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

A INFLUÊNCIA DE ÍONS CÁLCIO NAS CARACTERÍSTICAS DE SOLUBILIDADE, TEXTURA E CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA DE GÉIS DE CONCENTRADOS E ISOLADO PROTÉICOS DE SORO DE LEITE

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Eliana Maria Pettirossi Motta,** aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de fevereiro de 2002.

Campinas, 27 de fevereiro de 2002

Prof. Dr. Aloísio José Antunes
Presidente da Banca

ELIANA MARIA PETTIROSSI MOTTA
Licenciada em Matemática

PROF. DR. ALOÍSIO JOSÉ ANTUNES
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição

Campinas, SP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP M858i
V EX
TOMBO BC/ 48725
PROC. 16-837/02
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 01/05/02
Nº CPD

CM00167114-4

BIB ID 239217

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M858i

Motta, Eliana Maria Pettirossi
A influência de íons cálcio nas características de solubilidade, textura e capacidade de retenção de água de géis de concentrados e isolado protéicos de soro de leite / Eliana Maria Pettirossi Motta. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Aloísio José Antunes
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Soro do leite. 2.Cálcio. 3.Solubilidade. 4.Gelatinização. 5.Eletroforese. I.Antunes, Aloísio José. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em de de 2002, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Aloísio José Antunes
Orientador

Prof^a. Dr^a. Hélia Harumi Sato
Membro

Prof^a. Dr^a. Mirna Lúcia Gigante
Membro

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Suplente

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRA
SEÇÃO CIRCULANT

Dedico

Ao Marcos e aos
meus amados filhos,
Giovana, Caroline e Eduardo,
pela paciência, compreensão e amor,
que me permitiram realizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aloísio José Antunes pela orientação e confiança.

Aos profissionais do DEPAN, Soely, Francisco, Célis, Beth, Fátima, Cidinha e Gustavo pela colaboração e amizade.

Às amigas de longa data, Júlia Geracila, Márcia Marques, Márcia Luvielmo e Marta, pelo incentivo e exemplo de vida.

A minha mais que amiga, Kity, meu agradecimento especial por tanta amizade e colaboração.

Às amigas Rose, Cris, Helenice e Karla pelo incentivo, colaboração e alegrias.

Ao Cosme, pela paciência.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões valiosas.

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

ÍNDICE

ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Proteínas do soro	3
2.2 Produção de concentrados (CPSs) e isolados protéico de soro de leite	5
2.3 Propriedades funcionais e aplicações de CPSs e IPSs	7
2.4 Solubilidade de concentrados protéicos de soro	8
2.5 Gelatinização de concentrados protéicos de soro de leite	10
2.6 Fatores que influenciam a gelatinização de CPSs e IPSs	13
2.6.1 Concentração de proteína	13
2.6.2 Temperatura	15
2.6.3 pH	15
2.6.4 Concentração de sulfidrílas	17
2.6 5 Associações hidrofóbicas	18
2.6.6. Concentrações de sais	18
2.6.6.1 Influência de íons cálcio no perfil de textura (TPA)	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Matéria-prima	24
3.2 Metodologia	24
3.2.1 Caracterização da matéria-prima	24
3.2.1.1 Determinação de umidade	24
3.2.1.2 Determinação de proteína bruta	24
3.2.1.3 Determinação de gordura	24
3.2.1.4 Determinação de matéria inorgânica (cinzas)	24

3.2.1.5 Determinação de cálcio, sódio, magnésio e potássio 25
3.2.1.6 Determinação de fósforo 25
3.2.1.7 Determinação de sulfidrilas reativas 25
3.2.1.8 Determinação de solubilidade protéica 26
3.2.1.9 Perfil eletroforético 26
3.2.2 Caracterização das soluções protéicas 27
3.2.2.1 Diálise das soluções 27
3.2.2.2 Determinação de transmitância das dispersões protéicas 27
3.2.2.3 Determinação da solubilidade protéica das soluções 27
3.2.2.4 Determinação de cálcio iônico 28
3.2.2.5 Determinação de fósforo 28
3.2.3 Caracterização dos géis protéicos 28
3.2.3.1 Preparação dos géis 28
3.2.3.2 Perfil de textura (TPA) 29
3.2.3.3 Perfil eletroforético 29
3.2.3.4 Determinação de umidade espremível 29
3.2.4 Procedimento estatístico 30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31
4.1 Composição química e solubilidade 31
4.2 Perfil de textura de g]eis de CPSs e IPS 38
4.3 Umidade espremível de géis de CPSs e IPS 56
4.4 Perfil eletroforético 59

5.CONCLUSÕES 63

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas e químicas das proteínas do soro do leite 5
Tabela 2. Composição química e solubilidade dos CPSs e IPS 31
Tabela 3. Valores de solubilidade protéica de soluções de CPS e IPS com 10% de proteína em água deionizada e pH 7,0 32
Tabela 4. Valores de solubilidade protéica de soluções de CPS e IPS dialisadas com 10% de proteína em água deionizada e pH 7,0 34
Tabela 5. Teor de minerais dos CPSs e IPS 38
Tabela 6. Concentrações de cálcio iônico, cálcio complexado e fósforo em soluções de CPS e IPS com 10% de proteína e pH 7,0 antes do processo de diálise 38
Tabela 7. Eficiência do processo de diálise 39
Tabela 8. Concentrações de cálcio iônico, cálcio complexado e fósforo em soluções de CPS e IPS com 10% de proteína e pH 7,0 após o processo de diálise 39
Tabela 9. Valores de dureza dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS 41
Tabela 10. Valores de dureza dos géis com 10% de proteína de CPS e IPS dialisado 42
Tabela 11. Concentração de sulfidrilas livres 43
Tabela 12. Valores de adesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS 45
Tabela 13. Valores de adesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados 45
Tabela 14. Valores de elasticidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS 47
Tabela 15. Valores de elasticidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados 48
Tabela 16. Valores de coesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS 50
Tabela 17. Valores de coesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados 51
Tabela 18. Valores de gomosidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS 52
Tabela 19. Valores de gomosidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados 53
Tabela 20. Valores de mastigabilidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS 54
Tabela 21. Valores de mastigabilidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados 55
Tabela 22. Valores de umidade espremível de géis de CPSs e IPS 56
Tabela 23. Valores de umidade espremível de géis de CPSs e IPS dialisados 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da adição de $CaCl_2$ na solubilidade protéica de CPSs e IPS 35

Figura 2. Efeito da adição de $CaCl_2$ na solubilidade protéica de CPS e IPS dialisados 35

Figura 3. Efeito da adição de $CaCl_2$ na transmitância de soluções de CPSs e IPS 37

Figura 4. Efeito da adição de $CaCl_2$ na transmitância de soluções dialisadas de CPSs e IPS 37

Figura 5. Efeito da adição de $CaCl_2$ na dureza de géis de CPSs e IPS 41

Figura 6. Efeito da adição de $CaCl_2$ na dureza de géis de CPSs e IPS dialisados 42

Figura 7. Efeito da adição de $CaCl_2$ na adesividade de géis de CPSs e IPS 46

Figura 8. Efeito da adição de $CaCl_2$ na adesividade de géis de CPSs e IPS dialisados 46

Figura 9. Efeito da adição de $CaCl_2$ na elasticidade de géis de CPSs e IPS 47

Figura 10. Efeito da adição de $CaCl_2$ na elasticidade de géis de CPSs e IPS dialisados 48

Figura 11. Efeito da adição de $CaCl_2$ na coesividade de géis de CPSs e IPS 50

Figura 12. Efeito da adição de $CaCl_2$ na coesividade de géis de CPSs e IPS dialisados 51

Figura 13. Efeito da adição de $CaCl_2$ na gomosidade de géis de CPSs e IPS 52

Figura 14. Efeito da adição de $CaCl_2$ na gomosidade de géis de CPss e IPS dialisados 53

Figura 15. Efeito da adição de $CaCl_2$ na mastigabilidade de géis de CPSs e IPS 54

Figura 16. Efeito da adição de $CaCl_2$ na mastigabilidade de géis de CPSs e IPS dialisados 55

Figura 17. Efeito da adição de $CaCl_2$ na umidade espremível de géis de CPSs e IPS 56

Figura 18. Efeito da adição de $CaCl_2$ na umidade espremível de géis de CPSs e IPS dialisados 57

Figura 19. Perfil eletroforético de CPSs e IPS 59

Figura 20. Perfil eletroforético dos géis de soluções de CPSs e IPS 60

RESUMO

Concentrados (80% de proteína) e isolado (90% de proteína) protéico de soro de leite , produzidos por processos de ultrafiltração/diafiltração foram avaliados quanto ao perfil de solubilidade, de textura e perfil eletroforético. Os concentrados e o isolado utilizado neste estudo apresentaram-se altamente solúveis em pH 7,0 e 4,6 (valores superiores a 84%). A solubilidade protéica de soluções preparadas com 10% de proteína em pH 7,0 em sistema dialisado e não dialisado, com adição de diferentes concentrações de $CaCl_2$ (0, 10, 15, 25 e 35 mM) apresentou pequeno decréscimo quando houve a adição de 35 mM de $CaCl_2$ indicando a formação de poucos agregados o que foi confirmado pelo perfil de transmitância das soluções. Géis produzidos a partir dessas soluções foram avaliados quanto a características de dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, gomosidade, mastigabilidade e capacidade de retenção de água. Esses parâmetros mostraram-se dependentes da concentração de Ca^{2+} e também da concentração de outros íons, principalmente ânions presentes nas amostras. Concentrados protéicos com a mesma concentração de cálcio total apresentaram perfil de textura diferenciado. O valor máximo de dureza foi obtido a concentrações específicas de cálcio. Soluções dialisadas foram mais sensíveis a adição de $CaCl_2$ apresentando géis com maiores valores de dureza, mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e coesividade. Géis produzidos de CPS Calpro 80 apresentaram valor máximo de dureza (613,02 g) quando foi adicionado 25 mM de $CaCl_2$, géis de CPS AMP 80 apresentaram dureza máxima (627,95 g) quando foi adicionado 15 mM de $CaCl_2$ em sistema dialisado e géis de IPS apresentaram dureza máxima (1050,12 g) quando foi adicionado 10 mM de $CaCl_2$ em sistema dialisado.

Soluções com baixa força iônica produziram géis mais elásticos, mais coesos e com maior capacidade de retenção de água. A adição de Ca^{2+} produziu géis menos elásticos e menos coesos. A capacidade de retenção de água máxima das três amostras foi obtida em sistema dialisado sem a adição de $CaCl_2$.

O perfil eletroforético dos géis indicou que com a adição de 25 e 35 mM de $CaCl_2$ a estrutura dos géis estava sendo mantida por interações eletrostáticas, enquanto que nos níveis de 0, 10 e 15 mM de adição de $CaCl_2$ a estrutura estava sendo mantida por ligações dissulfídicas e eletrostáticas e as proteínas envolvidas no processo de formação de agregados através de ligações S-S foram α-lactalbumina e β-lactoglobulina.

SUMMARY

Whey protein concentrates (80% protein) and whey protein isolate (90% protein) manufactured by ultrafiltration and diafiltration were evaluated for their solubility properties, textural characteristics and electrophoretic pattern. Concentrates and isolate tested in this study showed high solubility at pHs 7,0 and 4,6 (solubility higher than 84%). Protein solubility in systems prepared with 10% protein at pH 7,0, dialysed and non-dialysed, with the addition of different concentrations of $CaCl_2$ (0, 10, 15, 25 and 35 mM) showed a small decrease when 35 mM $CaCl_2$ was added, indicating the formation of few aggregates, confirmed by the transmittance patterns of the solutions. Gels obtained from these solutions was evaluated for hardness, adhesiveness, elasticity, cohesiveness, gumminess, chewiness and water retention capacity. These parameters were Ca^{2+} and other ions dependent , mainly of anions present in the samples. Whey protein concentrates with the same total Ca^{2+} concentration showed different texture profile.The highest values for hardness were obtained with specific concentrations of calcium. Dialysed solutions were more sensitive to $CaCl_2$ addition showing higher values for hardness, chewiness, gumminess, elasticity and cohesiveness. The maximum hardness value for the WPC Calpro 80 was obtained at 25 mM $CaCl_2$ (613,02 g); sample AMP 80 showed maximum hardness when 15 mM $CaCl_2$ were added to a dialysed system (627,95 g); maximum hardness for the WPI was obtained at 10 mM $CaCl_2$ when the salt was added to the dialysed system (1050,12 g).

Solutions with low ionic strength produced elastic gels, more coesive and with higher water retention capacity. Ca^{2+} addition produced less elastic gels and with lower coesivity. The maximum water retention capacity for the three samples was obtained in the dialysed system without $CaCl_2$ addition.

The electrophoretic pattern indicated that with the addition of 25 and 35 mM $CaCl_2$ the gels structures were mantained by electrostatic interactions, while at the addition levels of 0, 15 e 15 mM of $CaCl_2$ the structure was supported by disulphide and electrostatic interactions and the proteins involved in the process of aggregates formation through interactions S-S were α-lactalbumin and β-lactoglobulin.

1. INTRODUÇÃO

Concentrados (CPSs) e isolados protéicos (IPSs) de soro de leite obtidos do processamento de queijo e caseína industrial têm se tornado importantes ingredientes funcionais, utilizados principalmente em alimentos formulados, incluindo carnes processadas, produtos de confeitaria e láticos (KINSELLA e WHITEHEAD, 1989). Todavia, a utilização de CPS ainda é limitada devido a grande variabilidade em propriedades funcionais em razão de diferenças na composição e processamento. MORR e FOEGEDING (1990) mostraram que CPSs obtidos de diferentes fontes comerciais tiveram considerável variação no conteúdo de minerais, incluindo cálcio, sódio e fosfato.

A manipulação da concentração de íons como cálcio, sódio, potássio, fosfato pode alterar sensivelmente as características desses concentrados, permitindo o desenvolvimento de características funcionais específicas. O equilíbrio entre concentrações de cálcio iônico, ligado a proteína ou na forma de fosfato de cálcio coloidal pode alterar características funcionais de concentrados protéicos de soro de leite. (AUGUSTIN e CLARKE, 1991). Processos de desmineralização e eletrodiálise de CPSs e IPSs favorecem a formação de géis mais fortes e mais elásticos (SCHMIDT *et al.*, 1978b; KUHN e FOEGEDING, 1991b) indicando efeito prejudicial de minerais na estrutura do gel. Segundo SCHMIDT (1981); MULVIHILL e KINSELLA (1988); KHUN e FOEGEDING (1991a), baixas concentrações de cálcio (5-10 mM) facilitam a gelatinização de proteínas de soro do leite. A habilidade de proteínas do soro do leite de formar géis induzidos pelo aquecimento com alta capacidade de retenção de água é uma propriedade funcional de importância econômica (STERNBERG *et al.*, 1976). A propriedade gelatinizante é dependente do estado físico-químico das proteínas e da composição de componentes não protéicos, incluindo lactose (HAGGETT, 1976), lipídios (STERNBERG *et al.*, 1976) e minerais (HAGGETT, 1976).

Proteínas globulares podem formar géis por agregação linear ou ao acaso, dependendo de fatores como pH e concentração de sais (DOI,1993; TOMBS 1974). O processo de agregação ao acaso resulta na formação de géis opacos, enquanto a agregação linear resulta na formação de géis transparentes. Dependendo do tipo de agregação, os géis de proteínas do soro do leite podem ser classificados como particulados (opacos), de estrutura fina-linear (transparentes) ou de estrutura mista. Géis

transparentes são formados abaixo ou acima do pH isoelétrico (pI), todavia os géis formados acima do pI são fortes, elásticos com grande capacidade de retenção de água e aqueles formados abaixo do pI são fracos com baixa capacidade de retenção de água (HUDSON, *et al.* 2000).

A concentração de sais, em especial $CaCl_2$, pode ser manipulada para obter géis com diferentes estruturas e aumentar seu potencial de aplicação como ingrediente funcional. Sendo assim uma melhor compreensão dos efeitos da concentração de minerais na funcionalidade de proteínas do soro é necessária para expandir a utilização de produtos comerciais de soro de leite.

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da concentração de Ca^{2+} na solubilidade protéica de soluções de concentrados e isolado protéicos de soro de leite e no perfil de textura e eletroforético dos géis produzidos. A alteração das concentrações de Ca^{2+} foi conseguida pela adição de $CaCl_2$ (0, 10, 15, 25, 35 mM) ou pela remoção através do processo de diálise.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteínas do soro

O leite é uma secreção polifásica da glândula mamária, contendo 3,9% de gordura, 3,3% de proteínas, 5% de lactose e 0,7% de minerais. As proteínas do leite têm sido classicamente separadas em 2 grandes grupos: as caseínas que são insolúveis em pH 4,6 a 20°C e as proteínas do soro. O soro é a fração solúvel do leite que é separado da caseína durante a manufatura do queijo ou caseína industrial. Do total de proteínas do leite, 20% corresponde às proteínas do soro. As principais proteínas do soro são: β-lactoglobulina (β-Lg), α-lactalbumina (α-La), proteose-peptona, imunoglobulinas e albumina de soro bovino (BSA). As três frações protéicas: α-La, β-Lg e BSA, ocorrem naturalmente no soro como proteínas globulares organizadas em uma estrutura tridimensional compacta, na qual cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos reativos estão localizados no interior da proteína, ficando a maior parte das cadeias laterais polares no exterior. A estrutura é mantida por ligações não covalentes fracas e no caso da β-Lg por poucas ligações dissulfídicas (KINSELLA e WHITEHEAD, 1989). As proteínas β-Lg e α-La estão presentes em maior concentração e possuem as propriedades físico-químicas de maior importância em produtos protéicos de soro, apresentam excelentes propriedades funcionais e um alto valor nutricional devido ao seu conteúdo em aminoácidos sulfurados, lisina e triptofano.

A proteína presente em maior concentração no soro do leite (7 a 12% das proteínas totais do leite) é a β-Lg que, segundo LEMAN e KINSELLA (1989), em pH entre 5 e 7, existe como um dímero formado de duas subunidades idênticas, cada uma com peso molecular de 18.400 Da. Em temperaturas acima de 40°C, este dímero se dissocia em monômeros. A principal fração da β-Lg em sistemas aquecidos contém duas ligações dissulfídicas e um grupo tiol, sendo este capaz de interagir formando novas ligações dissulfídicas a uma velocidade de reação que, em pH acima de 6,8, aumenta repentinamente devido às mudanças de conformação da molécula, que expõe os grupos tiol livres. A β-Lg é responsável por aproximadamente 90% do total de grupos sulfidrilas livres no leite. É composta por uma sequência de 162 resíduos de aminoácidos e, segundo GOUGH e JENESS (1962), a β-Lg se desnatura em temperaturas acima de

65°C e pH 6,7, resultando em agregação. PAPPAS e ROTHWELL (1991) verificaram que 10^5 g de β-Lg foi capaz de ligar 18,6; 24,6; 32,6 e 35,3 moles de cálcio para concentrações de 3, 10, 15, 20 mM de cálcio por litro respectivamente. Esta proteína apresenta boa capacidade de ligar cálcio a baixas concentrações e este é ligado a grupos carboxílicos livres do ácido aspártico e glutâmico que estão presentes em número de 10 a 16, respectivamente, por molécula de β-Lg.

A segunda fração mais importante das proteínas do soro (2 a 5% das proteínas totais do leite) é a α-La que é uma proteína globular compacta, com peso molecular em torno de 14.000 Da, correspondendo a uma sequência de 123 resíduos de aminoácidos (EIGEL *et al.*, 1984). É estável na faixa de pH entre 5,4 e 9,0, contém 4 ligações dissulfídicas intramoleculares e não apresenta grupos sulfidrilas. Segundo FOX (1989) seu ponto isoelétrico é aproximadamente 4,8 e não se trata de uma albumina verdadeira. Segundo BRAMAUD *et al.* (1995), a α-La é uma metaloproteína ligadora de Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+} e Mg^{2+} e liga um mol de cálcio iônico por mol de proteína. A remoção do cálcio da α-La pelo ajuste do pH a 3,8 ou pela adição de um agente sequestrante como EDTA, ácido cítrico ou citrato de sódio resulta na redução da estabilidade térmica quando comparada à proteína nativa. A α-La é menos suscetível a desnaturação pelo aquecimento que a β-Lg, assim a desnaturação da α-La pode ser um importante fator na avaliação de efeitos do processamento na funcionalidade do soro (HILLIER *et al.*,1979) ou de concentrados protéicos de soro (MORR *et al.*, 1973). Segundo RÜEGG (1977), a α-La se desnatura a 65,2°C e pH 6,7. PAPPAS e ROTHWELL (1991) verificaram que 10^5 g de α-La foi capaz de ligar 23,3; 26,6; 31,0 moles de cálcio para concentrações de 10, 15, 20 mM de cálcio por litro respectivamente. O cálcio apresentou-se ligado a 9 grupos carboxílicos livres do ácido aspártico e 8 do ácido glutâmico presentes em cada molécula de α-La.

A albumina do soro bovino (BSA) é a maior proteína do soro em tamanho, contém 582 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 66.000 Da. Possui 17 ligações dissulfídicas intramoleculares e um grupo sulfidrila livre no resíduo 34 (EIGEL *et al.*, 1984). Esse grupo tiol, assim como o da β-lg, pode participar de interações intra ou intermoleculares. A BSA pode se ligar a várias moléculas, aparentemente em diferentes sítios. Essas ligações são consideradas importantes uma vez que aumentam a

estabilidade molecular (FOX, 1989). Sua temperatura de desnaturação é 64°C.

No soro do leite estão presentes quatro classes de imunoglobulinas: IgG, IgE, IgM e IgA e apresentam peso molecular superior a 146.000 Da (EIGEL *et al.*, 1984). Das imunoglobulinas presentes no leite de vaca, 80% são IgG (MORR e HA, 1993). Estas proteínas exibem temperatura de desnaturação superior a da α-la e β-lg, mas na presença de outras proteínas do soro elas se tornam extremamente termolábeis, o que pode ser explicado através das interações via ligação dissulfídica entre BSA e β-lg (dE WIT e KLARENBEEK, 1984).

A tabela abaixo apresenta um resumo das principais características físico-químicas e químicas das proteínas do soro.

Tabela 1: Características fisico-químicas e químicas das proteínas do soro

	β-Lg	α-La	BSA	Ig
Ponto Isoelétrico	5,2	4,2-4,5	4,7-4,9	5,5-8,3
Concentração no soro (g/l)	2-4	0,6-1,7	0,4	0,4-1,0
Concentração no soro (%)	56-60	18-24	6-12	6-12
Peso Molecular (daltons)	18.000	14.000	66.000	146.000
Hidrofobicidade Média (Kcal/resíduo)	1075	1020	995	
Total de aminoácidos (resíduos/mol)	162	123	582	
Apolares (resíduos/mol)	54	44	163	
Cisteína (resíduos/mol)	5	8	35	
Ligação dissulfídica (resíduos/mol)	2	4	17	
Sulfidrilas (resíduos/mol)	1	0	1	
Lisina (resíduos/mol)	15	12	59	
Ácido glutâmico (resíduos/mol)	16	8	59	
Ácido aspártico (resíduos/mol)	10	9	39	

Fonte: EIGEL *et al.* (1984)

2.2 Produção de concentrados (CPSs) e isolados (IPSs) protéico de soro

Existem 2 tipos principais de soro disponíveis como fontes de proteína que são os soros ácido e doce resultantes da fabricação de queijo. O soro ácido com pH≤5,1 é produzido pela acidificação direta do leite, enquanto o soro doce é produzido através da

coagulação do leite por renina em pH ≥5,6. O soro ácido contém 0,7% de proteína e 0,8% de minerais, enquanto o soro doce contém 0,8% de proteína e 0,5% de minerais. A maior concentração de minerais do soro ácido se deve a dissolução do fosfato de cálcio coloidal das micelas de caseína durante o processo de acidificação (MORR, 1989).

