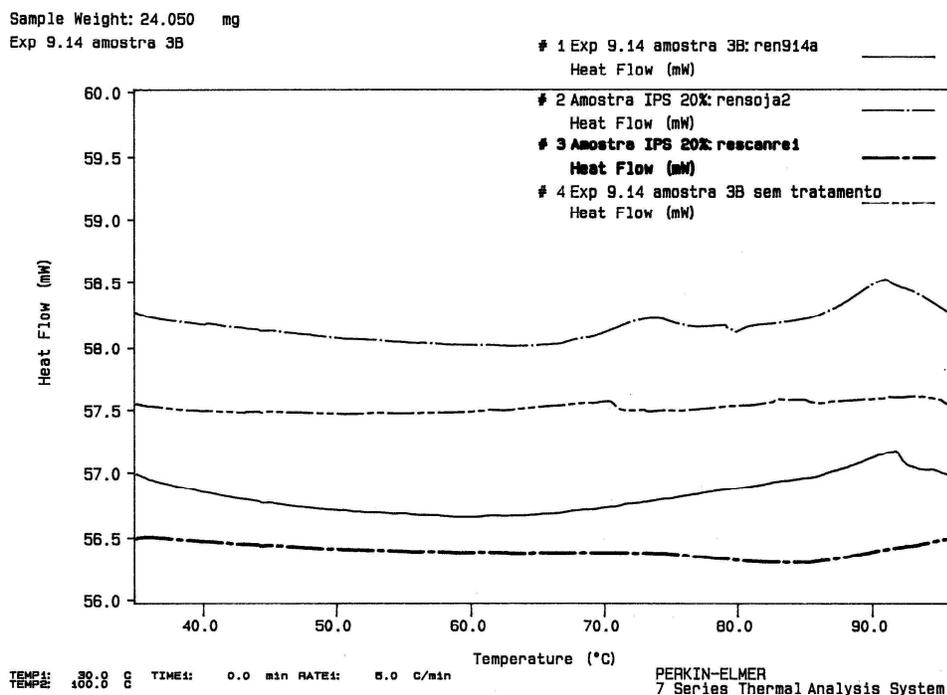


FIGURA D9 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 14 (1% de IPS, pH=3,50, 0,2 g de pectina e 702 MPa de pressão) do Experimento III (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