Estes dois tipos de soro são utilizados para a produção de concentrados e isolados protéicos de soro de leite por diferentes processos de concentração. A partir da década de 70, processos utilizados para produção de concentrados protéicos de soro (CPSs) como filtração em gel, precipitação por polifosfato, coagulação térmica e desmineralização e delactosação parcial foram substituidos por osmose reversa e ultrafiltração (UF)/diafiltração (DF). Segundo KINSELLA (1984) e EVANS (1989), os processos que utilizam membranas como a ultrafiltração e osmose reversa são usados para redução da concentração de sais e lactose, fornecendo proteínas com boa solubilidade e propriedades funcionais.

O processo de UF utiliza membranas para promover a separação de componentes de um líquido com base em seu peso e tamanho molecular. As membranas de UF usadas para concentração/fracionamento de proteínas do soro, geralmente de peso molecular de 10.000 a 50.000 Da, permeiam lactose e minerais e retém proteínas e gordura residual do leite (MORR, 1989).

A diafiltração envolve simultaneamente a adição de água ao concentrado ultrafiltrado, cerca de 5 vezes o volume do ultrafiltrado, para remoção de solutos de baixo peso molecular como lactose e minerais e é empregada para produção de CPSs com concentração de proteína superior a 50%. Este processo evita também o aumento excessivo da viscosidade do retentado que poderá resultar na redução do fluxo da membrana de ultrafiltração (MORR, 1989).

Nos concentrados protéicos disponíveis comercialmente, o nível de proteína varia de 35 a 85% enquanto que os isolados protéicos de soro (IPSs) têm conteúdo protéico de 90% ou mais (GIESE,1994). Industrialmente, dois processos principais de troca iônica tem sido utilizados para produção de IPSs, que são o "Vistec" e o "Spherosil".

O "Vistec" é um processo que utiliza um trocador iônico a base de celulose em um tanque reator de leito com agitação. A adsorção protéica é realizada em pH 3,2 e a eluição protéica ocorre em pH entre 7,0 e 7,5. Após a eluição, as proteínas são concentradas por UF e secas em spray dryer (PALMER, 1977).

O processo "Spherosil" utiliza pérolas de sílica recobertas com material polimérico com potencial de troca catiônica ("Spherosil S") ou aniônica ("Spherosil QMA") no qual a adsorção/recuperação das proteínas é feita em reator de coluna de leito fixo. O soro acidificado a pH≤4,5 é aplicado no reator de coluna "Spherosil S" que permite a adsorção da proteína. Lactose e outros solutos não adsorvidos são eluídos com água. O pH é então aumentado e as proteínas eluidas da coluna de troca iônica, concentradas por UF e secas em spray dryer. No caso do soro doce com pH≥5,5, este é aplicado ao reator de coluna "Spherosil QMA" para adsorver as proteínas carregadas negativamente. Após a eluição de componentes não protéicos com água, as proteínas são dessorvidas e eluidas com ácido a pH≤4,5 , concentradas por UF e secas em spray dryer (MIRABEL,1978).

Segundo BARKER e MORR (1986) estes processos recuperam cerca de 85% das proteínas sob as melhores condições de operação. Em trocador aniônico o rendimento é menor porque as proteínas do soro básicas como lactoferrina, lactoperoxidase e imunoglobulinas não são adsorvidas na coluna "Spherosil QMA". Embora as propriedades funcionais dos IPSs sejam superiores a dos CPSs em base equiprotéica, principalmente a gelatinização térmica (PEARCE, 1992), sua produção é limitada devido ao alto custo de produção, a utilização de grandes quantidades de solução de lavagem e regenerante e o contínuo decréscimo na capacidade de troca da coluna durante o processamento (MULVIHILL, 1992).

2.3 Propriedades funcionais e aplicações de CPSs e IPSs

O termo "propriedade funcional", geralmente é utilizado em relação a parâmetros físico-químicos de proteínas em soluções aquosas ou em sistemas modelo simples. A estrutura primária, estrutura segundária (isto é arranjo espacial de cadeias polipeptídicas estabilizadas por ligações de H, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas), estrutura terciária (dobramento de cadeias polipeptídicas que

são mantidas por ligações dissulfídicas covalentes) e condições do meio como pH, força iônica, temperatura, viscosidade e presença de outras moléculas influenciam as propriedades funcionais de proteínas em sistema de alimentos (IMAFIDON *et al.*,1997).

Segundo de WIT (1990), as propriedades funcionais primeiramente revelam informação sobre a história do processamento e a composição de produtos de proteína do soro. A funcionalidade protéica se manifesta através de interações entre moléculas protéicas e água, sais e outros componentes do alimento. O desenvolvimento da estrutura de géis, a formação de espumas e emulsões estáveis envolvem interações proteína-proteína. A taxa e extensão das interações proteína-proteína pode infuenciar o desempenho das proteínas do soro na imobilização da água, na estabilização da gordura e nas características de textura do produto final (XIONG, 1992).

Devido o seu alto valor nutricional e sua funcionalidade, concentrados protéicos de soro obtidos do processamento de queijo, tem se tornado uma importante fonte de ingrediente funcional usado em muitos produtos formulados, incluindo carnes processadas, produtos derivados de leite, produtos de confeitaria (KINSELLA e WHITEHEAD, 1989), como suplemento nutricional em dietas especiais e produtos farmacêuticos e, devido a alta solubilidade das proteínas do soro em valores de pH baixos, pode ainda ser utilizado em sucos de frutas e drinks (MORR,1985).

Isolados proteícos de soro de leite contendo 90% ou mais de proteína e menos do que 1% de lactose e gordura, permitem formulações livres de lactose e gordura, bebidas formuladas para atletas e alimentação enteral (HUFFMAN, 1996). Os IPSs têm ainda uma grande aplicação em formulações infantis que requerem extensa desmineralização. A esses produtos normalmente adiciona-se cálcio até se obter a concentração de 1440 mg/L no produto final (MCDERMOTT, 1987).

2.4 Solubilidade de concentrados protéicos de soro

Em geral, proteínas usadas como ingredientes funcionais requerem alta solubilidade para promover boa emulsão, espuma e gelatinização. Alguns concentrados protéicos são naturalmente insolúveis ou tornam-se insolúveis pelo tratamento térmico. Outros concentrados protéicos tendem a tornar-se insolúveis em valores de pH ácidos ou

próximo ao ponto isoelétrico (pI) e apresentam alta solubilidade em valores de pH maiores. A suplementação protéica de sucos de frutas e drinks requer que estas proteínas sejam solúveis em valores de pH ácidos (de WIT, 1990).

Segundo VOJDANI (1996), para globulinas e algumas albuminas, a solubilidade das proteínas aumenta com a adição de sais neutros até um valor máximo e então decresce. Neste ponto, há uma competição entre a proteína e os íons salinos para ligar água. A fase onde ocorre aumento da solubilidade é chamada de "salting-in" e a fase onde há decréscimo é chamada de "salting-out". Sais neutros, em concentração de 0,1 a 1 M podem aumentar a solubilidade protéica interagindo com grupos de carga oposta da proteína para formar uma camada dupla de grupos iônicos, o que diminui as interações eletrostáticas entre moléculas protéicas, causando maior solvatação da proteína e aumento de sua solubilidade. Em concentrações superiores a 1M, ocorre decréscimo na solubilidade protéica ("salting-out") devido o aumento de interações hidrofóbicas e também pela competição da proteína com os íons salinos pela água. Nessa concentração salina, a maior parte da água se apresenta fortemente ligada aos íons, havendo pouca reorganização em torno da molécula de proteína. Interações proteína-proteína são mais fortes que interações proteína-água o que leva a associação e precipitação. Em alguns casos, baixas concentrações de cátions divalentes podem induzir o efeito "salting-out".

Concentrados protéicos de soro de leite produzidos comercialmente apresentam solubilidade entre 80 e 90%, enquanto que isolados protéicos de soro podem apresentar solubilidade de 98%. A solubilidade reduzida determinada em pH 4,6, representa desnaturação de proteínas do soro principalmente da β-lactoglobulina, provocada durante o processo de evaporação, secagem e estocagem de produtos protéicos de soro de leite. (dE WIT, 1990). Em 1992, MORR avaliou a solubilidade protéica de três IPSs e oito CPSs comerciais com teor de proteína variando de 88,6 a 92,7% e de 72,0 a 76,6% respectivamente e encontrou valores de solubilidade a pH 7,0 igual ou superior a 98% para os IPSs e igual ou superior a 62% para os CPSs. Valores mínimos de solubilidade foram encontrados em pH 4,5, que variaram de 49,4 a 94,5%.

Segundo de WIT (1990), IPSs produzidos pelo processo "Spherosil S" e CPSs ácidos UF/DI apresentam grande desnaturação protéica apresentando baixa solubilidade. Isto pode ser explicado por um efeito combinado de desnaturação provocado por pH e temperatura. Durante o processo "Spherosil S" ocorre aquecimento a pH alcalino durante a secagem, provocando a desnaturação da β-lactoglobulina através de interações dissulfídicas e em CPSs ácidos UF/DI que são secos sob condições de pH ácido ocorre a desnaturação da α-La (SHORT, 1978) e da BSA (de WIT e KLARENBEEK, 1984).

2.5 Gelatinização de concentrados protéicos de soro de leite

A gelatinização de proteínas pode ser causada pela adição de sais, ação de enzimas, alterações de pH ou pela aplicação de calor. No caso de concentrados protéicos de soro (CPS) é o aquecimento que induz a gelatinização protéica.

As proteínas globulares têm uma estrutura que é estabilizada por ligações não covalentes e algumas ligações covalentes. Quando uma proteína é aquecida, as ligações que mantêm a estrutura secundária e terciária são enfraquecidas e se rompem. Esta quebra de ligações não covalentes, resultando em alteração da molécula protéica é chamada desnaturação. Com a ocorrência da desnaturação térmica, a maioria das moléculas protéicas se desdobra e aumenta a quantidade de água fortemente ligada. Se interações proteína-proteína levarem à formação de uma rede tridimensional capaz de englobar moléculas de água, então o gel se formará. Se a rede é fraca, a viscosidade poderá aumentar e permitir fluxo do fluido, ocasionando o rompimento da rede. Se, todavia, interações proteína-proteína forem muito fortes, a rede se romperá e a água será expelida. Um balanço entre forças atrativas para formar a rede e forças repulsivas para prevenir o colapso da rede são necessárias para a formação do gel (MANGINO, 1992).

Segundo AGUILERA (1995), a gelatinização de proteínas do soro induzida pelo aquecimento inicia-se com uma solução transparente que aumenta sua viscosidade devido a formação de agregados protéicos e termina com a formação de um gel (inverte-se o recipiente e não ocorre fluxo). A gelatinização envolve uma alteração no estado macroscópico da matéria, chamado de "transição" do estado de sol para gel. O termo

transição se refere a uma alteração de estado induzida por variações de temperatura ou pressão (SPERLING, 1992). As transições de primeira ordem de componentes de baixo peso molecular de seu estado sólido (S) ou cristalino (C) para seu estado líquido (L) ou vapor (V) são conhecidas como: "melting"(S→L) e "boiling"(L→V). Do ponto de vista físico do polímero, a formação de gel se processa via transição de 1ª ordem de um estado molecular desordenado na solução para um estado mais ou menos ordenado na rede. O "gel point" (ponto de gelatinização) ou "gel time (t*)" (tempo de gelatinização) representa o instante quando a solução (sol) torna-se um sólido viscoelástico (gel) ou, em modelo de polimerização para gelatinização, é o instante no qual a rede infinita é formada. Todavia, em gelatinização de proteínas globulares, induzida pelo aquecimento, outras "transições" ocorrem na molécula que são intrínsicas as proteínas: desnaturação → desdobramento → agregação (AGUILERA , 1995).

As proteínas globulares têm uma conformação única em seu estado nativo (N) e passam para um estado desdobrado ou desnaturado sob certas condições como por exemplo aquecimento. O estado de gel (G) para as proteínas globulares envolve trasição do estado nativo para o estado desdobrado e estado de agregado. Esta sequência pode ser explicada pelas reações, descritas abaixo, propostas por SCHMIDT (1981), para formação de géis induzidos pelo aquecimento, baseado no mecanismo de 2 fases proposto por FERRY (1948).

Fase I: **N** (estado nativo) → **D** (estado desdobrado)

Fase II: **D** (estado desdobrado) → **A** (agregado)

Fase III: **A** (agregado) → **L** (formação de estrutura linear de agregados)

Fase IV: **L** (formação de estrutura linear de agregados) → **G** (Gel)

Na Fase I, ocorre a desnaturação das proteínas nativas. A desnaturação de proteínas é considerada uma transição intramolecular de 1ª ordem, na qual moléculas compactas começam a se desdobrar em "random coils" e, segundo GRINBERG *et al* (1992), a temperatura correspondente ao início deste processo é denominada temperatura de desnaturação e, de acordo com MYERS (1990), ocorre na faixa de 60 a 80°C. Géis de proteínas globulares, induzidos termicamente, requerem um desdobramento parcial da proteína inicialmente (CLARK e ROSS-MURPHY, 1987), mas não total desdobramento, o que raramente ocorre abaixo de 100°C. Uma vez aberta a

estrutura molecular, esta expõe uma grande quantidade de sítios reativos para interações intermoleculares. A gelatinização de proteínas do soro é normalmente observada acima de 70°C. Segundo HIROSE (1993), a etapa inicial da gelatinização pode envolver um estado conformacional intermediário no qual a estrutura secundária da proteína globular é mantida intacta ou levemente expandida, permitindo a movimentação intramolecular de cadeias laterais e aumento da hidrofobicidade superficial. Este estado intermediário que mantém a estrutura secundária da molécula globular compacta, mas desdobra a estrutura terciária é chamado "the molten globule state" (PTITYN, 1992).

Na Fase II, ocorre a agregação de moléculas desdobradas. O mecanismo molecular responsável pela formação de agregados, durante e após o desdobramento protéico, ainda é obscuro. Tem sido relatado que a agregação se realiza através de uma sequência de reações de desdobramento (unimolecular) e associação bimolecular para produzir uma estrutura polimérica ordenada. A estabilização de agregados solúveis pode ocorrer através de ligações cruzadas dissulfídicas entre cadeias polipeptídicas, como sugerido por HILLIER *et al.* (1980), para concentrados protéicos de soro. Na Fase III, ocorre a formação da estrutura linear (fios) dos agregados. A maior parte dos géis de proteína do soro, caracterizados microestruturalmente, revelam a presença de uma rede homogênea de partículas protéicas conectadas ou agregadas formando uma matriz tridimensional com áreas intersticiais completadas por líquido. TOMBS (1974) postulou 2 modelos para a formação de géis de proteína globular: estrutura de agregados em cachos ao acaso e "string-of-beads"(fios de agregados ordenados, colar de pérolas). Géis tipo "string of beads" com aparência transparente ou translúcida tem sido relatado para albumina de soro, insulina, lisozima (CLARK *et al.,* 1981), ovalbumina (DOI *et al.*, 1987) e glicina de soja (NAKAMURA *et al.*, 1984). Exemplos de géis formados por agregação de moléculas ao acaso com aparência túrbida são os de miosina aquecida a alta força iônica (HERMANSSON *et al.,* 1986), β-Lg e proteínas do soro (HERMANSSON, 1988). Todavia, a maior parte dos géis de proteínas globulares adquire ambas as formas de rede dependendo de condições de gelatinização como: concentração de proteína, pH, força iônica, temperatura, tempo de aquecimento e outros. Um último nível de associação (Fase IV) seria entre os fios de agregados e então tem-se a formação da rede tridimensional, ou seja, o gel.

Outra possibilidade de transição em géis seria, segundo DOI (1993), a mudança de opaco para transparente (translúcido) para proteínas globulares. Géis transparentes têm uma rede molecularmente homogênea, enquanto géis opacos consistem de partículas ou agregados coloidais. Géis de β-Lg de estrutura fina e transparente se formariam na faixa de pH de 7 a 9, enquanto géis de estrutura agregada e opaca resultaram de pH próximo ao ponto isoelétrico (pH 4 a 6). A transição de um tipo de gel para outro pode ser verificada com uma pequena alteração de pH (aproximadamente 0,1 unidades) antes do aquecimento (HERMANSSON, 1988; DOI, 1993).

2.6 Fatores que influenciam a gelatinização de CPSs e IPSs

Em geral, a habilidade de formar gel dos CPSs depende de:

- Fatores composicionais como: concentração e tipo de proteínas do soro, quantidade de componentes iônicos (especialmente cálcio) e quantidades de nitrogênio não protéico, gordura e lactose em preparações com CPSs e IPSs;
- Fatores de processamento que podem afetar o estado físico-químico das proteínas do soro e também a sua composição;
- Condições de preparação do gel: concentração de proteína, temperatura de aquecimento, pH, concentração de sulfidrilas livres, hidrofobicidade da proteína e concentração de sais.

2.6.1 Concentração de proteína

A concentração de proteína influencia o mecanismo envolvido nas interações proteína-proteína e no tipo de gel formado durante a gelatinização induzida pelo aquecimento convencional (RECTOR *et al.,* 1989; MATSUDOMI *et al.*,1991; MORR e HA, 1993). A formação de géis protéicos reversíveis ou irreversíveis depende da concentração de proteínas (RECTOR *et al.*, 1989). Baixas concentrações de proteína favorecem interações proteícas intramoleculares que são insuficientes para formação da estrutura do gel. A concentração protéica mínima requerida para formação de gel é chamada de "least concentration endpoint" (LCE) (MORR e FOEGEDING,1990; BRANDENBURG *et al.*,1992). Um aumento no conteúdo de proteína aumenta a probabilidade de ocorrerem ligações cruzadas entre as proteínas e altera a força e textura dos géis aumentando a sua dureza (SCHMIDT, 1981).

Segundo MATSUDOMI *et al.* (1991), em pH 6,5 foi necessária uma concentração de 5% de β-lactoglobulina para formação do gel. Em valores de pHs altos e baixos, a concentração de β-lactoglobulina necessária para formação de gel, variou de 5 a 10% (STADING e HERMANSSON, 1990). LANGLEY e GREEN (1989) afirmaram que géis translúcidos são formados pelo aquecimento de soluções de CPS com concentração relativamente baixa de β-lactoglobulina, enquanto que soluções contendo alta concentração de β-lg resulta em géis opacos.

Géis elásticos, translúcidos e fracos são formados pelo aquecimento de soluções protéicas de CPS de 3 a 5%, o que é causado pela formação de baixo número de ligações intermoleculares. O aquecimento de soluções contendo concentrações protéicas mais altas resulta em géis opacos e rígidos com maior frequência de ligações cruzadas entre polímeros adjacentes (MORR e HA, 1993). Segundo SHIMADA e CHEFTEL (1989), as ligações cruzadas irreversíveis entre cadeias poliméricas protéicas na rede de gel são atribuidas a ligações protéicas hidrofóbicas e ligações dissulfídicas intermoleculares, especialmente em concentrações protéicas altas. Na fase de resfriamento ocorrem ligações proteína-hidrogênio intermoleculares o que fortalece a rede de gel e aumenta interações proteína-solvente (BRANDENBURG *et al.*, 1992).

Géis irreversíveis de IPS se formaram com concentração de proteína superior a 12%, segundo HONGSPRABASHAS e BARBUT (1997). MATSUDOMI *et el.* (1991) indicaram que forças não covalentes foram predominantes em interações proteína-proteína durante a formação da rede em concentrações de proteína mais baixa (isto é <12%). A concentração de proteína superior a 12%, ligações cruzadas dissulfídicas apareceram como um modo de interação adicional. MORR e HA (1993), sugerem que interações intramoleculares foram predominantes em baixas concentrações de proteína enquanto interações intermoleculares prevaleceram a altas concentrações. Geralmente, concentrações de proteína de 5 a 12% e temperaturas de 60 a 110°C têm sido usadas para formação de gel de CPS.

2.6.2 Temperatura

O aquecimento a temperatura acima de 65°C causa desnaturação e agregação de proteínas do soro. A ordem aparente de desnaturação de proteínas do soro individualmente é Ig>BSA>β-lg>α-la. Todavia as taxas de desnaturação são fortemente influenciadas por pH, composição iônica e concentração de sólidos totais (MORR e HA, 1993).

Segundo MANGINO (1984), o aquecimento pode afetar a velocidade de desnaturação e a velocidade de interação proteína-proteína. Se a velocidade de agregação protéica é rápida comparada com a velocidade de desdobramento da proteína, a estrutura do gel será afetada adversamente (HERMANSSON, 1979). Se a velocidade ou extensão da agregação é grande, um precipitado irá se formar sem a imobilização da água. A temperatura para a formação de gel deve ser selecionada de tal maneira que haja um balanço entre a velocidade de desdobramento da proteína e a agregação. Freqüentemente na temperatura selecionada, ocorre uma agregação mínima e a maior parte das interações proteína-proteína ocorre no sistema de resfriamento. SCHMIDT *et al.* (1978 a) concluíram que soluções de soro aquecidas de 90 a 100°C resultam na formação de géis fortes, enquanto que soluções aquecidas a 80°C resultaram em géis de força média. A coesividade dos géis de proteína do soro formados a 80°C foi maior do que a coesividade de géis aquecidos a 90°C (RIZVI, 1981). SCHMIDT *et al.* (1978 a) sugerem que a dureza dos géis aumenta com o aumento da temperatura de aquecimento devido a um número maior de ligações intermoleculares. Segundo ZIRBEL e KINSELLA (1988), géis produzidos a 90°C em pH 6,0 foram cerca de 30 vezes mais duros que géis produzidos no mesmo pH a 70°C. Já em pH 8,0 os valores de dureza para géis produzidos a 90°C e a 70°C foram muito próximos.

2.6.3 pH

Segundo SCHMIDT *et al.* (1978a), a desnaturação de proteínas é altamente dependente do pH e a razão de desdobramento pode ser influenciada pelo pH de aquecimento. O ajuste de pH permite encontrar um balanço entre a razão de desnaturação e a razão de agregação, bem como entre forças de atração e forças de repulsão entre as proteínas (MANGINO, 1984).

Géis formados de soluções de CPS a baixos valores de pH são macios e semelhantes a um coágulo opaco. Para formação de géis de CPS na faixa de pH entre 3 e 4,5 foi necessária uma concentração mínima de 14% de proteína, segundo BARKER e MORR (1986). Segundo SHIMADA e CHEFTEL (1989), géis formados a valores de pH ácidos são estabilizados principalmente por ligações de hidrogênio intermoleculares, promovendo a formação de géis não elásticos.

O aquecimento de soluções de CPS a valores de pH próximos ao pI (4,5 a 5,0) resulta na formação de um coágulo pastoso e túrbido, com reduzida elasticidade e que está sujeito a sinérese, pois ocorrem forças atrativas fortes entre as moléculas protéicas (KINSELLA, 1984; STERNBERG *et al.*, 1976; GOSSET *et al.*, 1984).

Segundo MORR e HA (1993), soluções de CPS com pH entre 6,0 e 7,5 produzem géis transparentes, elásticos e com altos valores de dureza. Estas condições aparentemente favorecem a formação de uma estrutura polimérica protéica ordenada através de interações proteína-Ca^{2+}, interligações dissulfídicas e outros mecanismos de interação. Géis formados em valores de pH 6,0 ou menores são descritos como mais coagulados e menos elásticos do que géis formados em valores de pH de 7,0 a 9,0 (STERNBERG *et al.*, 1976; HILLER *et al.*, 1980). ZIRBEL e KINSELLA (1988) relataram que géis formados a 80 e 90°C, tiveram dureza máxima em pH 6,0 e 6,4, respectivamente.

Embora os CPSs apresentem excelentes características de gelatinização térmica a pH 7,0, o aumento progressivo do pH enfraquece a estrutura de gel (GOSSET et al., 1984). SCHMIDT et al. (1978 a) observaram um decréscimo na força do gel quando o pH aumentou de 7,0 para 10,0 e a habilidade de formação de gel foi totalmente inibida a pH 11,0. A maior concentração de cargas repulsivas intermoleculares a valores maiores de pH inibe interações protéicas e ligações necessárias para formar a estrutura do gel (GOSSETT *et al.*, 1984).

2.6.4 Concentração de sulfidrilas

Em CPSs e IPSs, a β-lactoglobulina é a mais importante fonte de grupos sulfidrilas. LANGLEY e GREEN (1989) relataram que a força de compressão, o módulo elástico e a força de impacto das soluções protéicas aumentam com o aumento do conteúdo de β-lactoglobulina. Os géis de proteína do soro têm uma dependência estrutural de ligações dissulfídicas. A aparência do gel está diretamente relacionada com o conteúdo de sulfidrilas nos CPSs (HILLER *et al.*, 1980). MANGINO *et al.* (1987 a) relataram que o efeito dos grupos sulfidrilas na força dos géis de CPS foi fortemente dependente do pH. KOHNHORST e MANGINO (1985) reportaram que em pH abaixo de 7,0 há pouco efeito dos grupos sulfidrilas na dureza do gel, mas em valores de pH altos, o efeito dos grupos sulfidrilas torna-se significante. Segundo SHIMADA e CHEFTEL (1988) a alta elasticidade de géis em valores de pH alcalinos e neutros pode resultar de ligações S-S intermoleculares. Já a baixa reatividade de grupos SH em valores de pH ácidos previne reações de intertroca sulfidrila/dissulfidica resultando em géis de baixa elasticidade e alta solubilidade protéica. A transparência de géis de CPS, segundo HILLIER *et al.* (1980), está relacionada com o conteúdo total de grupos SH.

LIU *et el.* (2000) em trabalho sobre a oxidação protéica de proteínas mifibrilares, isolado protéico de soro de leite e de soja por reagentes químicos, verificou que as proteínas do soro do leite foram menos suscetíveis a oxidação apresentando menor porcentagem de conversão de grupos sulfidrilas a ligação dissulfídica. Este experimento foi realizado em pH 6,0, no qual os grupos sulfidrilas da β-Lg estão inacessíveis ao solvente, enquanto somente o grupo tiol da BSA pode ser atacado por radicais de oxigênio resultando em menor oxidação de grupos tiol em ligação dissulfídica.

Para determinação de grupos sulfidrilas utilizam-se métodos colorimétricos, que muitas vezes apresentam problemas para amostras turvas ou menos solúveis. HARDHAM (1981) desenvolveu um método específico para determinação do conteúdo de sulfidrilas em concentrados protéicos de soro, usando o reagente de Ellman. Para reduzir o efeito da turbidez desenvolvida por amostras de concentrado menos solúveis, foi utilizado o processo de filtração em membranas Millipore antes da leitura de absorbância a 412 nm. Esta técnica substituiu com sucesso processos de centrifugação e ultracentrifugação.

2.6.5 Associações hidrofóbicas

A formação de géis semelhantes a coágulos ou géis translúcidos está fundamentalmente relacionada com propriedades moleculares e estruturais das proteínas como: hidrofobicidade média (que depende da composição de aminoácidos), carga líquida, peso molecular e concentração de proteína. Proteínas que contém mais que 31,5% de resíduos de aminoácidos não polares por mol formam géis tipo coágulo, enquanto proteínas que apresentam menos que 31,5% formam géis transparentes (SHIMADA e MATSUSHIDA, 1980). Assim, o conteúdo de aminoácidos não polares e a extensão das interações hidrofóbicas intermoleculares influencia alterações conformacionais que ocorrem sob aquecimento influenciando a formação da matriz de gel (SHIMIZU *et al.*, 1985).

KOHNHORST e MANGINO (1985) observaram nos CPSs disponíveis comercialmente, que o nível de hidrofobicidade ótimo, quando medido por ligação alcano, não foi atingido, mas houve uma correlação positiva entre força do gel e hidrofobicidade da proteína. Em subsequente estudo, MANGINO *et al.* (1987 b) relataram que a ligação alcano de CPS seco não se correlacionou bem com força do gel, mas que a hidrofobicidade quando medida por ligação com ácido cis-parinárico teve correlação com a força do gel. A hidrofobicidade da proteína é altamente dependente das condições de processamento e do meio nas quais as medidas foram feitas. MANGINO *et al.* (1987 b) relataram que o aumento na força do gel devido ao aumento da hidrofobicidade pode ser explicado em parte por um decréscimo no conteúdo de lipídios nos CPSs. MULVIHILL e KINSELA (1988) relataram que lipídios prejudicam a gelatinização.

2.6.6 Concentração de sais

Sais em geral podem influenciar a estrutura das moléculas de proteína, asim como a natureza das interações proteína-água. Os sais influenciam a solubilidade da proteína e sua velocidade de desnaturação térmica. A aparência de géis formados com adição de sal é mais agregada e opaca que os formados sem adição de sal (HERMANSSON,1975; SCHMIDT *et al.*, 1978 b). O Ca^{2+} é o mais importante componente mineral envolvido na agregação de proteínas do soro do leite (SCHMIDT *et*

al., 1984; MULVIHILL e KINSELLA, 1988). Baixos níveis de Ca^{2+} podem aumentar a dureza de géis de CPS através do aumento de ligações cruzadas entre proteínas (KOHNHORST e MANGINO, 1985). Altos níveis de Ca^{+2} resulta em excessiva agregação protéica, o que pode inibir a gelatinização por favorecer ligações proteína-Ca^{2+} intracadeias (SCHMIDT *et al.*,1978a; BERNAL *et al.* 1987). Em valores de pH alcalino, onde as moléculas protéicas estão negativamente carregadas, a adição de 5 a 20 mM da Ca^{2+} tipicamente aumenta a força do gel (SCHMIDT *et al.*, 1979). Ca^{2+} e outros cátions divalentes maximizam interações entre moléculas proteícas negativamente carregadas a pH≥pI e também melhoram a estabilidade e firmeza do gel (SCHMIDT *et al.*,1979; BERNAL *et al.*, 1987). Segundo MATSUDOMI (1991), a dureza de géis de BSA e β-lg foi marcadamente afetada pela adição de $CaCl_2$. BSA formou géis claros e elásticos com concentração de $CaCl_2$ até 5 mM, mas acima de 10 mM os géis tornaram-se túrbidos e deformáveis. Géis de β-lg formados com 2 mM de $CaCl_2$ foram elásticos e transparentes, mas acima de 5 mM, os géis tornaram-se opacos e semelhantes a uma esponja.

Embora CPSs com teor de Ca^{2+} reduzido exibam melhor propriedade gelatinizante (MANGINO, 1992), a diálise de soluções de CPSs comerciais contra água destilada para remover Ca^{2+}, outros íons e lactose prejudica sua capacidade gelatinizante (BRANDENBURG *et al.*, 1992). A remoção de Ca^{2+} antes da secagem, melhora a capacidade gelatinizante porque inibe a agregação proteína-Ca^{2+} (MORR e HA, 1993). CPSs comerciais, geralmente, apresentam de 0,25 a 1,0% de Ca^{2+}, o que corresponde de 50 a 200 mM (MORR e FOEGEDING, 1990). Íons sódio também tem um efeito marcante na textura de géis de proteína do soro. SCHMIDT e MORRIS (1984) relatam que a adição de 0,1 a 0,3 M de NaCl resulta em géis de CPS com maior dureza. SCHIMADA e CHEFTEL (1989) relatam que a adição de NaCl aumentou a firmeza, mas decresceu a elasticidade de géis formados a valores de pH neutro e alcalino, o que se deve provavelmente a inibição de interações protéicas por ligações hidrofóbicas. JOHNS e ENNIS (1981) sugeriram que o aumento na dureza e elasticidade de géis de proteína do soro resultante da substituição de Ca^{2+} por Na^{+}, durante a manufatura do CPS, pode resultar na redução da extensão de ligações cruzadas não específicas de moléculas protéicas desdobradas. Segundo MATSUDOMI (1991), a dureza de géis de BSA não foi afetada pela concentração de NaCl (0 a 400 mM), todavia a dureza máxima de géis de β-lg ocorreu a 20 mM de NaCl e a força do gel decresceu com o aumento da

concentração de NaCl até 400 mM. Os géis de β-lg apresentaram-se transparentes a concentração de NaCl<20 mM e túrbidos e frágeis a concentração de 40 mM. Em alta concentração de NaCl, os géis apresentaram-se sob a forma de coágulos opacos, semelhantes à uma esponja. Em concentrações acima de 80 mM de NaCl, interações repulsivas entre moléculas de β-lg resultam em colapso da matriz protéica, com extensiva sinérese. Isto sugere que interações eletrostáticas podem ser mais importantes na formação e estabilização de géis de β-lg a pH 8,0.

2.5.6.1 Influência de íons cálcio no perfil de textura (TPA)

A textura é um dos principais fatores de qualidade de um alimento e é a sensação sentida na boca quando se mastiga um alimento. Atualmente, utilizam-se equipamentos chamados texturômetros para avaliar parâmetros de textura como fraturabilidade, dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, mastigabilidade e coesividade. Esses equipamentos simulam a mastigação humana e expressam esses parâmetros de textura através de curva força-tempo. Desses parâmetros, os cinco primeiros são medidos pelo equipamento e os dois últimos calculados. ROSENTHAL (1992) apresenta as seguintes definições para os termos acima:

- Fraturabilidade é a força com a qual o material fratura. Um alimento fraturável não é adesivo;
- Dureza é a força requerida para comprimir um alimento entre os molares;
- Adesividade é o trabalho requerido para superar forças atrativas entre a superfície da amostra e do dente;
- Elasticidade é a taxa pela qual um material deformado volta à sua condição original, após ser removida a força deformante;
- Mastigabilidade é a energia necessária para mastigar um alimento sólido até o ponto de ser engolido. Mastigabilidade = Dureza x Coesividade x Elasticidade;
- Gomosidade é a energia necessária para desintegrar um alimento semi-sólido até o ponto de ser engolido. Gomosidade = Dureza x Coesividade.

Em geral, tem sido relatado que a adição de cálcio aumenta a força do gel, ou seja, aumenta sua dureza. Segundo MANGINO (1984), a adição de cálcio em concentração superior a 11mM provocou decréscimo na força do gel, devido a agregação protéica ocorrer rapidamente, o que limita o desdobramento da proteína e a

formação da rede.

SCHMIDT (1978b) verificou que, para géis preparados a 10% de proteína com pH 7,0 e aquecidos a 100°C por 15 minutos, a adição de $CaCl_2$ ou NaCl em soluções dialisadas de CPSs, aumentou a força do gel mais drasticamente do que para soluções não dialisadas. Para soluções de CPSs dialisadas a dureza máxima dos géis foi obtida quando foi adicionado de 5 a 20 mM de cálcio e para soluções não dialisadas a dureza máxima dos géis foi obtida quando foi adicionado 5 mM de cálcio. A coesividade e elasticidade dos géis de soluções de CPS dialisadas decresceram a partir da concentração de 5mM de adição de cálcio, enquanto a coesividade do sistema de gel não dialisado foi máxima em 10 mM e a adição de sal não provocou efeito na elasticidade do sistema não dialisado. Dados de gomosidade seguiram a mesma tendência da dureza e valores de mastigabilidade máximos para os dois sistemas foram verificados entre 5 a 10 mM de adição de $CaCl_2$.

MULVIHILL e KINSELLA (1988) observaram que géis de β-Lg preparados com 10% de proteína em pH 8,0, aquecidos a 90°C por 30 minutos apresentaram um valor máximo de dureza quando houve adição de 10 mM de cálcio. A elasticidade mínima foi verificada quando 15 mM de cálcio foi adicionado e a coesividade foi máxima quando 10 mM de cálcio foi adicionado. A gomosidade e a mastigabilidade dos géis decresceu abruptamente, sendo verificado um valor mínimo quando houve a adição de 10 mM de cálcio. Foi observado um aumento repentino quando 15 mM de cálcio foi adicionado e então os valores diminuiram suavemente com a adição de $CaCl_2$ até 100 mM.

ZIRBEL e KINSELLA (1988) relataram que o cloreto de cálcio afetou a dureza de géis preparados a 20% de proteína em pH 6,0, quando aquecidos a 90°C por 15 minutos. A máxima dureza foi verificada quando houve a adição de 20 mM de Ca^{2+}.

KUHN e FOEGEDING (1991 a) observaram que a diálise de suspensões de CPS e IPS aumentou a força dos géis de dois dos três CPSs analisados e também dos géis de IPS, isto para géis preparados com 10% de proteína em pH 7,0 aquecidos a 80°C por 30 minutos. A reposição do cálcio perdido durante a diálise não provocou alteração significante na reologia dos géis, mas a quelação do cálcio causou um decréscimo

significante na força dos géis, indicando que uma quantidade mínima de cálcio e/ou um complexo de cálcio parece ter uma função importante na gelatinização de proteínas do soro.

KUHN e FOEGEDING (1991 b) verificaram que a formação de gel de suspensões proteícas de IPS com 10% de proteína, pH 7,0 aquecidas a 80°C por 30 minutos, só foi possível com a adição de 7,5 mM de Ca^{2+} e o valor máximo de firmeza do gel foi obtido quando houve a adição de 20 mM de Ca^{2+}.

SMITH e ROSE (1994) avaliaram a influência de agentes quelantes de cálcio em géis de CPS, preparados a 10% de proteína em pH 7,0 aquecidos a 90°C por 15 minutos, e verificaram que a dureza dos géis foi máxima e a "umidade espremível" (UE) foi mínima para três dos quatro CPSs analisados a 10 mM de adição de NaTPP (tripolifosfato de sódio). EDTA (etilenodiaminotetraacético) teve efeito similar nos géis de CPS. A adição de NaTPP ou $CaCl_2$ não melhorou a dureza e a UE de um dos CPSs, o qual continha menor concentração de cálcio total e iônico. Agentes quelantes foram efetivos na melhora das propriedades de gel dos CPSs que continham cálcio acima do nível ótimo.

BARBUT e FOEGEDING (1993) verificaram que a formação de gel iniciou-se em 66°C para soluções de IPS com 4% de proteína e 10 mM de $CaCl_2$ adicionados antes do aquecimento e somente a 72°C foi verificada a formação de gel para soluções que foram aquecidas sem a mesma concentração de $CaCl_2$. Géis formados com 4% de proteína e 10 mM de Ca^{2+} adicionados antes do aquecimento a 90°C tiveram valores de dureza cerca de duas vezes maiores que géis produzidos com 8% de proteína e 20 mM de Ca^{2+} adicionados após o aquecimento a 90°C.

JU e KILARA (1998) verificaram que um período de pré-agregação afetou a dureza de géis de IPI induzidos termicamente. Géis preparados com 10% de proteína a 80°C por 30 minutos com concentrações de $CaCl_2$ variando de 10 a 30 mM e período de incubação a 45°C variando de 0 a 180 minutos apresentaram um valor máximo de dureza com 30 mM de $CaCl_2$ sem incubação da solução e então houve decréscimo do valor de dureza ao longo do tempo de incubação que foi de 180 minutos. Com 20 e 30

mM de $CaCl_2$, a dureza dos géis aumentou e então decresceu, sendo que o máximo de dureza do gel foi verificado para um período de incubação de 60 e 30 minutos respectivamente. Este resultado sugere que a formação de géis com maior valor de dureza requer uma agregação ótima que é dependente do tempo de incubação.

RANTAMÄKI *et al.* (2000) avaliando concentrados protéicos de soro de leite e frações enriquecidas de α-la e β-lg obtidas por diferentes processos, verificaram que géis produzidos de β-lg com 10% de proteína com pH variando de 6,0 a 8.0 apresentou boa capacidade gelatinizante na presença de baixas concentrações de cálcio (0,1-3,0 mM), enquanto que na presença de 34 mM de cálcio a capacidade gelatinizante foi prejudicada. A alta concentração de cálcio presente nestas amostras se deve a remoção de lipídios residuais do soro do leite através da precipitação de fosfolipoproteínas pela adição de $CaCl_2$.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

Foram utilizados dois CPSs comerciais com 80% de proteína fornecidos por AMPC Inc (AMP80) e Calpro Ingredients (Calpro 80) e um IPS fornecido por Avonmore Waterford Ingredients (Provon 190).

3.2. Metodologia

3.2.1 Caracterização da matéria-prima

Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.2.1.1 Determinação de umidade

A porcentagem de umidade foi determinada segundo método 16192 da AOAC (1980), no qual as amostras foram secas em estufa a 110°C até atingir peso constante (± 8 horas). A porcentagem de umidade foi determinada através da diferença de peso entre as amostras úmidas e secas.

3.2.1.2 Determinação de proteína bruta

A porcentagem de proteína foi determinada segundo método 16193 (semi-micro Kjeldahl) da AOAC (1980). Foi quantificada a porcentagem de nitrogênio total presente nas amostras e convertida para porcentagem de proteína bruta utilizando o fator de 6,38.

3.2.1.3 Determinação de gordura

A porcentagem de gordura foi determinada segundo método 16199 da AOAC (1980), no qual a gordura foi extraída com éter etílico e éter de petróleo em proporções iguais por três vezes. Após a extração, a gordura foi seca em estufa a 60°C e sua porcentagem foi determinada pela diferença de peso.

3.2.1.4 Determinação de matéria inorgânica (cinzas)

A porcentagem de cinzas foi determinada segundo método 16196 da AOAC (1980) onde as amostras foram incineradas a 550°C. A porcentagem de cinzas foi determinada pela diferença de peso.

3.2.1.5 Determinação de cálcio, sódio, magnésio e potássio

Foram realizadas por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICPOES). As amostras foram calcinadas e digeridas com mistura ácida (HNO_3/HCl, 1:1) como descrito por BRANDENBERG *et al.* (1992). Efetuou-se a leitura no espectrômetro Perkin Elmer Optima 3000 DV contra curva padrão dos metais requeridos.

3.2.1.6 Determinação de fósforo

A determinação de fósforo baseou-se na AOAC (1980), método 7120 modificado.

As amostras foram digeridas na presença de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio 30% sob aquecimento a 350°C. Preparou-se uma curva padrão com fosfato de potássio com concentrações variando de 20 a 160 μg/ml. Reagente combinado de molibdato de amôneo (8%) e metavanadato de amôneo (0,4%) foi utilizado para reação de cor que se deu em 10 minutos. A absorbância foi lida a 470 nm.

3.2.1.7 Determinação de sulfidrilas reativas

Foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BEVERIDGE *et al.* (1974), empregando-se o processo de filtração em membranas descrito por HARDHAM (1981) para amostras turvas e utilizando-se Reagente de Ellman (4 mg/ml) preparado em tampão Tris-Glicina.

Quantidades de 10 mg de amostra foram dissolvidas em 10 ml de tampão Tris-Glicina (10,4 g de Tris-Base, 6,9 g de glicina e 1,2 g de EDTA por litro) 8 M de uréia em pH 8,0 e 100 μl de Reagente de Ellman foram adicionados para o desenvolvimento de cor, o que ocorreu em 30 minutos. Esta solução foi filtrada através de filtro Millipore 0,45 μm e depois através de filtro Millipore 0,25 μm para evitar turbidez. A absorbância foi lida a 412 nm, contra uma solução branco.

A concentração de sulfidrila livre, segundo BEVERIDGE *et al.* (1974), foi calculada através da expressão:

$$\mu moles\ de\ sulfidrila/g = 735,3 \times Abs_{412\ nm} / peso\ da\ amostra\ (mg)$$

3.2.1.8 Determinação de solubilidade protéica

Seguiu-se a metodologia descrita por MORR et al.(1985) onde 50 ml de dispersão protéica a 1% em NaCl 0,1 M foram homogeneizados por 1 hora utilizando-se agitador magnético, sendo o pH ajustado para 4,6 ou 7,0 a cada intervalo de 15 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 21000 g por 30 minutos a 5°C em centrífuga Sorvall RC5C. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman n° 1. A concentração de nitrogênio total no filtrado foi quantificada pelo método semi- micro Kjeldahl e a % de solubilidade protéica calculada pela fórmula:

% Solubilidade Protéica = [A (mg/ml) x 50] ÷ [W (mg) x S/100] x 100

onde:

A = Concentração de proteína no sobrenadante (mg/ml)

W = Peso da amostra (mg)

S = Concentração de proteína na amostra (%)

3.2.1.9 Perfil eletroforético

A eletroforese foi realizada utilizando-se o sistema SDS-PAGE como descrito por LAEMMLI (1970). Soluções de Calpro 80, AMP 80 e IPS foram preparadas em tampão da amostra com β-mercaptoetanol contendo 1% de proteína e foram aquecidas a 95°C por 4 minutos. A análise foi realizada em um sistema Mini-Protean II com gel de 0,75 mm de espessura. Utilizou-se um gel de corrida com 12% de acrilamida e gel de empilhamento com 4% de acrilamida, sendo que a voltagem aplicada durante a corrida foi de 120 V. Utilizou-se padrão da Amersham Pharmacia Biotech Inc. de baixo peso molecular contendo as seguintes frações proteícas: fosforilase b (94000 da), albumina do soro bovino (67.000 Da), ovalbumina (43.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina (20.100 Da) e α-lactalbumina (14.400 Da). Os géis foram corados em solução contendo 0,1% de Comassie Blue R250, 40% de metanol 10% de ácido acético e 50% de água.

3.2.2 Caracterização das soluções protéicas

3.2.2.1 Diálise das soluções

Soluções de CPS e IPS com 16% de proteína e pH corrigido para 3,8 foram dialisadas em membrana de celulose de 3.500 Da com diâmetro de 34 mm. As soluções foram dialisadas contra água por 24 horas a 6°C sob agitação como descrito por KUHN e FOEGEDING (1991a), sendo que foram feitas duas trocas. Terminada a diálise, foi novamente corrigido o pH para 7,0 e determinado o teor de proteína para que os géis pudessem ser preparados com 10% de proteína.

3.2.2.2 Determinação da transmitância das dispersões protéicas

Seguiu-se a metodologia descrita por LUPANO et al. (1996), onde dispersões a 0,1% de proteína (p/v) de CPSs e IPS tiveram o pH ajustado para 7,0 com NaOH ou HCl 0,1N e foram aquecidas a 90°C em banho de aquecimento por 30 minutos. Os tubos contendo 9,5 ml de dispersões protéicas foram resfriados rapidamente a temperatura ambiente e a absorbância medida a 660 nm contra um branco com água destilada. Para esta determinação o experimento foi feito em triplicata.