Sample Weight: 22.130 mg
Exp 10.3 amostra 4C

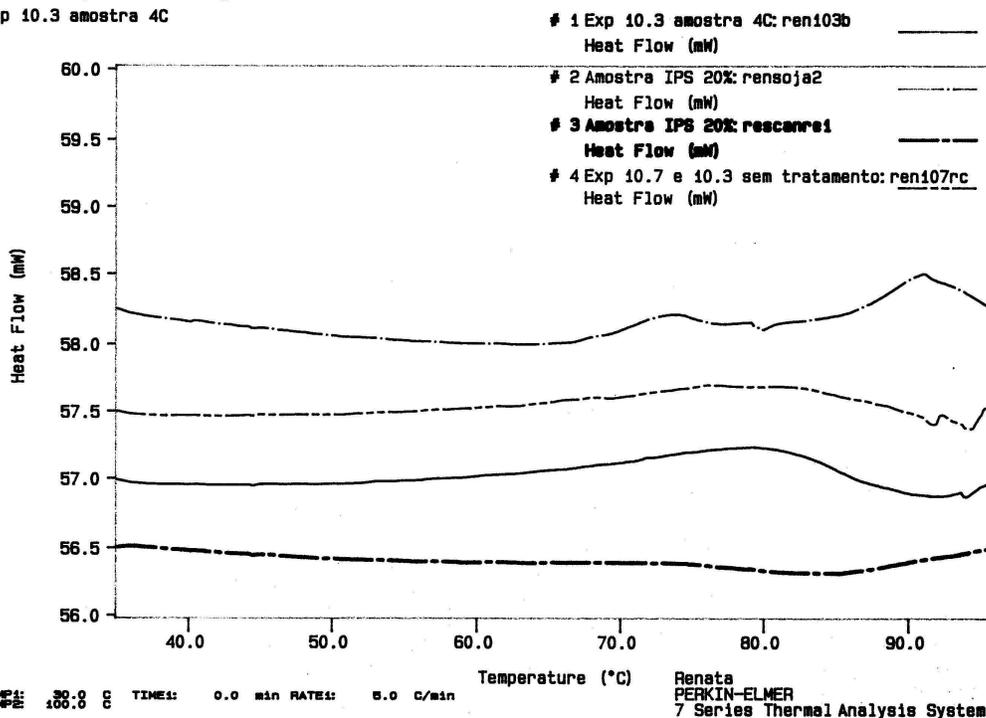


FIGURA D10 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 3 (1% de IPS, pH=6,50, 0,1 g de κ -carragena e 300 MPa de pressão) do Experimento IV (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

Sample Weight: 24.600 mg
Amostra IPS 20%

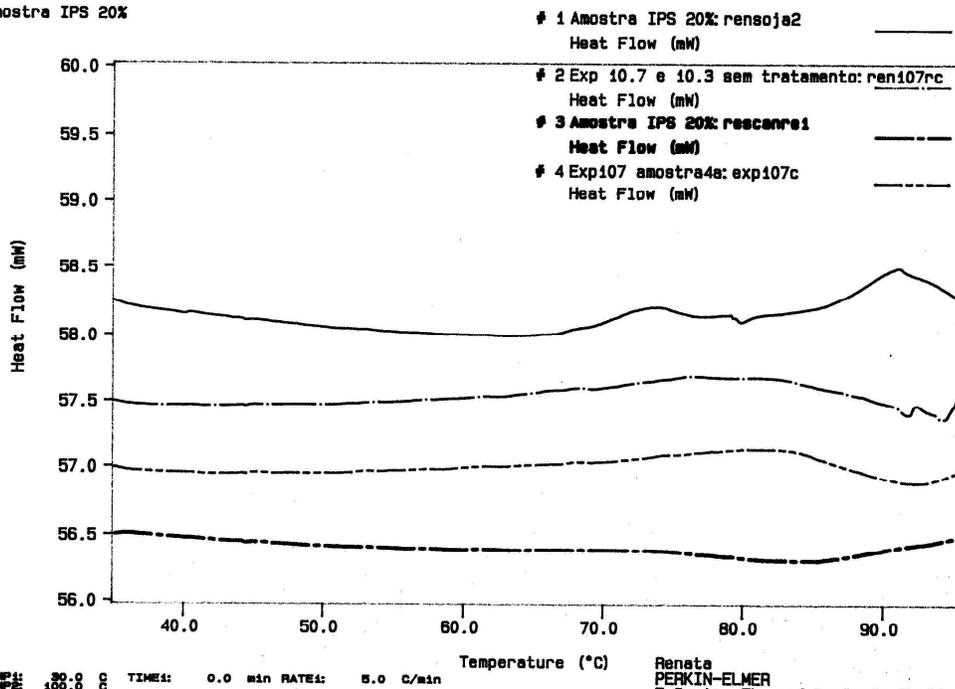


FIGURA D11 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 7 (1% de IPS, pH=6,50, 0,1 g de κ -carragena e 600 MPa de pressão) do Experimento IV (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

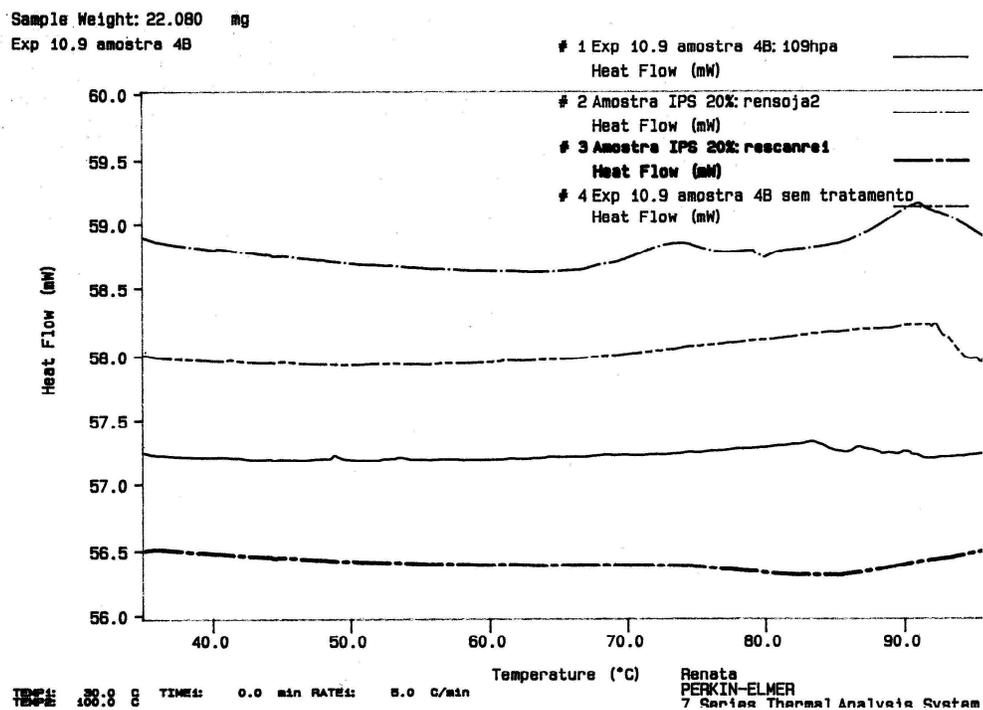


FIGURA D12 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) do ensaio 9 (1% de IPS, pH=6,00, 0,032 g de κ -carragena e 450 MPa de pressão) do Experimento IV (Capítulo 3), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

Tratamentos sob alta pressão dinâmica

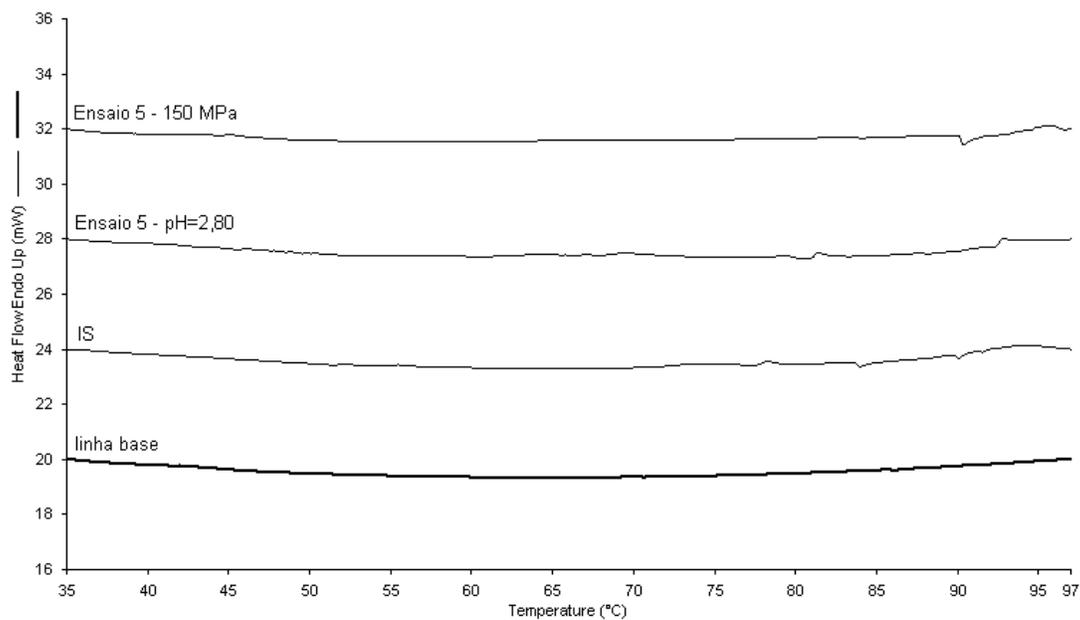


FIGURA D.13 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 5 do Experimento I (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