3.2.2.3. Determinação da solubilidade protéica das soluções

Seguiu-se a metodologia descrita por MORR *et al.* (1985) onde 50 ml de dispersão protéica a 10% em água deionizada foram homogeneizados por 1 hora utilizando-se agitador magnético, sendo o pH ajustado para 7,0 a cada intervalo de 15 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado para as soluções dialisadas e não dialisadas com adição de diferentes concentrações de $CaCl_2$. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 21000 g por 30 minutos a 5°C em centrífuga Sorvall RC5C. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman n° 1. A concentração de nitrogênio total no filtrado foi quantificada pelo método semi-micro Kjeldahl utilizando-se 1 ml de solução protéica e a % de solubilidade protéica calculada pela fórmula:

% Solubilidade Protéica = B x 1000

onde:

B = Concentração de proteína no sobrenadante (g/ml)

Para esta determinação o experimento foi feito em triplicata.

3.2.2.4 Determinação de cálcio iônico

A determinação da concentração de cálcio iônico da água de diálise e das soluções de CPSs e IPS com 10% de proteína, em sistema dialisado e não dialisado, foi realizada em pH-metro Expandable ion Analyzer EA 940 marca Orion (modelo 93-20) com eletrodo seletivo para Ca^{+2} (modelo 90-01 Orion) como descrito por NADEAU E CLYDESDALE (1991). Preparou-se uma curva padrão com concentrações de Ca^{2+} variando de 10^{-1} a 10^{-5} M. A força iônica das soluções e da água de diálise foi ajustada com KCl 4 M (2ml de KCl 4M para cada 100 ml de solução). A concentração de Ca^{2+} de cada solução e da água de diálise foi calculada da curva padrão log[Ca^{2+}] x potencial.

3.2.2.5 Determinação de fósforo

A determinação de fósforo baseou-se na AOAC (1980), método 7120 modificado.

Aliquotas de 2 ml de soluções dialisadas e não dialisadas de CPSs e IPS com 10% de proteína foram digeridas na presença de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio 30% sob aquecimento a 350°C. Reagente combinado de molibdato de amôneo (8%) e metavanadato de amôneo (0,4%) foi utilizado para reação de cor que se deu em 10 minutos. A absorbância foi lida a 470 nm e utilizou-se uma curva padrão preparada com fosfato de potássio com concentrações variando de 20 a 160 μg/ml.

3.2.3 Caracterização dos géis protéicos

3.2.3.1 Preparação dos géis

Os géis protéicos foram preparados segundo o procedimento descrito por BEUSCHEL *et al.* (1992). Foram preparadas dispersões protéicas com 10% de proteína (p/v) com e sem adição de $CaCl_2$. Essas soluções foram agitadas por 10 minutos em agitador magnético até completa solubilização, tiveram o pH ajustado para 7,0 com NaOH ou HCl 0,1N e permaneceram refrigeradas a 9°C por 15 horas para completa eliminação de bolhas de ar.

Os géis foram produzidos em tubos de vidro vazados, medindo 2,6 cm de diâmetro e 6 cm de altura, tendo sua extremidade inferior fechada por uma rolha de borracha e recoberto superiormente por filme plástico. Para produção desses géis foram utilizados 9,5 ml da solução protéica em cada tubo. Esses tubos foram então aquecidos

em banho-maria a 90°C por 30 minutos e resfriados em banho de água gelada a 6°C por 20 minutos. Os géis foram mantidos a 9°C por 15 horas e então avaliados quanto ao perfil de textura.

3.2.3.2 Perfil de textura (TPA)

O perfil de textura dos géis preparados de soluções de Calpro 80, AMP 80 e IPS foi determinado em texturômetro TA-XT2 e os parâmetros avaliados foram: dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade. Géis com dimensões de 2,6 cm de diâmetro por 1 cm de altura foram comprimidos por um probe acrílico cilíndrico medindo 2,0 cm de diâmetro. Utilizou-se uma força de compressão de 5 g, 50% de compressão, velocidade pré e pós teste de 3 mm/s e velocidade no teste de 1 mm/s. Para esta determinação o experimento foi feito em triplicata e 3 géis de cada experimento foram avaliados.

3.2.3.3 Perfil eletroforético

A eletroforese foi realizada utilizando-se o sistema SDS-PAGE como descrito por LAEMMLI (1970). As amostras de géis proteícos foram liofilizadas e preparadas em tampão da amostra com e sem β-mercaptoetanol sendo aquecidas a 95°C por 4 minutos. A análise foi realizada em um sistema Mini-Protean II com gel de 0,75 mm de espessura. Utilizou-se um gel de corrida com 12% de acrilamida e gel de empilhamento com 4% de acrilamida, sendo que a voltagem aplicada durante a corrida foi de 120 V.

3.2.3.4 Determinação de umidade espremível

A umidade espremível dos géis foi baseada no método descrito por JAUREGUI *et al.* (1981) com as modificações descritas por BEUSCHEL *et al* (1992). Amostras de gel (de 1 a 2 g) foram pesadas em papel de filtro Whatman n°2 e centrifugadas a 700g (2500 rpm em rotor SS34 – Centrífuga Sorvall RC5C) por 10 minutos a 6°C. A porcentagem de umidade espremível foi calculada através da diferença entre o papel de filtro seco e úmido. Quanto maior a umidade expremível, ou seja, quanto maior a quantidade de água liberada, menor será a capacidade de retenção de água dos géis. A porcentagem de capacidade de retenção de água dos géis pode ser calculada pela fórmula:

% Capacidade de retenção de água = 100 – (% de umidade expremível)

Para esta determinação o experimento foi feito em triplicata e 3 géis de cada experimento foram avaliados.

3.2.4 Procedimento estatístico

Os dados foram avaliados por Análise de Variância e as diferenças entre as médias das amostras por Teste de Tukey utilizando-se o programa Statistica 5.0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química e solubilidade

Tabela 2. Composição química e solubilidade dos CPSs e IPS

(%)	Calpro 80	AMP 80	IPS
Umidade	6,24 ± 0,04	7,56 ± 0,01	6,66 ± 0,12
Proteína bruta (%Nx6,38)	75,49 ± 0,15	73,80 ± 0,35	85,22 ± 0,48
Gordura	5,72 ± 0,27	5,11 ± 0,18	0,71 ± 0,04
Cinzas	5,51 ± 0,08	3,88 ± 0,02	2,50 ± 0,07
Cálcio	0,42 ± 0,007	0,42 ± 0,005	0,52 ± 0,008
Fósforo	0,93 ± 0,010	0,48 ± 0,008	0,19 ± 0,007
Solubilidade em NaCl 0,1M (pH 7,0)	90,00 ± 0,91	93,71 ± 1,60	97,33 ± 0,13
Solubilidade em NaCl 0,1 M (pH 4,6)	84,02 ± 0,82	88,96 ± 0,62	93,38 ± 2,83

Médias seguidas de desvio padrão. Análises realizadas em triplicata.

Os valores encontrados para a composição química dos CPSs e IPS apresentados na Tabela 2, são similares aos resultados relatados por MORR (1992), SMITH e ROSE (1994) e KUHN e FOEGEDING (1991a), sendo que o valor de cálcio encontrado para o IPS foi superior aos relatados pela literatura. MORR (1992) avaliou três IPSs e oito CPSs, obtendo valores de teor de proteína na faixa de 88,6 a 92,7% e de 72 a 76,6%, respectivamente. A solubilidade protéica determinada em pH 7,0, foi superior a 62% para os CPSs e superior a 98% para os IPSs. O conteúdo de minerais variou de 1,37 a 2,15% para os IPSs e de 2,52 a 6,04% para os CPSs. O teor de cálcio variou de 0,25 a 1,06% para todos os produtos e lipídios de 0,39 a 0,67% para os IPSs e de 3,30 a 7,38% para os CPSs. SMITH e ROSE (1994) avaliaram três concentrados protéicos comerciais e obtiveram valores de teor de proteína entre 73,6 a 76,6%, solubilidade de 92,5 a 96,6 em NaCl, teor de cálcio de 0,22 a 0,41%, concentração de sódio de 0,23 a 1,26% e teor de fósforo de 0,37 a 0,99%. KUHN e FOEGEDING (1991a) avaliaram 3 CPSs e um IPS e obtiveram os seguintes resultados: teor de proteína entre de 74 a 76,6% para os CPSs e 91,9% para o IPS; solubilidade de 72,4 a 88,3% para os CPSs e 93,9% para o IPS; cinzas de 3,52 a 6,08% para os CPSs e 1,92% para o IPS; teor de cálcio de 0,26 a 1,05% para

os CPSs e 0,20% para o IPS e teor de fósforo de 0,29 a 1,30% para os CPSs e 0,047% para o IPS.

Os valores de solubilidade representados na Tabela 2 foram determinados em NaCl 0,1 M em pH 7,0 e 4,6 e para os dois valores de pH, as amostras apresentaram-se altamente solúveis, o que era esperado para proteínas do soro que quando não desnaturadas são solúveis em ampla faixa de pH. Apesar de uma pequena redução no valor da solubilidade protéica em pH 4,6 (pH de desnaturação das globulinas), as 3 amostras ainda apresentaram-se altamente solúveis (solubilidade superior a 84%), o que segundo de WITT (1990) e MORR (1992) indica a não desnaturação da β-Lg.

A amostra de Calpro 80 apresentou menores valores de solubilidade tanto em pH 7,0 como em pH 4,6 (Tabela 2). Os valores de solubilidade das soluções de CPSs e IPS com 10% de proteína em água deionizada e pH 7,0, com a adição de diferentes níveis de $CaCl_2$ foram determinados como mostram as Tabela 3 e 4, sendo que na Tabela 4 encontram-se os resultados de solubilidade de soluções de CPSs e IPS dialisadas contra água deionizada por 24 horas para retirada de íons cálcio.

Tabela 3. Valores de solubilidade proteíca de soluções de CPSs e IPS com 10% de proteína em água deionizada e pH 7,0

$[CaCl_2]$	SOLUBILIDADE (%)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$88,28 \pm 0,58^a$	$88,91 \pm 0,88^a$	$94,00 \pm 0,37^a$
10	$87,90 \pm 1,11^a$	$89,95 \pm 3,32^a$	$93,59 \pm 0,66^a$
15	$89,92 \pm 0,84^a$	$90,71 \pm 0,70^a$	$95,21 \pm 1,77^a$
25	$90,42 \pm 0,79^a$	$89,41 \pm 0,22^a$	$95,77 \pm 0,40^a$
35	$88,78 \pm 1,10^a$	$92,45 \pm 0,10^a$	$91,89 \pm 1,86^b$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

Verifica-se na Tabela 3 que para as três amostras analisadas, houve um decréscimo na solubilidade quando determinada em água deionizada (nível 0 mM de adição) em comparação aos valores determinados em NaCl 0,1M (Tabela 2) em mesmo pH. Este resultado está de acordo com HAYAKAWA e NAKAI (1985), que relatam interações preferenciais (efeito "salting-in") da β-Lg com NaCl a baixas concentrações. Segundo VOJDANI (1996), condições do solvente (íons, solutos neutros, pH, temperatura) modificam a estrutura da proteína e consequentemente o balanço de forças intermoleculares que controlam a solubilidade da proteína. As forças repulsivas (eletrostáticas e hidratação) que impedem a agregação protéica, são mínimas no pI onde as proteínas são insolúveis a menos que a carga líquida da proteína seja controlada por cátions altamente hidratados como Mg^{2+}, Ca^{2+} e Na^{+}.

Segundo (PHILLIPS *et al.* 1994), a solubilidade de proteínas é controlada por um balanço entre forças intermoleculares atrativas e repulsivas que depende da estrutura da proteína e é afetada por condições do solvente. Proteínas são solúveis em água quando forças repulsivas eletrostáticas são superiores as interações hidrofóbicas. Grupos ionizáveis e polares de proteínas conferem solubilidade em virtude de sua maior capacidade de ligação de hidrogênio com moléculas de água (DAMODARAN e KINSELLA, 1982).

Proteínas nativas que contém muitos resíduos de aminoácidos aromáticos expostos são muito mais insolúveis no pH isoelétrico (pI) que aquelas que possuem poucos resíduos aromáticos. Embora a β-Lg seja uma proteína relativamente hidrofóbica, a ausência de muitos grupos apolares (particularmente aromáticos) na sua superfície torna-a solúvel em solução aquosa enquanto que soluções com baixa concentração iônica de sais neutros (<0,1 M NaCl) pode aumentar sua solubilidade (HAYAKAWA e NAKAI, 1985).

Tabela 4. Valores de solubilidade protéica de soluções de CPSs e IPS dialisadas com 10% de proteína em água deionizada e pH 7,0

$[CaCl_2]$	SOLUBILIDADE (%)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$89,51 \pm 0,88^{a}$	$91,46 \pm 0,84^{a}$	$94,53 \pm 0,84^{a}$
10	$89,38 \pm 0,18^{a}$	$89,16 \pm 0,29^{a}$	$93,24 \pm 0,66^{ba}$
15	$90,59 \pm 0,10^{a}$	$89,20 \pm 2,62^{a}$	$93,93 \pm 0,18^{a}$
25	$89,13 \pm 0,14^{a}$	$90,14 \pm 1,63^{a}$	$89,10 \pm 0,57^{c}$
35	$85,03 \pm 0,87^{b}$	$87,08 \pm 1,04^{b}$	$91,47 \pm 0,45^{b}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

Analisando as Tabelas 3 e 4 e as Figuras 1 e 2 verifica-se que as amostras de CPS e IPS continuaram a apresentar alta solubilidade para as diferentes concentrações de cálcio adicionadas tanto antes como após a diálise, portanto não foi verificado o efeito "salting-out" que segundo VOLDJANI (1996) poderia ocorrer em soluções protéicas de soro de leite com a adição de cátions divalentes mesmo que a baixas concentrações.

Para o nível de adição de 35 mM de $CaCl_2$ em soluções dialisadas dos CPSs e soluções dialisadas e não dialisadas do IPS verificou-se uma pequena tendência a diminuição da solubilidade protéica (Figura 1 e 2). Segundo HONGSPRABHAS e BARBUT (1997), soluções de IPS apresentaram efeito "salting-in" para concentrações de $CaCl_2$ abaixo de 40 mM e efeito "salting-out" para concentrações superiores a este valor.

A análise estatística ($P<0,05$) mostrou que a adição de 35 mM de $CaCl_2$ provocou diferença significativa na solubilidade protéica dos dois CPSs analisados em sistema dialisado, enquanto que em sistema não dialisado não se verificou diferença significativa para as concentrações de $CaCl_2$ adicionadas. A solubilidade protéica das soluções de IPS com adição de 35 mM de $CaCl_2$ foi significativamente ($P<0,05$) diferente dos demais níveis antes do processo de diálise. Após o processo de diálise, o nível de 25 mM de adição de $CaCl_2$ mostrou-se significativamente diferente dos demais níveis de adição.

Concentrados protéicos de soro de leite são dispersados mais facilmente em água do que isolado protéico de soro de leite.

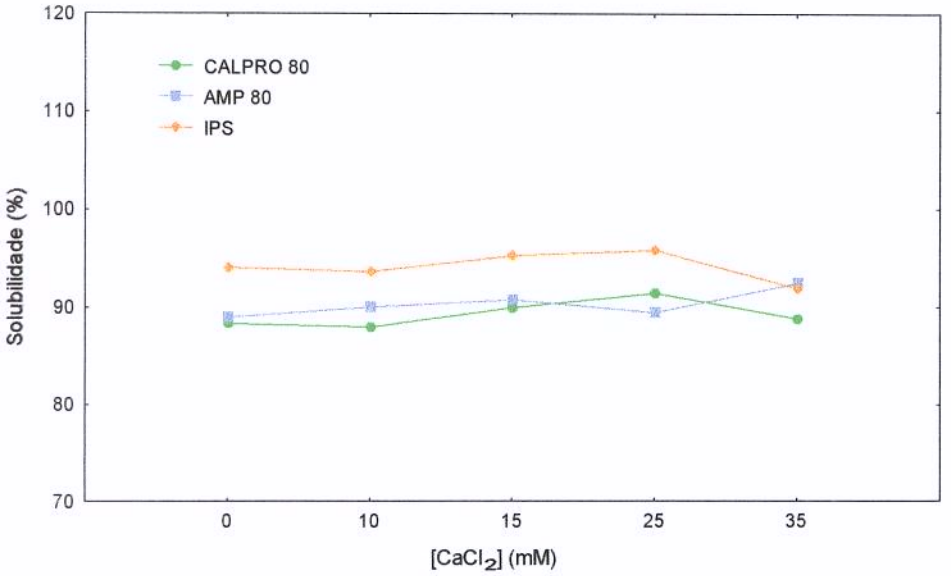


Figura 1. Efeito da adição de $CaCl_2$ na solubilidade protéica de CPSs e IPS

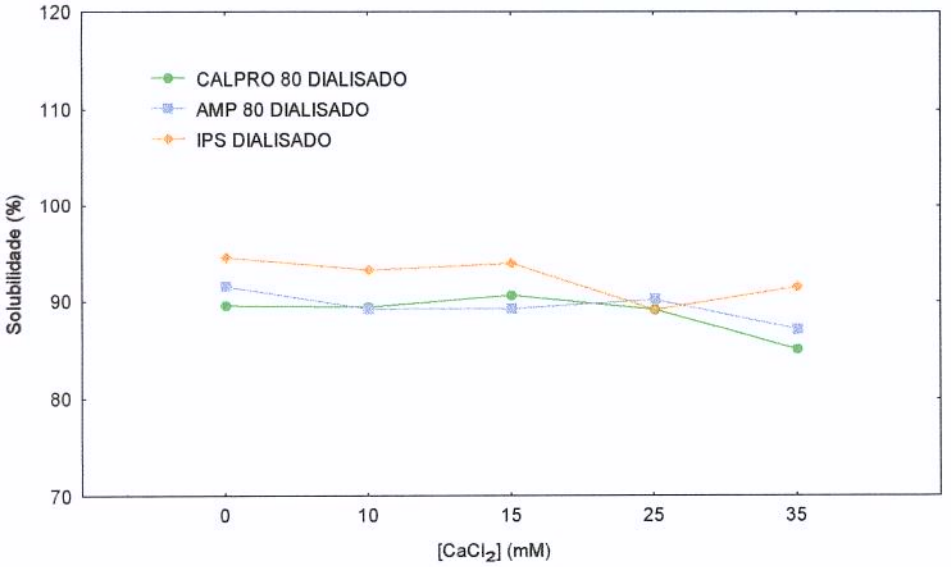


Figura 2. Efeito da adição de $CaCl_2$ na solubilidade protéica de CPSs e IPS dialisados

Os diferentes teores de minerais (como apresentado na Tabela 2), em especial cálcio e fósforo, ocorrem principalmente devido ao tipo de processamento empregado (de WITT 1990) . Segundo de RHAM e CHANTOM (1984), a manipulação das concentrações de cálcio, magnésio, citrato e fosfato podem alterar as propriedades de solubilidade e

gelatinização. Dentre os íons citados, é conhecido o efeito marcante do cálcio sobre as propriedades funcionais de proteínas do soro do leite. Assim, as concentrações de Ca^{2+} foram alteradas através da adição de $CaCl_2$ e da remoção do cálcio que se apresentava livre, através do processo de diálise. A eficiência do processo de diálise não foi a mesma para as amostras de CPSs e IPS. Da amostra CALPRO 80 foi retirado 65% de cálcio e 50% do fósforo, da solução de AMP 80 retirou-se 28% de cálcio e 14% do fósforo e do IPS retirou-se 52% do cálcio e a quantidade de fósforo permaneceu a mesma. Verificou-se através destes valores que a forma como estes íons estão presentes na amostra é diferente. Segundo (DEMOTT, 1969; MULDOON e LISKA, 1972), o cálcio pode ocorrer em três formas nas proteínas do soro do leite: ligado a proteína; complexado com lactose, fosfato e outros minerais (fosfato de cálcio coloidal) ou ionizado ou livre e o equilíbrio entre estas três formas pode ser alterado produzindo CPSs com características funcionais específicas.

Após o processo de diálise, as amostras de CPS passaram a apresentar o mesmo valor de fósforo (0,06%) e também valores de solubilidade muito próximos para o nível de 35 mM de adição de cálcio (Tabela 4). Segundo KHUN e FOEGEDING (1991a), a menor solubilidade poderia estar relacionada a maiores quantidades de cálcio ligado a proteínas menos solúveis ou na forma de complexos de fosfato de cálcio coloidal.

A transmitância das soluções de CPSs e IPS dialisadas e não dialisadas foi determinada em 660 nm como mostram as Figuras 3 e 4. As soluções de Calpro 80 e AMP 80 apresentaram-se menos translúcidas (mais opacas) que a solução de IPS, sendo a solução de Calpro 80 mais opaca que a solução de AMP 80, tanto antes como após a diálise. O perfil de transmitância do concentrado protéico AMP 80 praticamente não foi alterado quando a solução foi dialisada, pois como citado anteriormente para esta amostra o processo de diálise se mostrou pouco eficiente. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa ($P<0,05$) nos valores de transmitância para as diferentes concentrações de $CaCl_2$ adicionadas. Este resultado indica que esta amostra deve conter cálcio e talvez outros cátions complexados com fosfato formando complexos maiores que não passaram pelos poros da membrana.

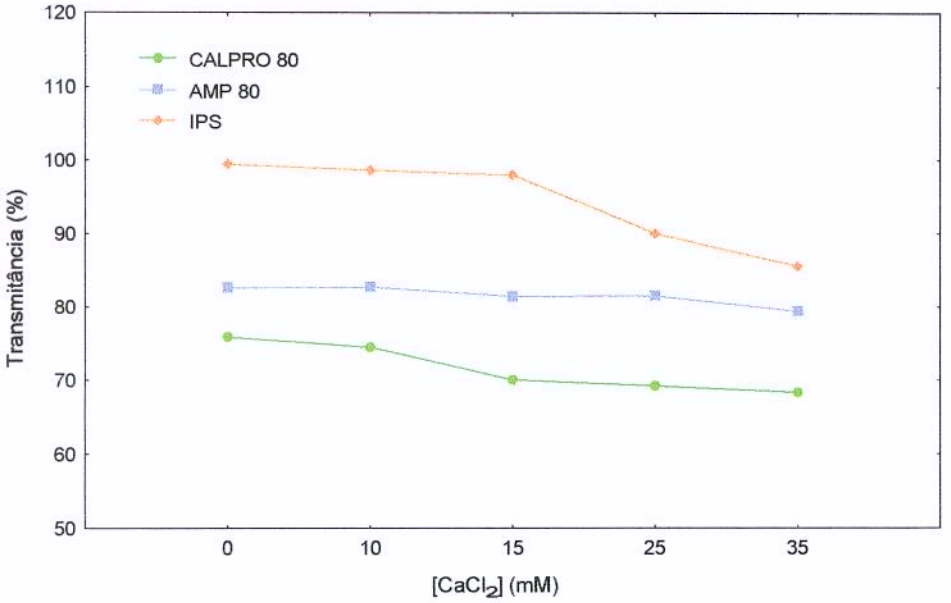


Figura 3. Efeito da adição de $CaCl_2$ na transmitância de soluções de CPSs e IPS

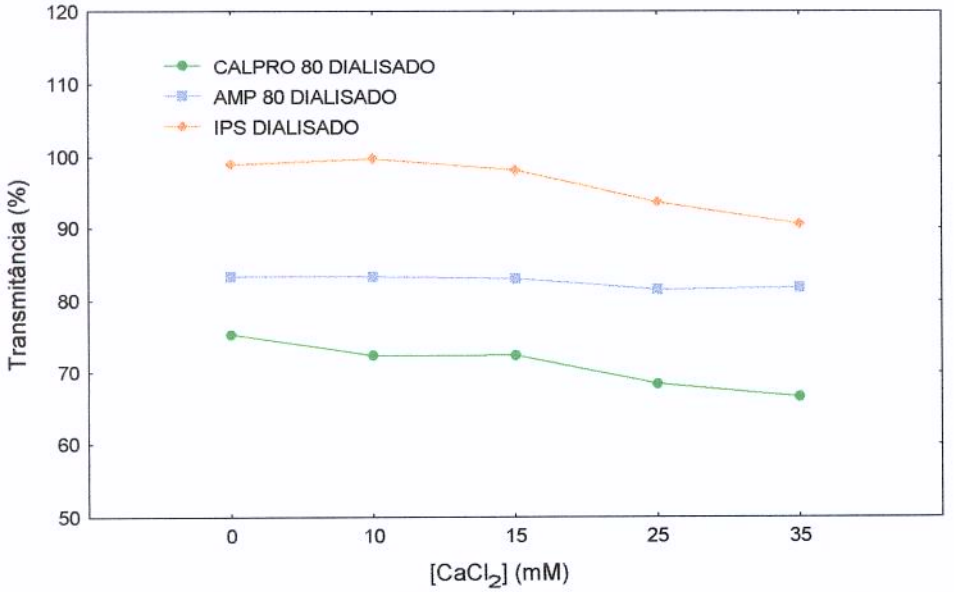


Figura 4. Efeito da adição de $CaCl_2$ na transmitância de soluções dialisadas de CPSs e IPS

Soluções de CPS Calpro 80 apresentaram uma diminuição nos valores de transmitância quando 10 mM de $CaCl_2$ foi adicionado antes e após a diálise, e as soluções de IPS apresentaram uma queda mais acentuada a partir da adição de 15 mM de $CaCl_2$ tanto em sistema dialisado como em sistema não dialisado. Segundo LUPANO *et al.* (1996), a queda no valor de transmitância indica a presença de poucos agregados

insolúveis o que confirma a tendência verificada nas Figuras 2 e 3 pela diminuição no valor da solubilidade uma vez que a análise estatística indicou que a adição da concentração de 35 mM de $CaCl_2$ foi significativamente diferente ($P<0,05$) dos demais níveis de adição para a amostra de Calpro 80 e para o IPS.