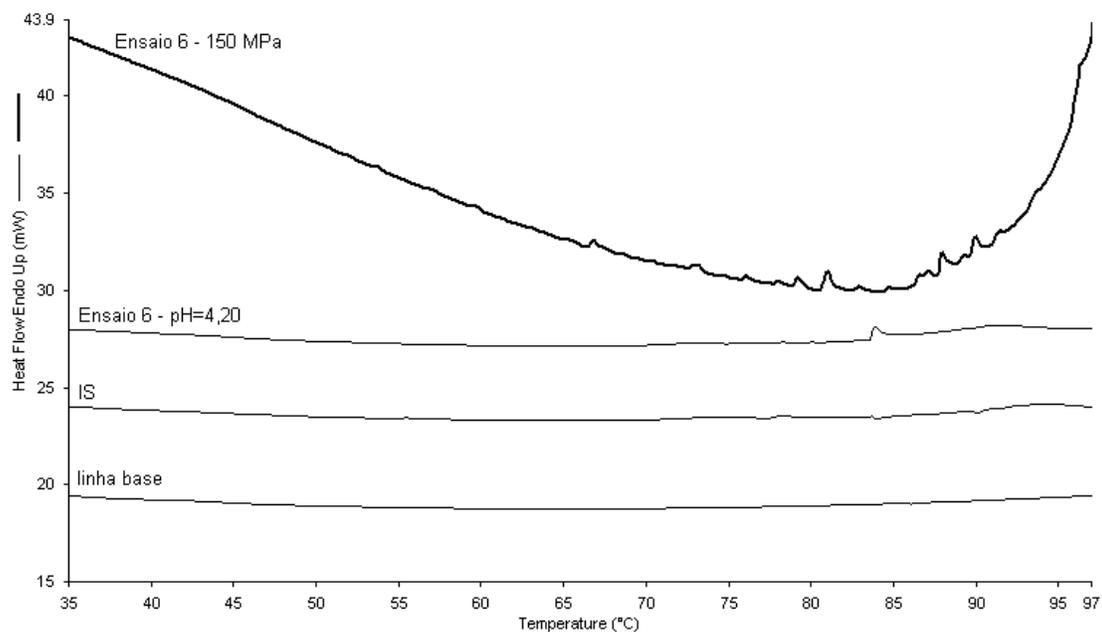


FIGURA D.14 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 6 do Experimento I (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

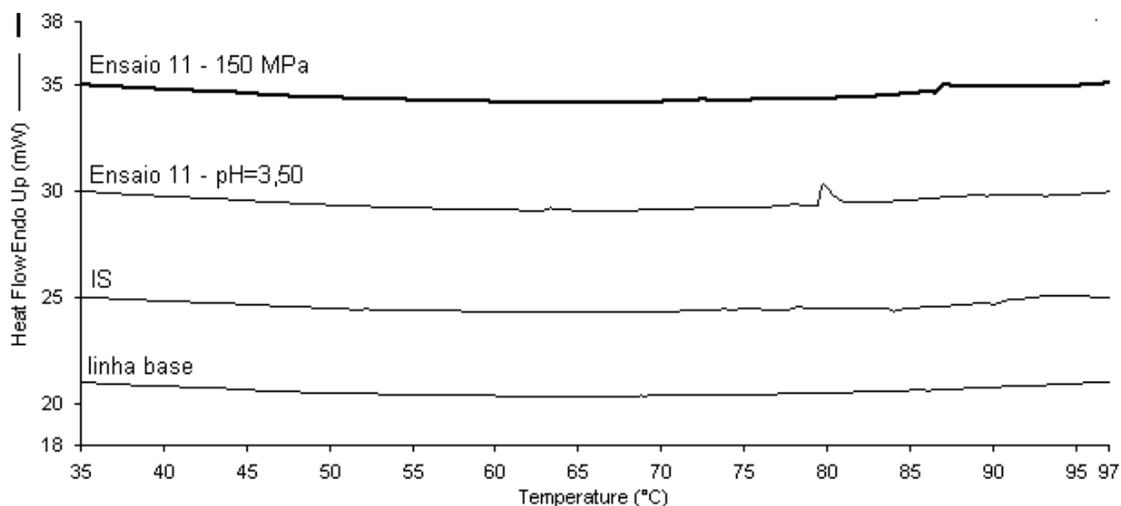


FIGURA D.15 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 11 do Experimento I (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

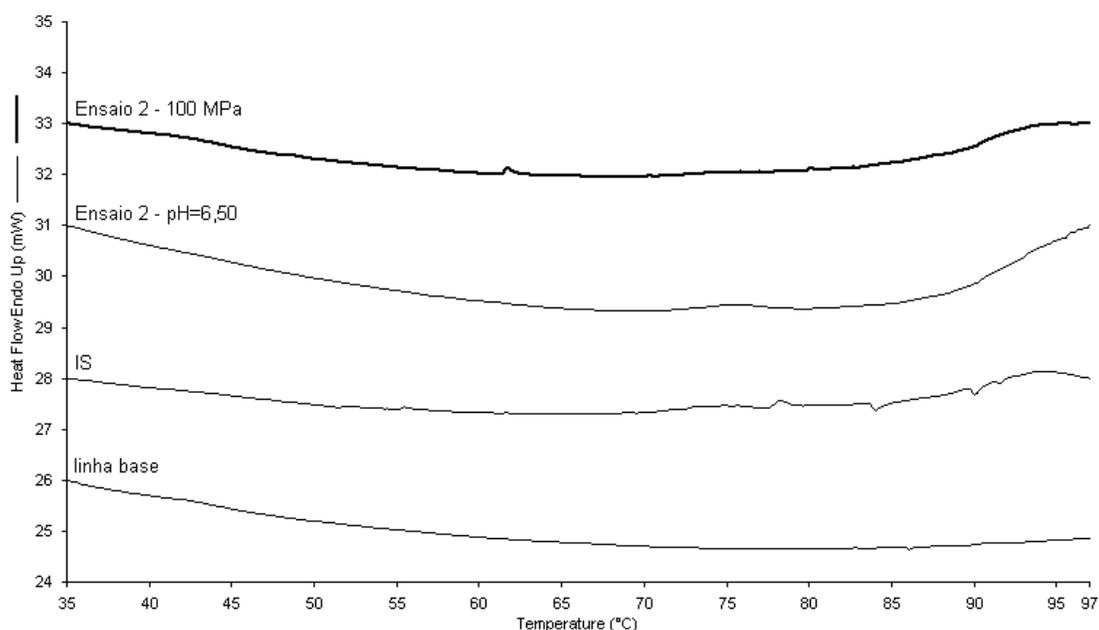


FIGURA D.16 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 2 do Experimento II (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