4.2 Perfil de textura dos géis de CPSs e IPS

Avaliando a Tabela 5, verifica-se que os dois CPSs apresentaram o mesmo teor de cálcio total, mas diferiram no conteúdo de fósforo e sódio. Esta observação é importante, pois não somente o conteúdo de minerais é importante, como também a forma como se apresentam na amostra. Segundo a literatura, íons divalentes têm uma influência maior sobre as propriedades funcionais, principalmente a gelatinização, do que íons monovalentes. O cálcio presente em concentrados e isolados proteícos de soro de leite pode apresentar-se na forma iônica, ligado a proteína ou complexado com fósforo (fosfato de cálcio coloidal). A Tabela 6 mostra o conteúdo de cálcio e fósforo das soluções utilizadas para o preparo dos géis e do total de cálcio, quanto se apresentava na forma iônica e complexado. Verifica-se que para as três amostras, a quantidade de cálcio complexada foi muito semelhante e que o IPS apresentou muito cálcio na forma iônica. Este será um fator determinante na avaliação do perfil de textura dos géis.

Tabela 5. Teor de minerais dos CPSs e IPS

	Ca (%)	K (%)	P (%)	Na (%)	Mg (%)
Calpro 80	0,42 ± 0,007	0,65 ± 0,015	0,93 ± 0,010	0,29 ± 0,001	0,05 ± 0,001
AMP 80	0,42 ± 0,005	0,67 ± 0,010	0,48 ± 0,008	0,87 ± 0,025	0,04 ± 0,001
IPS	0,52 ± 0,008	0,43 ± 0,012	0,19 ± 0,007	0,16 ± 0,004	0,14 ± 0,003

Médias seguidas de desvio padrão. Análises realizadas em triplicata.

Tabela 6. Concentrações de cálcio iônico, cálcio complexado e fósforo em soluções de CPSs e IPS com 10% de proteína e pH 7,0 antes do processo de diálise

	$[Ca^{2+}]$ (%)	[Ca] complexado (%)	P (%)
Calpro 80	0,02	0,40	0,12
AMP 80	0,02	0,40	0,07
IPS	0,16	0,36	0,02

O CPS Calpro 80 apresentou conteúdo muito superior de fósforo (Tabela 6), o que poderia levar a suposição de que grande parte do cálcio complexado estivesse na forma de fosfato de cálcio coloidal, mas isto não se verificou pois, como mostra a Tabela 6 esta apresentou maior quantidade de íons dialisáveis. O processo de diálise foi realizado em pH 3,8 onde além do cálcio livre, o cálcio ligado a α-La também tornou-se dialisável por uma desestabilização provocada na molécula protéica (BRAMAUD *et al.* 1995). Verificou-se ainda, que o sistema mais estável foi o AMP 80, pois somente 28% do cálcio e 14% do fósforo foram retirados. Esta amostra também apresentou maior concentração de sódio (Tabela 5) o que levaria a se supor que grande parte do fósforo presente estivesse na forma de fosfato de sódio, pois segundo XIONG (1992), em pH 7, 0 o fosfato está em sua forma mais ionizável facilitando a formação do fosfato de sódio o qual estabiliza moléculas protéicas.

Tabela 7. Eficiência do processo de diálise

	Ca retirado (%)	P retirado (%)
Calpro 80	65	50
AMP 80	28	14
IPS	52	0

Tabela 8. Concentrações de cálcio complexado e fósforo em soluções de CPSs e IPS com 10% de proteína e pH 7,0 após o processo de diálise

	[Ca] complexado (%)	P (%)
Calpro 80	0,15	0,06
AMP 80	0,30	0,06
IPS	0,25	0,02

Na Tabela 8 verifica-se que após o processo de diálise, as amostras de CPS passaram a apresentar o mesmo conteúdo de fósforo, diferindo em 50% o valor de cálcio complexado nas amostras de CPS. A amostra de IPS apresentou o mesmo valor de fósforo e valor bem menor para cálcio. As concentrações de cálcio apresentadas nas tabelas anteriores poderiam ser calculadas em milimoles para facilitar a comparação dos dados com obtidos com os dados relatados pela literatura. Assim antes da diálise, soluções de Calpro 80 com 10% apresentaram 14,0 mM de cálcio total e 0,5 mM de cálcio iônico; soluções de AMP apresentaram 14,2 mM de cálcio total e 0,7 mm de cálcio iônico

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

e o IPS apresentou 15,2 mM de cálcio total e 4,6 mM de cálcio iônico. Após a diálise, foram retirados 9, 4 e 8 mM de cálcio iônico das amostras de Calpro 80, AMP 80 e IPS respectivamente, sendo que o valor de cálcio total passou para 5; 10,2 e 7,2 mM. A alteração do pH durante o processo de diálise permitiu que maior quantidade de cálcio passasse para a forma iônica.

Os géis produzidos de CPS Calpro 80 e AMP 80 apresentaram uma coloração amarelada e muito brilho. Essas duas características foram sendo gradativamente perdidas à medida que se aumentava a adição de $CaCl_2$, sendo que para as concentrações de 25 e 35 mM de adição de $CaCl_2$ os géis apresentaram-se totalmente brancos e sem brilho, semelhantes a coágulos tanto antes como após a diálise. Os géis de IPS produzidos sem e com adição de $CaCl_2$ apresentaram-se brancos, sem brilho, semelhantes a coágulo antes do processo de diálise. Para os géis produzidos de soluções dialisadas de IPS, verificou-se uma mudança na transparência sem a adição de $CaCl_2$ e segundo DOI (1993), aumentando-se a força iônica os géis passam de transparentes para opacos e depois túrbidos. Géis transparentes possuem uma rede formada por polímeros lineares, enquanto que em géis opacos e túrbidos os agregados são formados ao acaso (desordenadamente). Os valores máximos de dureza são encontrados quando os géis estão passando de transparentes para opacos. Segundo FERRY *et al* (1948), a aparência transparente de géis está relacionada com menos interações intermoleculares e uma estrutura de gel mais compacta com menor distância intercadeias.

A Tabela 9 e a Figura 5 mostram que o perfil de dureza dos géis produzidos das três amostras apresentou grande diferença para as diferentes concentrações de cálcio adicionadas. O CPS Calpro 80 apresentou valor máximo de dureza quando houve adição de 25 mM de $CaCl_2$. Para a amostra AMP 80, a adição de $CaCl_2$ só prejudicou a propriedade de dureza, produzindo géis mais frágeis e os géis produzidos de IPS também apresentaram-se muito frágeis. Como comentado anteriormente, a amostra de Calpro 80 apresentava maior quantidade de fósforo e este dialisável, sugerindo que ao se adicionar cálcio parte foi convertida em fosfato de cálcio e somente depois o Ca^{2+} se envolveu em interações para manter a estrutura do gel. Segundo SMITH e ROSE (1994), a adição de 10 mM de tripolifosfato de sódio a soluções de CPS com 12% de proteína em pH 7,0 aumentou a firmeza de géis produzidos a 90°C por 15 min. O CPS AMP 80 não apresentou este comportamento. A amostra de IPS apresentou alta concentração de

Ca^{2+} (Tabela 6) que já se mostrava desfavorável a gelatinização, assim a adição de $CaCl_2$ não melhorou a propriedade de gel.

Tabela 9. Valores de dureza de géis com 10% de proteína de CPSs e IPS

$[CaCl_2]$	DUREZA (g)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$260,95 \pm 21,62^{a}$	$424,57 \pm 11,08^{a}$	$158,39 \pm 2,07^{ab}$
10	$455,37 \pm 44,07^{b}$	$287,68 \pm 24,12^{b}$	$178,09 \pm 11,78^{ac}$
15	$550,71 \pm 8,61^{c}$	$201,03 \pm 16,05^{c}$	$196,74 \pm 13,07^{cd}$
25	$613,02 \pm 13,98^{c}$	$146,94 \pm 6,26^{d}$	$219,69 \pm 14,02^{d}$
35	$92,92 \pm 1,50^{d}$	$151,25 \pm 3,69^{d}$	$141,05 \pm 0,61^{b}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo Teste de Tukey.

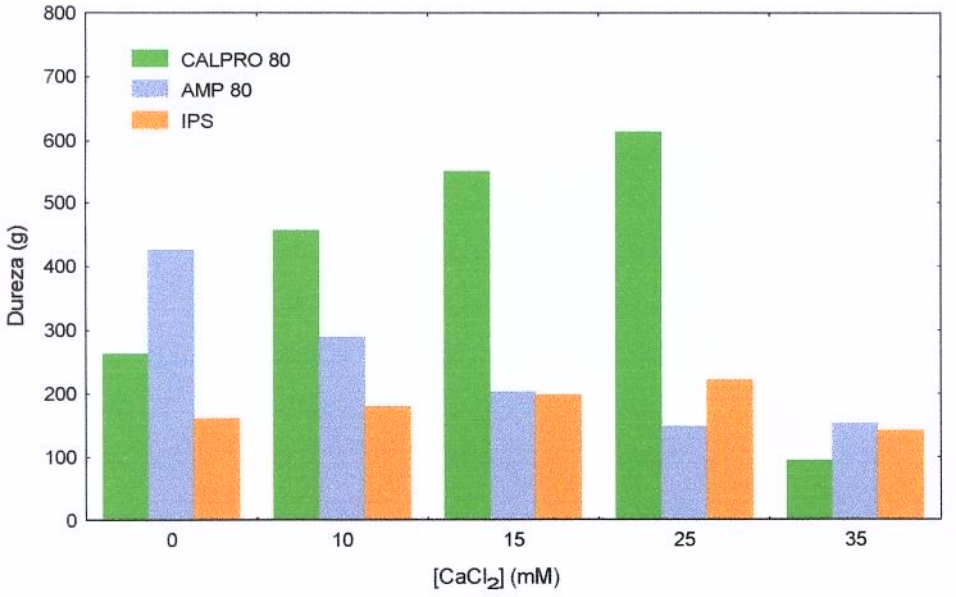


Figura 5. Efeito da adição de $CaCl_2$ na dureza de géis de CPSs e IPS

Após o processo de diálise, verificou-se sensível alteração no perfil de dureza das três amostras como mostra a Tabela 10 e a Figura 6. Os CPSs Calpro 80 e AMP 80 apresentaram valor máximo de dureza quando 15 mM de $CaCl_2$ foram adicionados e o

IPS apresentou valor máximo de dureza quando 10 mM de $CaCl_2$ foram adicionados. As características visuais dos géis produzidos com solução de IPS dialisada foram alteradas drasticamente, assim como os valores de dureza. Géis produzidos de solução de IPS dialisada sem adição de $CaCl_2$ apresentaram-se amarelos, pouco deformáveis, semelhantes a gelatina. Com a adição de $CaCl_2$ esta característica foi sendo perdida e os géis apresentaram-se brancos e deformáveis.

Tabela 10. Valores de dureza dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados

$[CaCl_2]$	DUREZA (g)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$211,33 \pm 6,62^{a}$	$212,17 \pm 13,12^{ab}$	$366,44 \pm 3,73^{a}$
10	$514,16 \pm 9,80^{b}$	$500,95 \pm 15,49^{c}$	$1050,12 \pm 85,21^{b}$
15	$581,75 \pm 13,30^{c}$	$627,95 \pm 21,22^{d}$	$199,09 \pm 13,81^{c}$
25	$244,75 \pm 17,48^{d}$	$252,67 \pm 13,83^{b}$	$144,99 \pm 6,53^{c}$
35	$68,48 \pm 3,72^{e}$	$210,04 \pm 12,52^{a}$	$119,17 \pm 9,91^{c}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

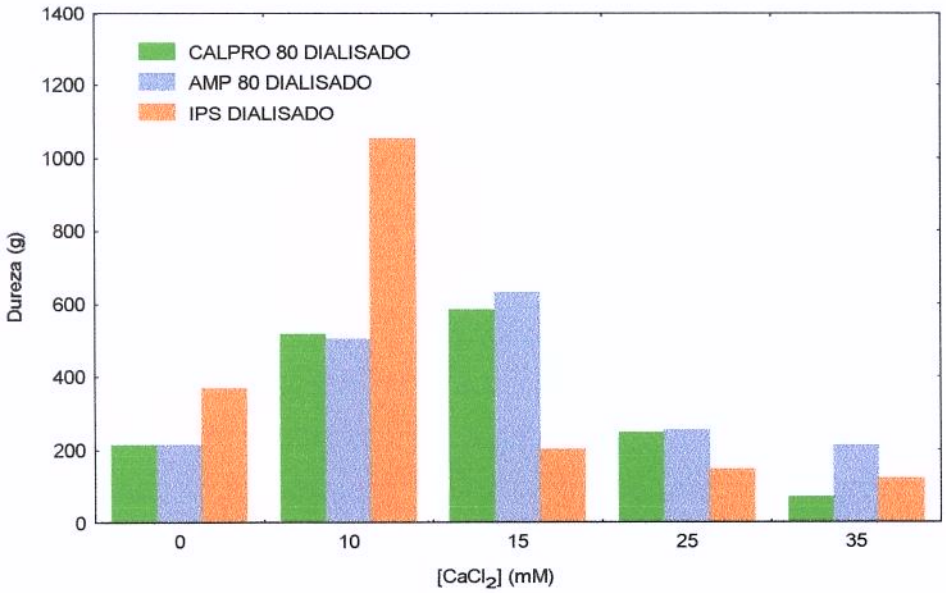


Figura 6. Efeito da adição de $CaCl_2$ na dureza de géis de CPSs e IPS dialisados

KHUN e FOEGEDING (1991a), avaliaram três CPSs (80% de proteína) e um IPS e verificaram que a através do processo de diálise realizado em pH 7,0, utilizando

membrana de celulose com porosidade de 3500 Da, foi possível remover de 40 a 60% do cálcio presente nas amostras, exceto para um dos concentrados do qual só foi possível a remoção de 10% do cálcio presente. Após o processo de diálise, géis produzidos de suspensões protéicas com 10% de proteína apresentaram maiores valores de firmeza do que géis produzidos de soluções não dialisadas, o que só se verificou para a amostra de IPS avaliada neste estudo.

Segundo MANGINO (1992), um perfeito balanço entre forças atrativas e repulsivas deve existir para a formação de uma matriz de gel ordenada que produza géis fortes com grande capacidade de retenção de água. Neste experimento, os géis foram produzidos a temperatura de 90°C e pH 7,0 onde além de interações eletrostáticas mediadas pelo Ca^{2+} também ligações cruzadas poderiam estar mantendo a estrutura dos géis produzidos. Segundo SHIMADA e CHEFTEL (1988), reações de intertroca sulfidrila-dissulfídica são catalizadas em pH superior a 7,0. A Tabela 10 mostra o conteúdo de sulfidrilas livres das três amostras. Verifica-se que o IPS apresentou conteúdo de sulfidrilas livres superior ao dos CPSs o que explicaria o valor de dureza superior ao dos CPSs quando não adicionado $CaCl_2$ após a diálise. Antes da diálise poderia se dizer que a estrutura dos géis de IPS estaria sendo mantida por interações eletrostáticas (coágulos) e após a retirada do cálcio através da diálise a estrutura dos géis estaria sendo mantida por ligações dissulfídicas principalmente. À medida que se adiciona $CaCl_2$ os dois tipos de interação estão ocorrendo mas preferencialmente interações eletrostáticas, que necessitam de menor fornecimento de energia para se estabelecerem (21 a 84 kJ/mol).

Tabela 11. Concentração de sulfidrilas livres

	Calpro 80	AMP 80	IPS
Sulfidrilas livres (μM/g)	$15,26 \pm 0,29^a$	$14,20 \pm 0,35^b$	$19,30 \pm 0,24^c$

Médias em linhas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo Teste de Tukey.

Os valores relatados na tabela acima estão de acordo com os valores encontrados por LI-CHAN (1983) e LIU *et al.* (2000). SHIMADA e CHEFTEL (1988) encontraram valores de 40,6 e 54,6 μmol/g de sulfidrilas livres para IPS e β-Lg respectivamente. Segundo LIU *et el.* (2000), grupos sulfidrilas da BSA apresentam maior reatividade em pH 6,0. Em pH 7,0, α-La e β-Lg são as principais responsáveis por reações de intertroca dissulfidica/tiol. A α-La quando aquecida sozinha não é capaz de agregar ou polimerizar.

Segundo de WITT (1988), quando soluções de α-la com 10% de proteína em pH 6,5 foram aquecidas não produziram géis o que sugere a falta de reações intertroca dissulfica/tiol que inicia o processo de gelatinização, mas quando aquecida na presença de BSA e β-lg em pH neutro e temperatura superior a 70°C forma géis por meio de ligações dissulfídicas e interações hidrofóbicas (GEZIMATI *et al.*,1997). RANTAMÄKI *et al.* (2000) verificou que géis produzidos de β-lg apresentaram boa capacidade gelatinizante para concentrações de cálcio de 0,1 a 3 mM mas, para concentrações de 34mM de cálcio a firmeza dos géis decresceu.

Nas Figuras 5 e 6 verificou-se que o perfil de dureza das amostras de CPS mostrou a mesma tendência. Existe um concentração ótima de adição de $CaCl_2$ que proporciona um valor máximo de dureza e a partir deste nível ótimo de adição de $CaCl_2$ os valores de dureza começam a decrescer. Segundo MULVIHILL e KINSELA (1988), os íons cálcio promovem pontes de Ca^{2+} entre grupos negativamente carregados de moléculas adjacentes, fortalecendo a matriz do gel. Quando a concentração de cálcio é excedida, pontes de cálcio tornam-se excessivas e a matriz sofre colapso, formando um coágulo. O grau de ligações cruzadas na formação da rede de gel pode ser variável e a força dos géis pode ser manipulada. As diferenças na capacidade de formação dos géis observada para proteínas globulares geralmente reflete um grau variável de interações proteína-proteína que depende da extensão das interações de sítios ativos disponíveis nas moléculas desdobradas.

De todos os parâmetros do perfil de textura, a adesividade foi o mais difícil de ser obtido com baixo desvio padrão, pois durante o teste de compressão no texturômetro as amostras aderem ao probe provocando muito erro na determinação. Os géis de CPSs apresentaram baixa adesividade e a adição de $CaCl_2$ provocou aumento na adesividade tanto em sistema dialisado como não dialisado. Os géis de IPS tiveram um comportamento bastante diferenciado, apresentando alta adesividade antes da diálise e após a diálise apresentou baixa adesividade (Tabelas 12 e 13 e Figuras 7 e 8). Géis menos adesivos e mais elásticos foram produzidos de soluções dialisadas sem a adição de $CaCl_2$.

Os valores de adesividade dos géis preparados com soluções de CPS e IPS, dialisadas e não dialisadas, sem a adição de $CaCl_2$ mostraram-se significativamente diferentes ($P<0,05$) dos valores obtidos para os géis preparados com diferentes concentrações de $CaCl_2$.