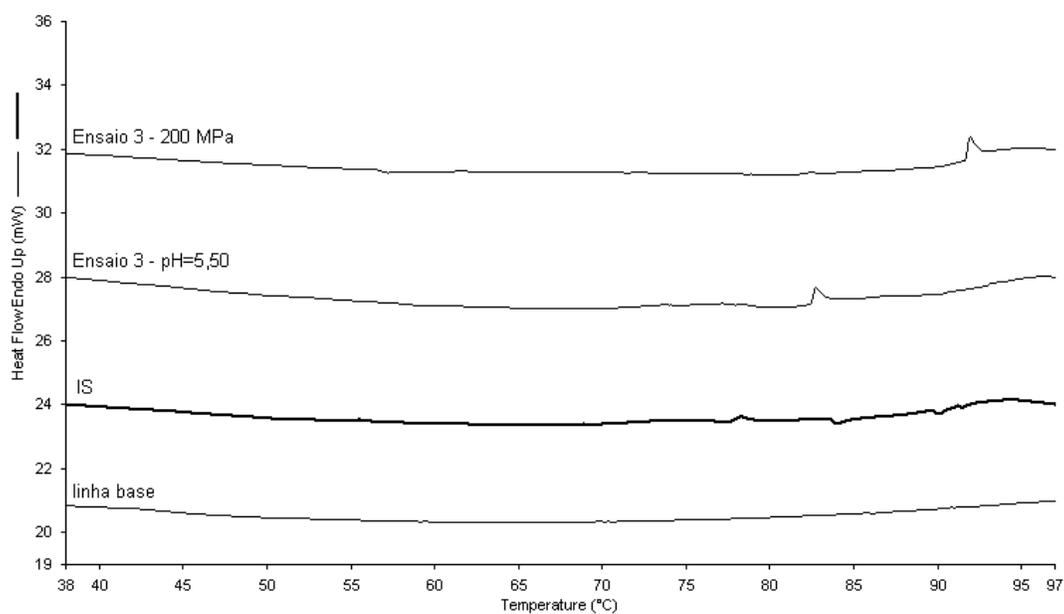


FIGURA D.17 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 3 do Experimento II (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.

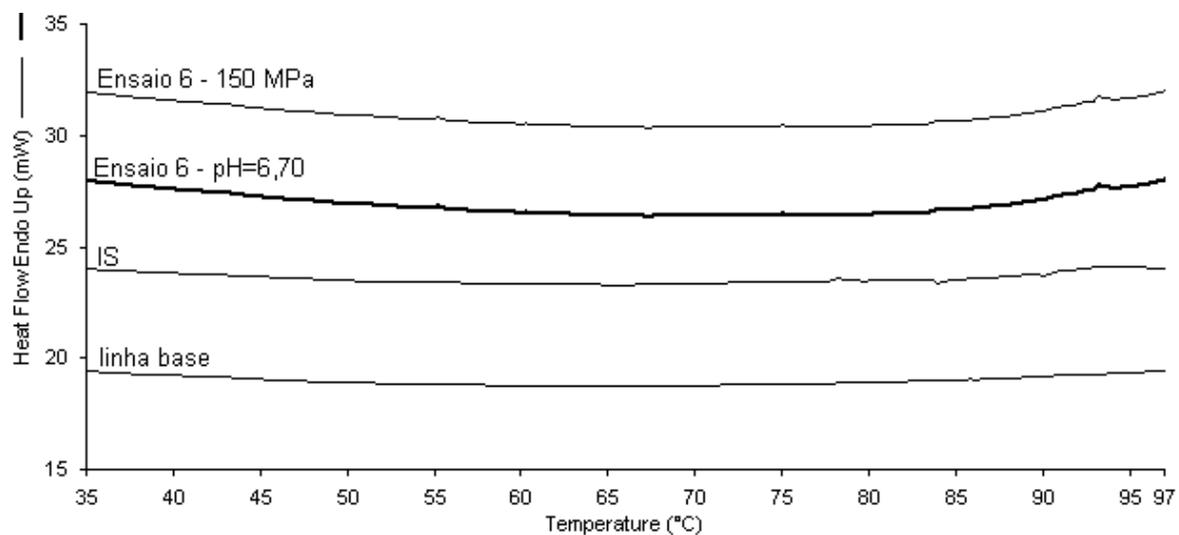


FIGURA D.18 – Termograma de calorimetria diferencial de varredura (CDV) da amostra do ensaio 6 do Experimento II (Capítulo 5), com velocidade de aquecimento de 5°C /minuto.