Tabela 12. Valores de adesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS

$[Ca^{+2}]$	ADESIVIDADE (g)		
MM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$3,11 \pm 0,25^a$	$5,35 \pm 0,54^a$	$18,27 \pm 1,92^a$
10	$5,62 \pm 0,10^b$	$17,80 \pm 0,74^b$	$22,43 \pm 1,83^b$
15	$7,63 \pm 0,79^c$	$16,19 \pm 1,16^b$	$26,39 \pm 1,13^c$
25	$15,73 \pm 0,72^d$	$18,32 \pm 0,89^b$	$31,01 \pm 0,55^d$
35	$26,50 \pm 0,44^e$	$20,91 \pm 0,71^c$	$21,51 \pm 0,32^b$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 13. Valores de adesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados

$[CaCl_2]$	ADESIVIDADE (g)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$2,14 \pm 0,15^a$	$2,99 \pm 0,16^a$	$3,68 \pm 0,36^a$
10	$7,26 \pm 0,34^b$	$5,37 \pm 0,45^b$	$19,95 \pm 0,73^b$
15	$13,81 \pm 0,33^c$	$12,67 \pm 0,17^c$	$14,10 \pm 0,74^c$
25	$16,48 \pm 0,78^d$	$13,39 \pm 1,33^c$	$20,03 \pm 1,53^b$
35	$18,29 \pm 0,92^e$	$15,59 \pm 0,68^d$	$18,90 \pm 0,05^b$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

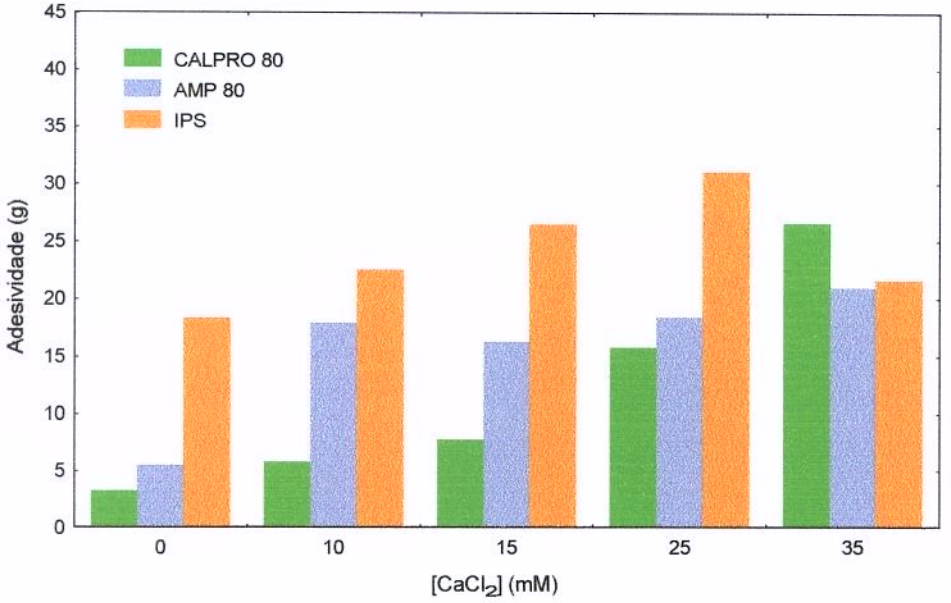


Figura 7. Efeito da adição de $CaCl_2$ na adesividade de géis de CPSs e IPS

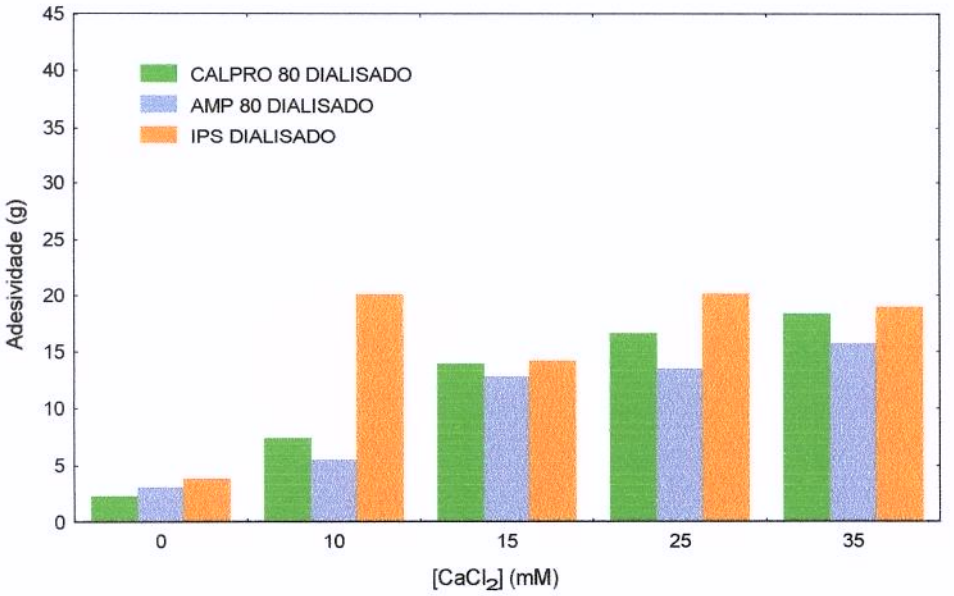


Figura 8. Efeito da adição de $CaCl_2$ na adesividade de géis de CPSs e IPS dialisados

Na Tabela 14 e Figura 9 verifica-se que os géis produzidos de soluções de IPS apresentaram menores valores de elasticidade do que os géis produzidos de Calpro 80 e AMP 80. Os géis produzidos de Calpro 80 apresentaram altos valores de elasticidade até

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

o nível de 25 mM de adição de $CaCl_2$, enquanto a amostra de AMP 80 apresentou maior valor de elasticidade antes da adição de $CaCl_2$. Os géis de Calpro 80 e AMP 80 apresentaram nestes mesmos níveis o maior valor de dureza.

Tabela 14. Valores de elasticidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS

$[CaCl_2]$	ELASTICIDADE		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$0,94 \pm 0,01^{a}$	$0,94 \pm 0,01^{a}$	$0,80 \pm 0,02^{a}$
10	$0,94 \pm 0,01^{a}$	$0,87 \pm 0,01^{b}$	$0,78 \pm 0,01^{a}$
15	$0,93 \pm 0,03^{ab}$	$0,87 \pm 0,01^{b}$	$0,78 \pm 0,02^{a}$
25	$0,92 \pm 0,01^{cb}$	$0,84 \pm 0,01^{b}$	$0,76 \pm 0,01^{a}$
35	$0,83 \pm 0,01^{d}$	$0,84 \pm 0,02^{b}$	$0,78 \pm 0,01^{a}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

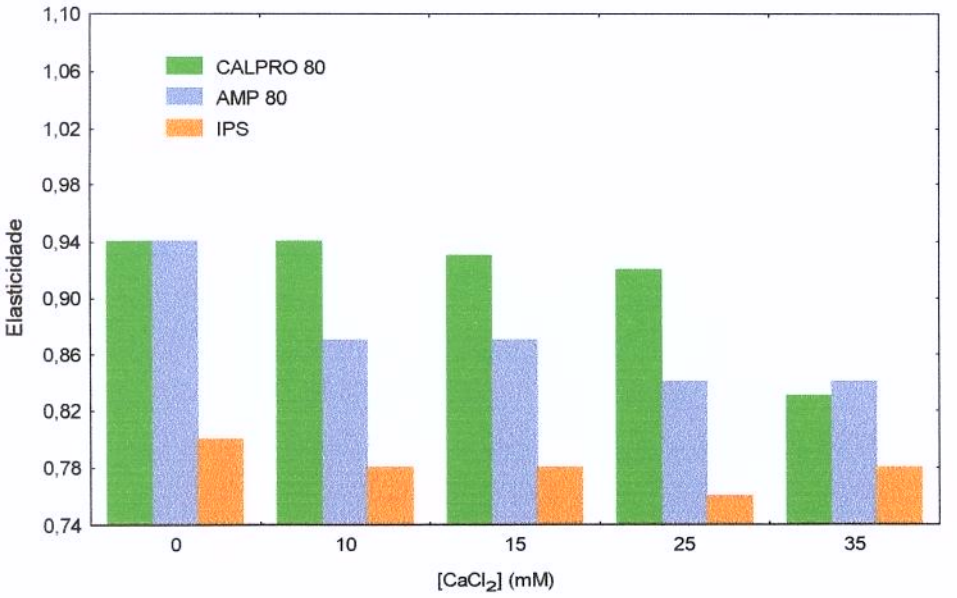


Figura 9. Efeito da adição de $CaCl_2$ na elasticidade de géis de CPSs e IPS

Após a diálise, os géis AMP 80 apresentaram maiores valores de elasticidade e maiores valores de dureza (Tabelas 14 e 10). Géis produzidos de soluções de IPS dialisadas apresentaram-se muito elásticos nos níveis de 0 mM e 10 mM de adição de $CaCl_2$. Assim, pode-se concluir que a adição de $CaCl_2$ produz géis menos elásticos.

Segundo SHIMADA e CHEFTEL (1988), a alta elasticidade de géis a valores de pH neutro e alcalino resulta de ligações S-S intermoleculares. Realmente, os maiores valores de elasticidade foram encontrados quando as soluções foram dialisadas, indicando que a principal ligação cruzada que estaria mantendo a estrutura dos géis seriam ligações S-S. É provável que a maior disponibilidade de sulfidrilas livres do IPS (Tabela 11) tenha produzido géis muito mais elásticos (Tabela 15 e Figura 10) e com maior dureza (Tabela 10) após a dialise.

Tabela 15. Valores de elasticidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados

$[CaCl_2]$	ELASTICIDADE		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$0,93 \pm 0,02^{a}$	$0,97 \pm 0,01^{a}$	$0,96 \pm 0,01^{a}$
10	$0,94 \pm 0,01^{a}$	$0,96 \pm 0,01^{ab}$	$0,90 \pm 0,01^{b}$
15	$0,93 \pm 0,01^{a}$	$0,93 \pm 0,01^{b}$	$0,86 \pm 0,01^{c}$
25	$0,91 \pm 0,02^{a}$	$0,89 \pm 0,01^{c}$	$0,76 \pm 0,01^{d}$
35	$0,82 \pm 0,02^{b}$	$0,85 \pm 0,02^{d}$	$0,78 \pm 0,01^{d}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

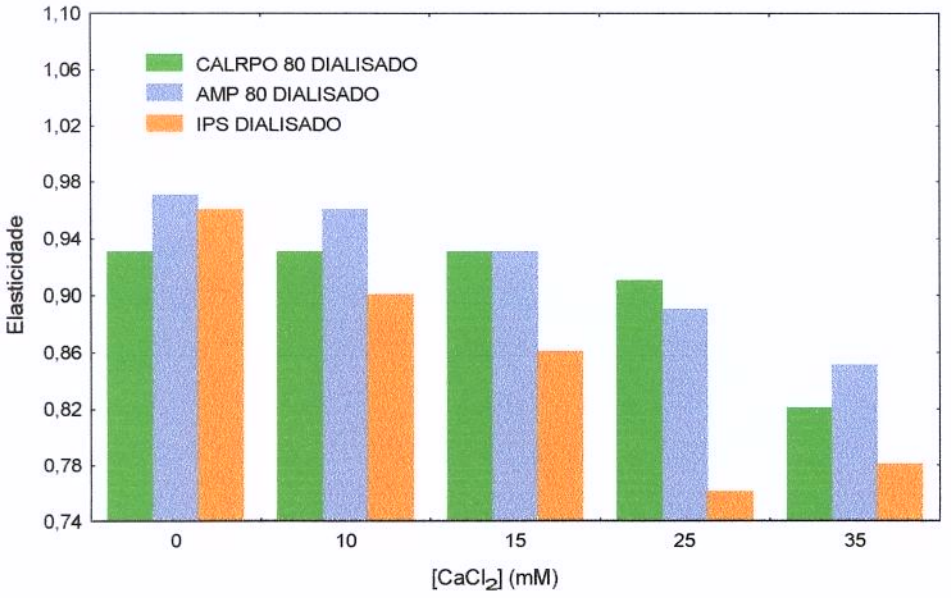


Figura 10. Efeito da adição de $CaCl_2$ na elasticidade de géis de CPSs e IPS dialisados

As reações de intertroca tiol-dissulfídica são importantes na gelatinização térmica devido a produção de ligações cruzadas covalentes envolvidas na formação da rede. Essas ligações covalentes necessitam de 126 a 420 kJ/mol de fornecimento de energia para que sejam formadas. A elasticidade, ou seja a maior resistência do gel a deformação, é diretamente proporcional a densidade de ligações cruzadas S-S na rede (PHILLIPS, 1994).

Os géis que apresentaram maiores valores de elasticidade (Tabela 15 e Figura 10), também apresentaram maiores valores de coesividade indicando que géis de proteínas de soro de leite mais elásticos possuem um estrutura de gel mais ordenada. As Tabelas 16 e 17 e as Figuras 11 e 12 mostram que a adição de $CaCl_2$ diminuiu a coesividade dos géis de CPS e IPS. No perfil de textura a coesividade é determinada através da razão de áreas determinada a partir de dois picos determinados para dureza. Assim quanto menos deformável for um gel (mais elástico), maior será esta razão e maior será a coesividade desses géis. Segundo SCHMIDT *et al.* (1978), géis produzidos de CPS dialisados apresentaram-se mais coesivos e de aparência transparente do que géis produzidos de CPS não dialisado. O aumento na concentração de $CaCl_2$ provocou diminuição nos valores de coesividade, sendo os valores mínimos de coesividade encontrados quando 10 a 20 mM de $CaCl_2$ foram adicionados. O decréscimo na coesividade e aumento da opacidade dos géis, com a adição de $CaCl_2$, foi atribuído a grande quantidade de ligações intermoleculares levando a formação de uma estrutura de gel mais aberta (menos compacta). HONGSPRABHAS e BARBUT (1997), verificaram que géis de IPS produzidos com alta concentração de proteína e baixa concentração de $CaCl_2$ foram mais elásticos que géis produzidos com alta concentração de $CaCl_2$ e baixa concentração de proteína.

Tanto em sistema dialisado como em sistema sem diálise, géis de CPSs apresentaram valores máximo de coesividade antes da adição de $CaCl_2$ sendo que o aumento na concentração de $CaCl_2$ mostrou uma tendência a diminuição da coesividade. O IPS apresentou baixa coesividade antes da diálise e após a diálise somente sem adição de $CaCl_2$ apresentou alto valor de coesividade (significativamente diferente dos demais níveis, $P<0,05$). MULVIHILL e KINSELA (1988) encontraram para géis de β-lg preparados com 20% de proteína em pH 8,0 valor mínimo de coesividade para 10 mM de adição de

$CaCl_2$ e neste mesmo nível a dureza foi máxima. Valores máximos de coesividade foram verificados com a adição de 25 mM de $CaCl_2$, a elasticidade máxima foi verificada com a adição de 5 mM de $CaCl_2$, a gomosidade máxima foi encontrada com a adição de 15 mM de $CaCl_2$ e a mastigabilidade máxima com a adição de 5 mM de $CaCl_2$.

Tabela 16. Valores de coesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS

$[CaCl_2]$	COESIVIDADE		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$0,82 \pm 0,03^{a}$	$0,80 \pm 0,04^{a}$	$0,70 \pm 0,03^{a}$
10	$0,79 \pm 0,02^{a}$	$0,62 \pm 0,04^{bc}$	$0,76 \pm 0,01^{b}$
15	$0,79 \pm 0,03^{a}$	$0,67 \pm 0,01^{b}$	$0,77 \pm 0,00^{b}$
25	$0,74 \pm 0,04^{a}$	$0,59 \pm 0,04^{c}$	$0,77 \pm 0,01^{b}$
35	$0,32 \pm 0,01^{b}$	$0,56 \pm 0,01^{c}$	$0,76 \pm 0,01^{b}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

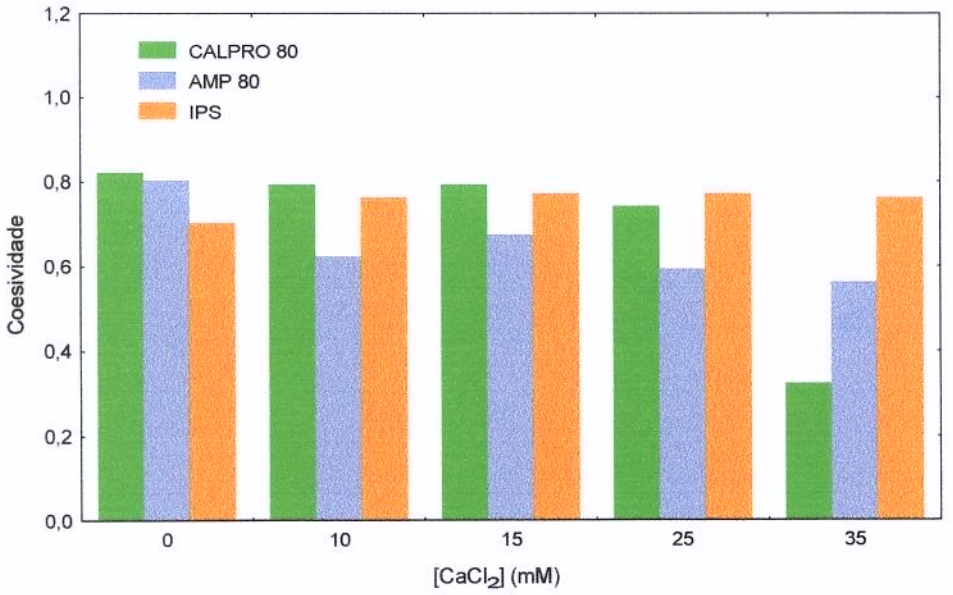


Figura 11. Efeito da adição de $CaCl_2$ na coesividade de géis de CPSs e IPS

Tabela 17. Valores de coesividade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados

$[CaCl_2]$	COESIVIDADE		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$0,83 \pm 0,01^{a}$	$0,88 \pm 0,02^{a}$	$0,87 \pm 0,02^{a}$
10	$0,78 \pm 0,01^{b}$	$0,83 \pm 0,02^{a}$	$0,73 \pm 0,01^{bc}$
15	$0,79 \pm 0,01^{b}$	$0,74 \pm 0,04^{b}$	$0,70 \pm 0,01^{c}$
25	$0,56 \pm 0,02^{c}$	$0,70 \pm 0,02^{b}$	$0,75 \pm 0,00^{b}$
35	$0,41 \pm 0,01^{d}$	$0,63 \pm 0,01^{c}$	$0,77 \pm 0,01^{b}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

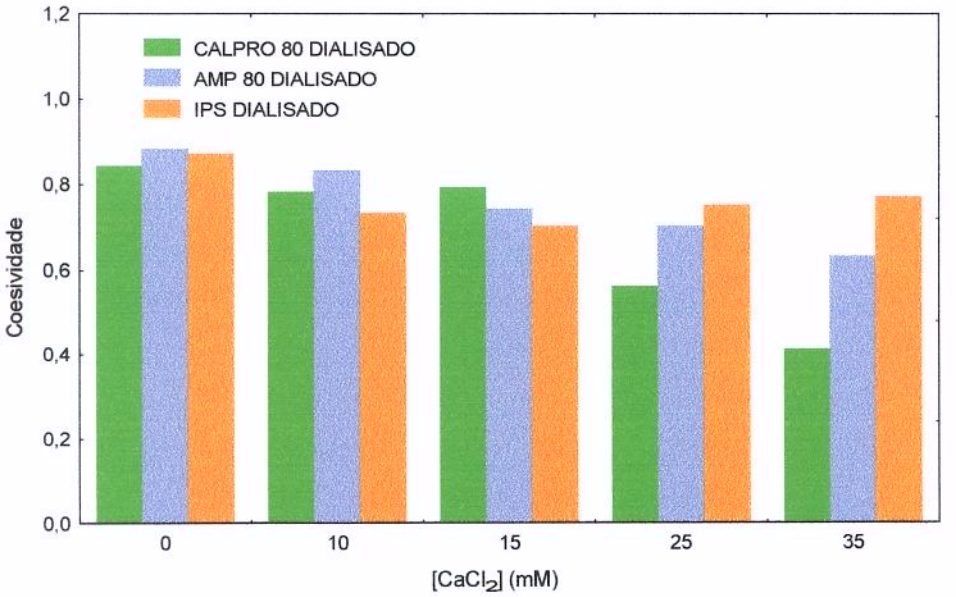


Figura 12. Efeito da adição de $CaCl_2$ na coesividade de géis de CPSs e IPS dialisados

Segundo ROSENTHAL (1992), a mastigabilidade é a energia necessária para mastigar um alimento até o ponto de ser engolido e a gomosidade é a energia necessária para desintegrar um alimento até o ponto de ser engolido. Os valores de mastigabilidade e gomosidade apresentados nas Tabelas 18, 19, 20 e 21 e nas Figuras 13, 14, 15 e 16

seguiram o mesmo perfil da dureza, pois a mastigabilidade e gomosidade são calculadas a partir da dureza:

mastigabibilidade = dureza x coesividade x elasticidade

gomosidade =dureza x coesividade

Tabela 18. Valores de gomosidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS

$[CaCl_2]$	GOMOSIDADE (g)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$217,01 \pm 15,00^{a}$	$341,10 \pm 13,96^{a}$	$110,40 \pm 2,37^{a}$
10	$354,82 \pm 33,33^{b}$	$180,41 \pm 7,78^{b}$	$137,44 \pm 11,79^{b}$
15	$434,95 \pm 36,18^{c}$	$135,22 \pm 11,64^{c}$	$151,95 \pm 10,40^{cb}$
25	$449,71 \pm 31,67^{c}$	$85,08 \pm 5,99^{d}$	$170,09 \pm 10,58^{cd}$
35	$29,92 \pm 0,48^{d}$	$85,59 \pm 3,21^{d}$	$108,20 \pm 0,94^{a}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

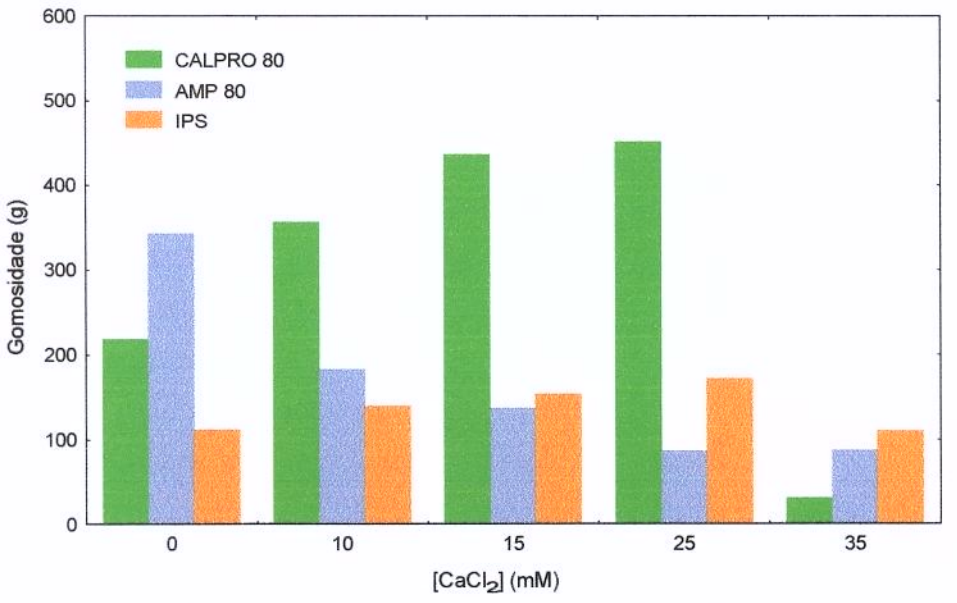


Figura 13. Efeito da adição de $CaCl_2$ na gomosidade de géis de CPSs e IPS

Tabela 19. Valores de gomosidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS dialisados

$[CaCl_2]$	GOMOSIDADE (g)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	175,91 ± 3,67[a]	186,11 ± 7,76[a]	316,16 ± 3,72[a]
10	401,04 ± 10,61[b]	416,66 ± 5,20[b]	771,87 ± 50,93[b]
15	461,23 ± 7,49[c]	465,05 ± 11,84[c]	138,76 ± 8,55[c]
25	121,57 ± 8,83[d]	177,20 ± 5,43[a]	108,79 ± 5,52[c]
35	28,57 ± 1,76[e]	125,59 ± 4,86[d]	91,45 ± 6,53[c]

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo Teste de Tukey.

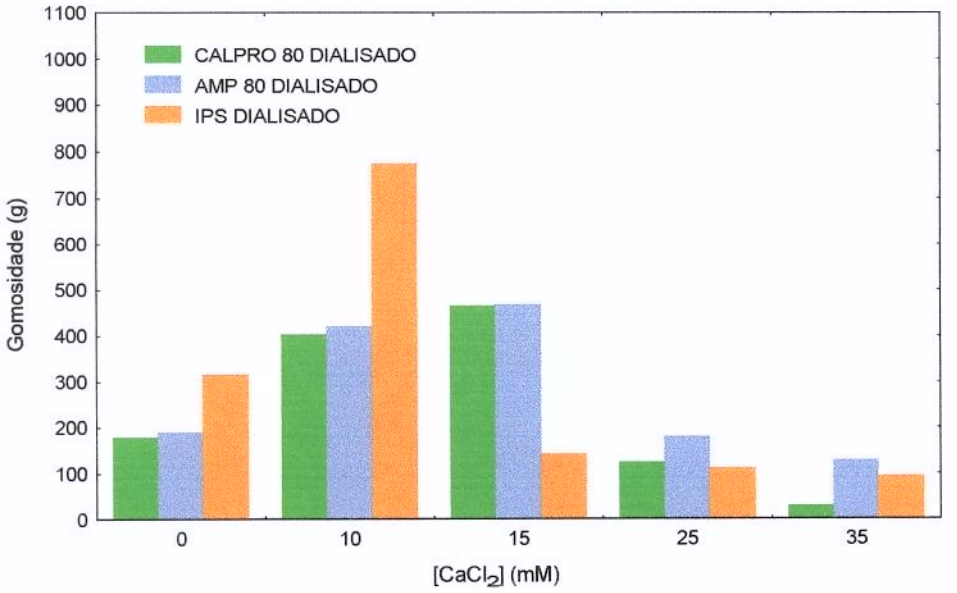


Figura 14. Efeito da adição de $CaCl_2$ na gomosidade de géis de CPSs e IPS dialisados

Tabela 20. Valores de mastigabilidade dos géis com 10% de proteína de CPSs e IPS

$[CaCl_2]$	MASTIGABILIDADE (g)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$204,54 \pm 16,10^{a}$	$321,72 \pm 13,42^{a}$	$88,87 \pm 3,90^{ab}$
10	$335,89 \pm 30,40^{b}$	$156,30 \pm 7,05^{b}$	$107,22 \pm 10,72^{ac}$
15	$406,49 \pm 33,21^{c}$	$116,94 \pm 10,52^{c}$	$118,45 \pm 10,46^{cd}$
25	$410,98 \pm 28,78^{c}$	$71,87 \pm 5,43^{d}$	$129,70 \pm 10,01^{d}$
35	$25,05 \pm 0,03^{d}$	$70,82 \pm 1,29^{d}$	$85,08 \pm 1,50^{a}$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo Teste de Tukey.

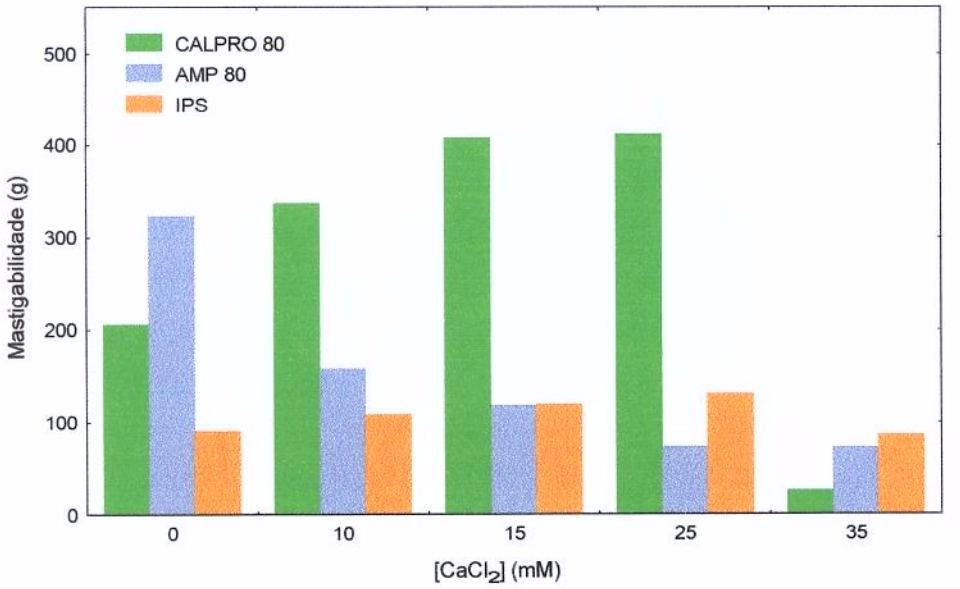


Figura 15. Efeito da adição de $CaCl_2$ na mastigabilidade de géis de CPSs e IPS

Tabela 21. Valores de mastigabilidade de géis de soluções CPSs e IPS dialisadas com 10% de proteína

$[CaCl_2]$	MASTIGABILIDADE (g)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$164,00 \pm 2,43^a$	$181,53 \pm 7,90^a$	$304,70 \pm 6,93^a$
10	$374,87 \pm 11,63^b$	$398,90 \pm 6,07^b$	$692,99 \pm 59,49^b$
15	$430,82 \pm 9,78^c$	$434,19 \pm 10,29^c$	$119,60 \pm 8,12^c$
25	$110,02 \pm 6,23^d$	$157,80 \pm 6,24^d$	$82,16 \pm 4,23^c$
35	$23,42 \pm 1,24^e$	$107,28 \pm 1,83^e$	$71,91 \pm 5,37^c$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

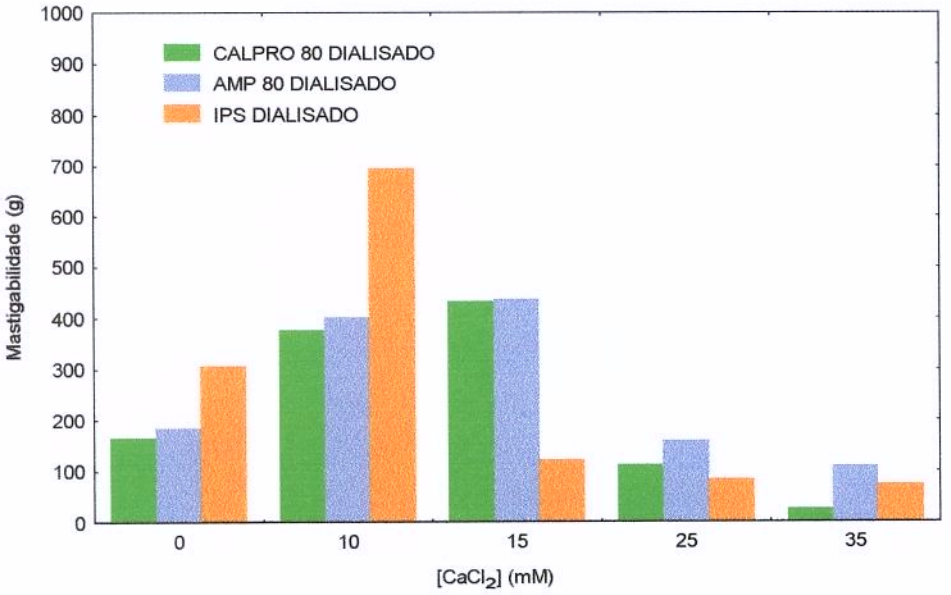


Figura 16. Efeito da adição de $CaCl_2$ na mastigabilidade de géis de CPSs e IPS dialisados

4.3 Umidade espremível de géis de CPSs e IPS

Uma vez determinado o perfil de textura dos géis, foi então avaliada a capacidade de retenção de água dos géis como mostram as Tabelas 22 e 23 e Figuras 17 e 18. Os dados apresentados nestas tabelas se referem a umidade espremível dos géis e quanto maior a umidade espremível, menor a capacidade de retenção de água.

Tabela 22. Valores de umidade espremível de géis de CPSs e IPS

$[CaCl_2]$	UMIDADE ESPREMÍVEL (%)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$28,83 \pm 1,35^a$	$33,29 \pm 0,48^a$	$70,43 \pm 1,53^a$
10	$29,14 \pm 1,37^a$	$60,06 \pm 1,12^b$	$70,75 \pm 0,26^a$
15	$33,20 \pm 1,31^b$	$69,40 \pm 0,30^c$	$70,82 \pm 0,86^a$
25	$45,08 \pm 0,62^c$	$69,70 \pm 1,50^c$	$70,12 \pm 2,08^a$
35	$64,49 \pm 1,69^d$	$69,30 \pm 0,32^c$	$70,87 \pm 3,94^a$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Tukey.

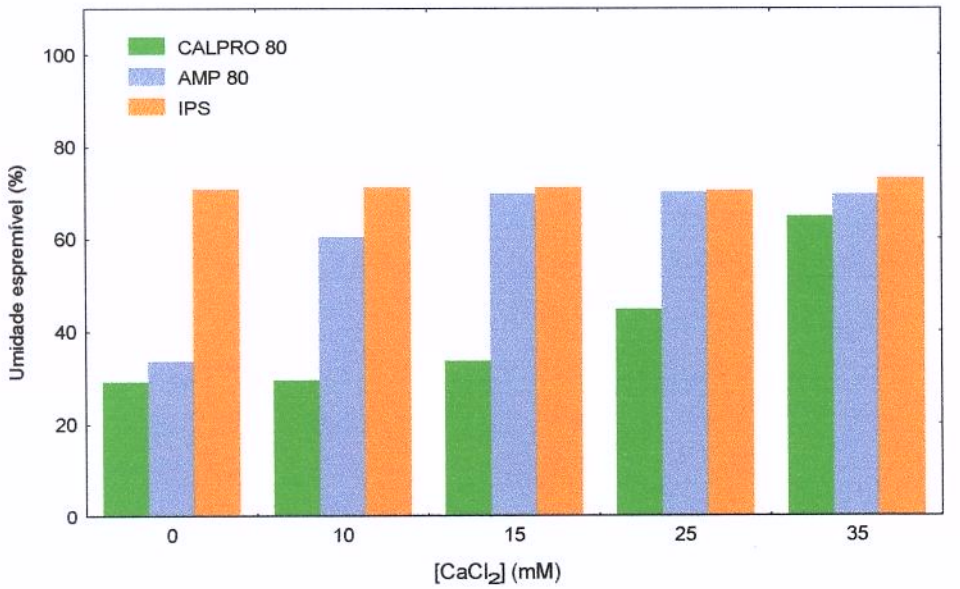


Figura 17. Efeito da adição de $CaCl_2$ na umidade espremível de géis de CPSs e IPS

Tabela 23. Valores de umidade espremível de géis de CPSs e IPS dialisados

[$CaCl_2$]	UMIDADE ESPREMÍVEL (%)		
mM	CALPRO 80	AMP 80	IPS
0	$22,99 \pm 0,97^a$	$28,75 \pm 1,71^a$	$27,50 \pm 1,00^a$
10	$32,95 \pm 1,67^b$	$30,82 \pm 1,31^a$	$48,16 \pm 0,78^b$
15	$44,16 \pm 0,67^c$	$40,72 \pm 1,24^b$	$69,55 \pm 1,15^c$
25	$62,60 \pm 2,32^d$	$64,14 \pm 2,75^c$	$69,54 \pm 0,58^c$
35	$67,45 \pm 2,17^e$	$64,34 \pm 1,60^c$	$69,09 \pm 0,98^c$

Médias em colunas seguidas de desvio padrão com sobrescritos diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo Teste de Tukey.

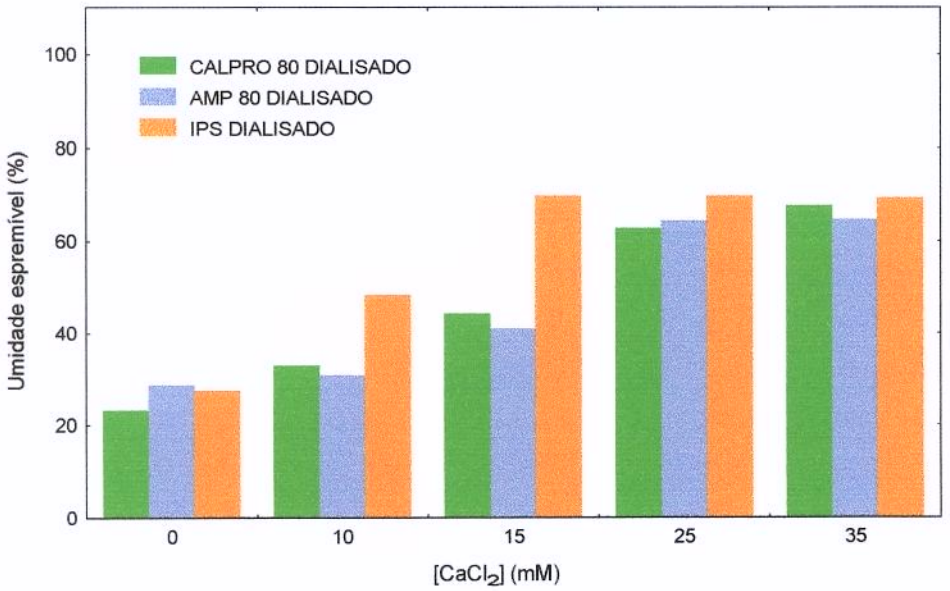


Figura 18. Efeito da adição de $CaCl_2$ na umidade espremível de géis de CPSs e IPS dialisados

Verificou-se que a adição de $CaCl_2$ diminui a capacidade de retenção de água dos géis. Géis preparados de Calpro 80 e AMP 80 apresentaram alta retenção de água antes da adição de $CaCl_2$. Para o CPS Calpro 80 o maior valor de dureza obtido com a adição de 25 mM de $CaCl_2$ apresentou retenção de água de cerca de 55%. O CPS AMP 80 apresentou maior retenção de água no maior valor de dureza (0mM) de adição de $CaCl_2$. O IPS apresentou capacidade de retenção de água muito baixo (cerca de 30%) para todos os níveis de $CaCl_2$ adicionados. Quando os géis foram produzidos com soluções dialisadas, apresentaram maiores valores de capacidade de retenção de água. Nos níveis

de adição de $CaCl_2$ onde os géis apresentaram maiores valores de dureza, a capacidade de retenção de água variou de 50 a 60%. Estruturas de gel mais coesas e elásticas apresentaram maior retenção de água. Os resultados sugerem que uma concentração específica de Ca^{2+} foi necessária para otimizar a dureza e umidade espremível dos géis. Segundo JOST (1993), em concentrações de Ca^{2+} abaixo do ótimo as ligações cruzadas eletrostáticas são fracas resultando em géis fracos, enquanto que em altas concentrações, provoca forte atração entre as moléculas protéicas e a matriz do gel sofre colapso. Os dados apresentados para umidade espremível estão de acordo com os valores relatados por SMITH e ROSE (1994).

Segundo HUDSON *et al.* (2000), géis formados de soluções protéicas de soro de leite podem ser classificados de acordo com sua estrutura como particulados, de estrutura fina e de estrutura mista (estrutura fina e particulada). Em géis de estrutura fina (transparente), o processo de agregação é linear (ordenado), enquanto que géis de estrutura particulada são opacos e o processo de agregação ocorre ao acaso. Abaixo ou acima do pI, os géis possuem uma estrutura fina e são transparentes. Porém, géis formados em pH acima do pI são mais fortes e elásticos que aqueles formados abaixo do pI e apresentam maior capacidade de retenção de água do que géis com microestrutura particulada. O aumento na concentração de sal resulta em gel de estrutura particulada (opaco) ou mista (fina e particulada), aumentando os poros na matriz de gel e consequentemente diminuindo a capacidade de retenção de água (BOWLAND e FOEGEDING 1995). Neste estudo, o aumento na concentração de cálcio, aumentou a opacidade dos géis e provocou diminuição na capacidade de retenção de água. Esses resultados estão de acordo com MORR e FOEGEDING (1990) e HUDSON *et el.* (2000). Os resultados sugerem que uma concentração específica de Ca^{2+} foi necessária para otimizar a dureza e umidade espremível dos géis. A comparação de dados com valores reportados pela literatura é difícil devido a grande variabilidade na composição mineral apresentada pelos CPSs e IPS. BARBUT (1995) verificou que géis produzidos de IPS com 10% de proteína e 5 mM de adição de $CaCl_2$ apresentaram-se transparentes e a opacidade aumentou com a adição de $CaCl_2$ sugerindo que grandes agregados formavam a rede de gel. O aumento na concentração $CaCl_2$ de 30 a 40 mM resultou em géis com menor valor de dureza. MANGINO (1992) verificou que géis produzidos de CPS apresentaram maior valor de dureza quando 11 mM de $CaCl_2$ foram adicionados. SCHMIDT *et el.* (1978) verificaram que a dureza máxima de géis de CPS preparado com

10% de proteína e pH 7,0 foi encontrada quando 5 mM de $CaCl_2$ foram adicionados. Para soluções dialisadas verificaram que a dureza máxima foi obtida quando adições de 5 a 20 mM de $CaCl_2$ foram feitas e acima desse valor houve decréscimo nos valores de dureza.

4.4 Perfil eletroforético

O perfil eletroforético das amostras de CPS e IPS foi determinado em sistema descontínuo SDS-PAGE utilizando-se gel de resolução com 12% de acrilamida como mostra a Figura 20 . Entre os dois CPSs as frações de BSA, β-Lg e α-La apresentaram maior intensidade na amostra de Calpro 80. As frações de imunoglobulinas (peso molecular superior a 94.000 Da) estão presentes somente na amostra de Calpro 80. Já as frações de β-Lg e α-La presentes no IPS apresentam maior intensidade que as mesmas frações presentes nos CPSs, o que pode ser explicado pela maior concentração de proteína presente no IPS. As frações de Imunoglobulinas não estão presentes no IPS o que, segundo BARKER e MORR (1986), ocorre devido ao processo de troca iônica onde proteínas básicas como imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase não são retidas na coluna aniônica. Sabe-se que este foi o processo empregado para a obtenção desta amostra devido a grande quantidade de cálcio iônico presente na amostra.

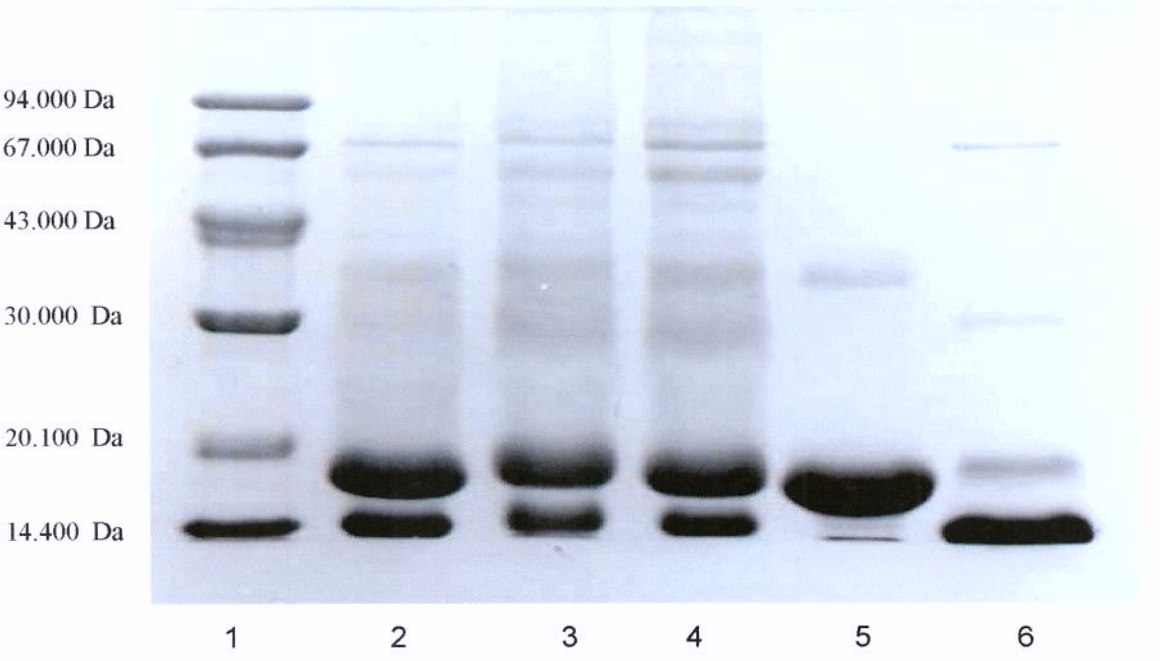
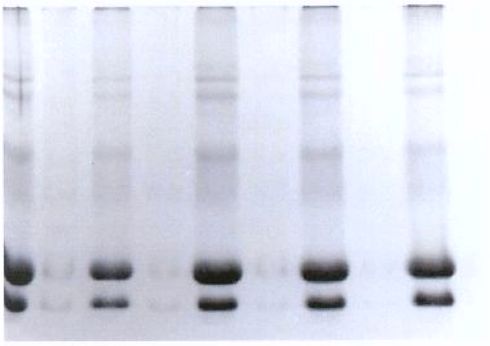
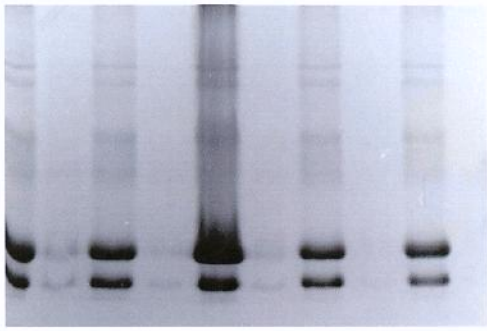


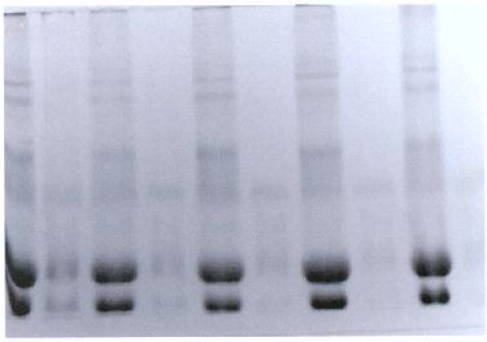
Figura 19. Perfil eletroforético de CPSs e IPS de soro de leite. (1) padrão de baixo peso molecular, (2) IPS, (3) AMP 80, (4) Calpro 80, (5) padrão de β-Lg e (6) padrão de α-La.



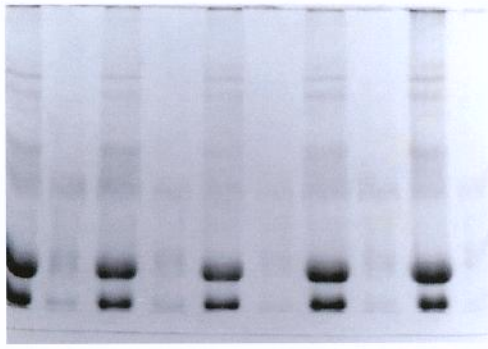
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
(A)



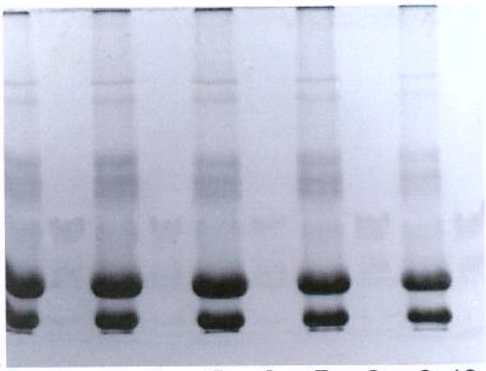
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
(B)



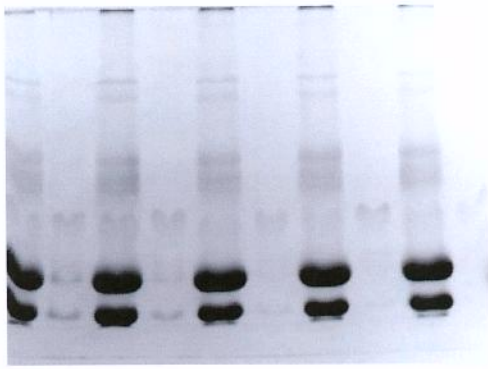
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
(C)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
(D)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
(E)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
(F)

Figura 20. Perfil eletroforético dos géis de soluções de concentrado protéico de soro de leite: A) Calpro 80 sem diálise; B) Calpro 80 com diálise; C) AMP 80 sem diálise; D) AMP 80 com diálise: E) IPS sem diálise; F) IPS com diálise; (1), (3), (5), (7), e (9) reduzidas com ME; (2), (4), (6), (8) e (10) não reduzidas com 0, 10, 15, 25 e 35 mM de adição de $CaCl_2$.

O perfil eletroforético dos géis preparados com diferentes concentrações de $CaCl_2$ também foi determinado em sistema SDS-PAGE com e sem a adição de β-mercaptoetanol (ME) que é um agente redutor de ligação dissulfídica. Em sistema SDS-PAGE quando a amostra é preparada em tampão sem ME e o perfil eletroforético mostra a presença de agregados, isto significa que estes agregados estão sendo mantidos por ligações dissulfídicas. Na Figura 20 (A, B, C, D, E e F) verifica-se a presença de agregados quando as amostras não foram reduzidas com ME (linhas 2, 4, 6, 8 e 10). Comparando-se as Figuras 19 e 20, verifica-se que esses agregados se formaram numa faixa onde o peso molecular varia de 20.100 a 30.000 Da indicando que as proteínas envolvidas no processo de gelatinização são principalmente α-La (14.400 Da) e β-Lg (18.600 Da) não sendo verificada a participação da BSA (67.000 Da). Neste estudo, os géis foram produzidos em pH 7,0 e segundo LIU *et al.* (2000) os grupos sulfidrilas da BSA são mais reativos em pH 6,0. PARRIS *et al.* (1997) verificou, através do perfil eletroforético, a participação da BSA no processo de gelatinização de CPS com adição de até 9 mM de $CaCl_2$ em pH 6,6.

Segundo HOFFMANN e VAN MIL (1997), quando soluções de β-lg são aquecidas acima de 65°C, a polimerização ou agregação ocorre principalmente através de ligações cruzadas dissulfídicas. Reações de intertroca tiol-dissulfídica e interações hidrofóbicas ocorrem principalmente entre a β-lactoglobulina e outras proteínas do leite contendo ligação dissulfídica como κ-caseína e α-lactalbumina (HAQUE *et al.*, 1988). A α-lactalbumina não forma agregados quando aquecida sozinha, mas segundo GEZIMATI *et al.* (1996) quando aquecida na presença de BSA ou β-lg é capaz de formar géis através de interações dissulfídicas e hidrofóbicas. Segundo CREIGHTON (1996), a formação ou quebra de ligação dissulfídica da α-La depende da concentração de Ca^{2+}. Para os CPSs Calpro 80 e AMP dialisados e não dialisados verificou-se a presença de agregados e das frações de α- La e β-Lg (Figura 20 A, B, C e D linhas 2, 4, 6, 8 e 10) até o nível de adição de 15 mM de $CaCl_2$ enquanto que nas concentrações de 25 e 35 mM de $CaCl_2$ estas frações e os agregados desapareceram. De alguma forma a adição de $CaCl_2$ nestes níveis inibiu as ligações dissulfídicas. No IPS não dialisado (Figura 21 E, nas linhas 2, 4, 6, 8 e 10) não se verificou a presença de traços de α-La e β-Lg para nenhum nível de adição de $CaCl_2$ e esta amostra já apresentava alta concentração de Ca^{2+} como citado no estudo anterior. Quando esta amostra foi dialisada as frações de α-La e β-L apareceram até o nível de 15 mM de adição de $CaCl_2$. Enquanto verifica-se a presença das frações de

α-La, β-Lg e a presença de agregados, isto é, até 15 mM de adição de $CaCl_2$, pode-se dizer que a estrutura dos géis deve estar associada a formação de ligações dissulfídicas e interações eletrostáticas mediadas por Ca^{2+}. Já nos níveis de 25 e 35 mM é provável que interações eletrostáticas prevaleçam. Nessas concentrações, os géis apresentaram uma coloração branca, semelhantes a coágulos e baixa retenção de água que são características de géis cuja rede está sendo mantida por interações eletrostáticas.

Segundo VARDHANABHUTI e FOEGEDING (1999), a polimerização de proteínas do soro do leite ocorre em duas fases. Na etapa inicial, com o aquecimento de soluções de IPS ocorre o desdobramento de monômeros de proteínas do soro expondo grupos sulfidrilas e hidrofóbicos. Esses monômeros ativados formam um polímero primário principalmente via reações de intertroca sulfidrila/dissulfida e interações hidrofóbicas. Na segunda etapa, estes polímeros agregam via interações não covalentes, formando o polímero final. A concentração de proteína tem uma função importante no tamanho do polímero primário formado , enquanto o tempo de aquecimento determina a extensão da agregação na segunda fase.

Para a amostra de CPS Calpro 80 (Figura 20 B, linhas 7 e 9), verificou-se que houve uma diminuição das frações de α-La e β-Lg indicando desnaturação que pode ter sido causada pela adição de $CaCl_2$. Também durante o processo de diálise, fosfato e lactose foram retirados, os quais poderiam estar estabilizando as moléculas protéicas evitando a desnaturação. Para o CPS AMP 80, praticamente não se verificou alteração nas bandas de α-La e β-Lg antes e após o processo de diálise (Figura 20 C e D). Talvez a presença de fosfato de sódio estivesse estabilizando as moléculas protéicas nesta amostra. O IPS apresentou desnaturação com a adição de 35 mM de $CaCl_2$ (Figura 20 E, linha 9).

5. CONCLUSÕES

Os concentrados protéicos e o isolado protéico avaliados apresentaram alta solubilidade em pH 7,0 e 4,6na presença de NaCl 0,1 M, apresentando valores superiores a 84%. A solubilidade protéica dos CPSs e IPS determinada em água deionizada foi inferior a solubilidade determinada em NaCl. O perfil de solubilidade de soluções dialisadas de Calpro 80 e AMP 80 com 10% de proteína em pH 7,0 indicou uma tendência a diminuição de solubilidade quando 35 mM de $CaCl_2$ foi adicionado. Já o IPS avaliado mostrou uma tendência a diminuição da solubilidade quando 35 e 25 mM de $CaCl_2$ foram adicionados, antes e após o processo de diálise, respectivamente.

Os valores de transmitância indicaram que as soluções de IPS são menos opacas que soluções de CPS. O CPS AMP 80 apresentou o mesmo perfil de transmitância antes e após a diálise. Soluções de IPS e Calpro 80, tanto antes como após a diálise apresentaram uma diminuição nos valores de transmitância a partir da adição de 15 mM de $CaCl_2$.

A aparência de géis de proteínas do soro pode ser alterada pela adição de $CaCl_2$. Nos níveis de adição de 25 e 35 mM de $CaCl_2$, os géis de CPSs apresentaram-se semelhantes a coágulos. Os géis de IPS antes da diálise apresentaram-se semelhantes a coágulos em as concentrações de $CaCl_2$ avaliadas.

O perfil de dureza dos géis dos concentrados e do isolado avaliados, apresentou a mesma tendência, quando foram adicionadas diferentes concentrações de $CaCl_2$, aumentando até um valor máximo e então decrescendo. Os concentrados protéicos apresentaram composição química (80% de proteína) muito semelhantes mas, o perfil de textura dos géis produzidos foi bastante diferenciado. O valor máximo de dureza foi atingido para concentrações específicas de adição de $CaCl_2$. A dureza máxima do CPS Calpro 80 se verificou quando 25 mM de $CaCl_2$ foi adicionado antes do processo de diálise. Após o processo de diálise, a dureza máxima foi encontrada quando 15 mM de $CaCl_2$ foram adicionados. Para o CPS AMP 80, o valor máximo de dureza foi encontrado antes da adição de $CaCl_2$ para soluções não dialisadas e após a diálise quando 15 mM de $CaCl_2$ foi adicionado. O IPS apresentou valor máximo de dureza quando 25 e 10 mM de $CaCl_2$ foram adicionados, antes e após a diálise, respectivamente. O aumento na

concentração de $CaCl_2$ produziu géis mais adesivos e menos elásticos. Géis mais elásticos e coesos, de Calpro 80, AMP 80 e IPS, foram obtidos antes da adição de $CaCl_2$. Soluções de IPS dialisadas produziram géis muito mais elásticos e de coloração amarelada (semelhante a gelatina). Géis de Calpro 80, AMP 80 e IPS apresentaram maiores valores de capacidade de retenção de água, de elasticidade e de coesividade em sistema dialisado, sem a adição de $CaCl_2$. Os valores máximos de dureza e de capacidade de retenção de água não foram obtidos para a mesma concentração de $CaCl_2$ adicionada, o que significa que os géis mais duros não apresentaram os maiores valores de capacidade de retenção de água.

A concentração total de cálcio não garante o mesmo perfil de textura, pois os dois CPSs avaliados apresentavam 0,42% de cálcio total e o perfil de textura (principalmente dureza) mostrou-se diferente. A forma como os íons cálcio estão presentes nas amostras (iônico e complexado) são determinantes no perfil de textura e retenção de água de géis de CPS e IPS. Altas concentrações de cálcio iônico prejudicam a propriedade gelatinizante de proteínas do soro do leite, como pode ser verificado para a amostra de IPS que apresentou maior concentração de Ca^{2+} antes do processo de diálise. A presença de outros íons, principalmente ânions tem influência no perfil de textura de géis de proteínas do soro. A manipulação de íons pode tornar concentrados e isolados protéicos de soro de leite mais comercializáveis com características funcionais específicas.

O perfil eletroforético indicou que a estrutura dos géis dos CPSs e IPS estava sendo mantida por interações eletrostáticas e ligações dissulfídicas até o nível de adição de 15 mM de $CaCl_2$. Em géis de CPS e IPS para os níveis de adição de 25 e 35 mM de $CaCl_2$, prevaleceram interações eletrostáticas mediadas por Ca^{2+}. Verificou-se, através do perfil eletroforético, que o CPS Calpro 80 apresentou desnaturação das frações de β-Lg e α-La com a adição de 25 e 35 mM de $CaCl_2$ e o IPS avaliado apresentou desnaturação com a adição de 35 mM de $CaCl_2$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, J. M. Gelation of whey proteins: whey proteins undergo gelation through a series of steps involving denaturation, aggregation, strand formation and network formation. **Food Technology**, Chicago,v. 49, n. 10, p. 83-89, 1995.

A.O.A.C. **Official Methods of Analysis.** 13ª ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., 1980.

AUGUSTIN, M. A. and CLARKE P. T. Calcium ion activities of cooled and aged reconstituted and recombined milks. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 58, n. 2, p. 219-229, 1991.

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

BARKER, C. M. and MORR, C. V. Composition and properties of Spherosil-QMA whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 4, p. 919-923, 1986.

BERNAL, V. M.; SMAJDA, D. H.; SMITH, J. L. and STANLEY, D. W. Interactions in protein/polysaccharide/calcium gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n.5, p. 1121-1122, 1987.

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

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J. and 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.

BRAMAUD, C.; AIMAR, P. and DAUFIN, G. Thermal isoelectric precipitation of α-lactalbumin from a whey protein concentrate: influence of protein-calcium complexation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 47, n.2, p. 121-130, 1995.

BRANDENBERG, A. H.; MORR, C. V. and WILLER, C. L. Gelation of commercial whey protein concentrates: effects of removal of low-molecular-weight components. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 2, p. 427-432, 1992.

BOWLAND, E. and FOEGEDING, E. Effects of anions on thermally induced whey protein isolate gels. **Food Hydrocolloids,** Oxford, v. 9, n. 1, p. 47-56, 1995.

CLARK, A. H. and ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances in Polymer Science,** New York, v. 83, p. 57-192, 1987.

CLARK, A. H.; JUDGE, F. J.; RICHARDS, J. B.; STUBBS, J. M. and SUGGEST, A. Electron microscopy of network structure in thermally-induced globular protein gels. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 380-392, 1981.

CREIGHTON, T. Disulphide-coupled folding pathways. In: DOBSON, C. M. and FERSHT, A. R. **Protein Folding**, Cambridge: Cambridge University Press, 1996, p. 5-11.

DAMODARAN, S. and KINSELLA, J. E. In: CHERRY, J. P. (Ed.) **Food Protein Deterioration: Mechanisms and Functionality**, Washington: American Chemistry Society, 1982, p. 327-366.

DEMOTT, B. J. Calcium ion concentration in milk, whey, and β-lactoglobulin as influenced by ionic strength, added calcium, rennet concentration and heat. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 52, n. 10, p. 1672-1675, 1969.

de RHAM, O and CHANTON, S. Role of ionic enviroment in insolubilization of whey protein during heat treatment of whey products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 5, p. 939-949, 1984.

de WIT, J. N. Thermal stability and functionality of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3602-3612, 1990.

de WIT, J. N. and KLARENBEEK, G. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 2701-2710, 1984.

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

DOI, E.; KOSEKI, T. and KITABAKE, N. Effects of limited proteolysis on functional properties of ovalbumin. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 64, n. 12, p. 1697-1703, 1987.

EIGEL, W. N.; BUTLER, J. E.; ERNSTROM, C. A., FARRELL, H. M. Jr.; HARWALKAR, V. R.; JENNESS, R. and WHITNEY, R. McL. Nomenclature of protein of cow's milk: fifth version. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 8 , p. 1599-1631, 1984.

EVANS, E. W. Uses of milk proteins in formulated foods. In **Developments in Food Proteins 1.** London: Applied Science Publishers, 1989, p. 141-169.

FERRY, J. D. Protein gels. **Advanced in Protein Chemistry**, v. 4, p. 1-78, 1948.

FOX, P. F. The milk protein system. In: FOX, P. F. (Ed.). **Developments in Dairy Chemistry-4**, London: Elsevier Applied Science, 1989, p.1-55.

GEZIMATI, J.; SINGH, H. and CREAMER, L. K. Heat-induced interactions and gelation of mixtures of bovine β-lactoglobutin and serum albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 6, p. 804-810, 1996.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 50-51, 1994.

GOSSET, P. W; RIZVI, S. H. and BAKER, R. C. Quantitative analysis of gelation in egg protein systems. **Food Technology**, Chicago, v. 38, n. 5, p. 67-68, 1984.

GOUGH, P. and JENNESS, R. Heat denaturation of Bela-Lactoglobulins A e B. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, n. 9 , p. 1033-1034, 1962.

GRINBERG, V. Y.; BIKBOV, T. M.; BRONICK, T. K. and MASHKEVICH, A. Y. Thermotropic gelation of food proteins. **Food Hydrocolloids,** Oxford, v. 6, n. 1, p. 69-96, 1992.

HAGGETT, T. P. R. The whipping, foaming, and gelling properties of whey protein concentrates. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology,** Palmerston North, v. 11, n. 2, p. 244-248, 1976.

HAQUE, Z. and KINSELLA, J. E. Interaction between heated Kappa-casein and Beta-lactoglobulin-predominance of hydrophobic interactions in the inicial-stages of complex formation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 1, p. 67-80, 1988.

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

HAYAKAWA, S. and NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 486-491, 1985.

HERMANSSON, A. –M. Agregation and denaturation involved in gel formation. In: POUR-EL, A. (Ed.). **Functionality and Protein Structure,** Washington: American Chemical Society, 1979, p. 82-103.

HERMANSSON, A.-M. Gel structure of food biopolymers. In: BLANSHARD, J. M. V. and MITCHELL, J. R. **Food Structure – Its Creation and Evaluation**, London: Butterworths, 1988, p. 25-40.

HERMANSSON, A. –M. Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. Effects on texture of meat product. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 611-614, 1975.

HERMANSSON, A. –M; LANGTON, M. and HARBITS, O. Formation of two types of gels from myosin. **Journal of the Science of Food and Agricultural,** W. Sussex, v. 37, n. 1 , p. 69-84, 1986.

HILLIER, R. M.; LYSTER, R. L. J. and CHEESEMAN, G. M Gelation of reconstituted whey powders by heat. **Journal of the Science of Food and Agricultural,** S. Sussex, v. 31, n. 7, p. 1152, 1980.

HILLIER, R. M.; LYSTER, R. L. J. and CHEESEMAN, G. M. Thermal denaturation of α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin in cheese whey: effect of total solids concentration and pH. **Journal of Dairy Research**, New York, v.46, n. 1, p. 103-111, 1979.

HIROSE, M. Molten globule state of food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 48-51, 1993.

HOFFMANN, M. A. M. and VAN MIL, P. J. J. M. Heat-induced aggregation of β-lactoglobulin: role of the free thiol group and disulphide bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 7, p.2942-2948, 1997.

HONGSPRABHAS, P and BARBUT, S. Protein and salt effects on Ca^{2+}-induced cold gelation of whey protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 74-77, 1997.

HUDSON, H. M.; DAUBERT, C. R. and FOEGEDING, E. A. Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 31112-3119, 2000.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology,** v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.

IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N. Y. and SPANIER, A M. Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 7, p. 663-689, 1997.

JAUREGUI, C. A.; REGENSTEIN, J. M. and BARKER, R.C. A simulated method for measuring expressible moisture, a water-binding property of muscle foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 1271-1273, 1981.

JOHNS, J. E. and ENNIS, B. M. The effect of the replacement of calcium with sodium ions in acid whey on the properties of whey protein concentrates. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology,** v. 16, n. 1, p. 79-86, 1981.

JOST, R. Functional-characteristics of dairy proteins. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 4, n. 9, p. 283-288, 1993.

JU, Z. Y. and KILARA, A. aggregation induced by calcium chloride and subsequent thermal gelation of whey protein isolate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 4, p. 925-931, 1998

KINSELLA, J. E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 21, n. 2, p.197-262, 1984.

KINSELLA, J. E. and WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. In: **Advances in Food Nutrition Research**, London: Academic Press, 1989, v. 33, p. 343-439.

KHUN, P. R.; FOEGEDING, E. A. Factors influencing whey protein gel rheology: dialysis and calcium chelation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 3, p. 789-791, 1991a.

KHUN, P. R. and FOEGEDING, E. A. Mineral salt effects on whey protein gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1013-1016, 1991b.

KOHNNHORST, A. L. and MANGINO, M. E. Prediction of the strength of whey protein gels based on compositional properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1403-1405, 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 15, p. 689-695, 1970.

LANGLEY, K. R. and GREEN, M. J. Compression and impact strength of gels prepared whit fractionated protein in relation to composition and microstructure. **Journal of Dairy Research,** New York, v. 56, n. 2, p. 275-284, 1989.

LEMAN, J. and KINSELLA, J. E. Surface activity, film formation and emulsifying properties of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 2, p.115-138, 1989.

LI-CHAN, E. Properties and molecular interactions of whey protein concentrate upon storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 9, p. 1843-1853, 1983.

LUPANO, C E.; RENZI, L. A and ROMERA, V. Gelation of whey protein concentrate in acidic conditions: effect of pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3010-3014, 1996.

LIU, G.; XIONG, Y. L. and 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.

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

MANGINO, M. E. Physico-chemical basis of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science,** Champaign, v. 67, n. 11, p. 2711-2722, 1984.

MANGINO, M. E.; KIM, J. H.; DUNKERLEY, J. A. and ZADOW, J. G. Factors important in the gelation of whey protein concentrates. **Food Hydrocolloids,** Oxford, v. 1, n. 2, p. 227, 1987a.

MANGINO, M. E.; LIAO, S.W.; HARPER, W. J.; MORR, C.V. and ZADOW, J. G. The effects of heating during processing on the functionality of whey protein concentrates. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 52, n. 6, p. 1522-1524, 1987b.

MATSUDOMI, N.; RECTOR, D. and KINSELLA, J. E. Gelation of bovine serum albumin and β- lactoglobulin effects of pH, salts and thiol reagents. **Food Chemistry, ,** v. 40, n. 1, p. 55-69, 1991.

McDERMOTT, R. L. Functionality of dairy ingredients infant formula and nutritional specialty products. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 10, p. 91-92, 1987.

MIRABEL, B. New extration process of milk whey proteins. **Annales de la Nutrition et de la Alimentation,** Paris, v. 32, n. 2-3, p. 243-253, 1978.

MORR, C. V. Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 5 , p. 1406-1411, 1985.

MORR, C. V. Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. **Food Technology**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 110-113, 1992.

MORR, C. V. Whey Protein:Manufacture. In: FOX, P. F. (Ed.). **Developments in Dairy Chemistry-4**, London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 245-285.

MORR, C. V. and FOEGEDING, E. A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 4, p. 100-112, 1990.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; KILARA, A.; LEWIS, B. A. and MAGINO, 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.

MORR, C. V. and HÁ, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional propreties. . **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.

33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MORR, C. V.; SWELSON, P. E. and RICHTER, R. L. Functional characteristics of whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 38, n.2, p. 324-330, 1973.

MULDOON, P. J. and LISKA, B. J. Relationship between ionized calcium and curd tension in reconstituted nonfat dry milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 55, n. 9, p. 1300-1301, 1972.

MULVIHILL, D. M. Production, functional properties and utilization of milk protein products. In: FOX, P.F. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry, vol. 1: Proteins.** London: Elsevier, 1992, p. 349-398.

MULVIHILL, D. M. and KINSELLA, J. E. Gelation of β-lactoglobulin effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 231-236, 1988.

MYERS, C. D. Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. In: HARWALKAR, V. R. and MA, C. –Y. (Ed.). **Thermal analysis of Foods**. London: Elsevier Applied Science, 1990, p. 16-50.

NADEAU, D. M. and CLYDESDALE, F. M. Effects of Zn concentration, Ca source, Percent milkfat and homogenization on Ca, Fe and Zn solubility in wheat cereal systems under simulated gastrointestinal pH. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 1, p. 146-150, 1991.

NAKAMURA, T.; UTSUMI, S. AND MORI, T. Network structure formation in thermally induced gelation of soybean glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 32, n. 2 , p. 349-352, 1984.

PALMER, D.E. Recovery of proteins from food factory waste by ion exchange. In: FOX, P. F. and CONDON, J. J. (Ed.). **Food Protein**. London: Applied Science Publisher,1982, p. 341-386.

PAPPAS, C. P. and ROTHWELL, J. The effects of heating, alone or in the presence of calcium or lactose, on calcium binding to milk proteins. **Food Chemistry**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 183-201, 1991.

PARRIS, N.; HOLLAR, C. M.; HSIEH, A. and COCKLEY K. D. Thermal stability of whey protein concentrate mixtures: aggregate formation. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 1, p. 19-28, 1997.

PEARCE, R. J. Whey processing. In: ZADOW, J. G. (Ed.). **Whey and Lactose Processing**. London: Elsevier, 1992, p. 73-118.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M. and KINSELLA, J. E. Protein stability. In: **Structure-Function Properties of Food Proteins,** London: Academic Press Inc, 1994a, p. 25-58.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M. and KINSELLA, J. E. Protein gelation. In: **Structure-Function Properties of Food Proteins,** London: Academic Press Inc, 1994b, p. 179-203.

PTITSYN, O. B. The molten globule state. In: CREIGTHTON,T. E. **Protein Folding.** New York: W. H. Freeman and Company, 1992, p. 243-300.

RANTAMÂKI, P.; TOSSAVAINEN, O.; OUTINEN, M.;TUPASELA, T.; KOSKELA, P. and KAUNISMÂKI, M. Functional properties of properties of the whey protein fractions produced in pilot scale processes. Foaming, water-holding capacity and gelation. **Milchwissenschaft-Milk Science International,** Munich, v. 55, n. 10, p. 569-572, 2000.

RECTOR D. J.; KELLA, N. K. and KINSELLA, J. E. Reversible gelation of whey proteins: melting, thermodynamics and viscoelastic behavior.**Journal of Texture Studies,**Trumbull, v. 20, n. 4, p. 457-471, 1989.

RIZVI, S. S. H. Rheologycal properties of comminuted meat systems. **Food Technology,** Chicago, v. 35, n. 5, p. 238-243, 1981.

ROSENTHAL, A. J. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. In: **Food Texture measurement and perception**, Oxford: Aspen Publishers, Inc., 1992, p. 1-17.

RÜEGG, M.; MORR, C. V. and BLANC, B. Calorimetric study of thermal-denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate, **Journal of Dairy Research**, New York, v. 44, n. 3, p. 509-520, 1977.

SCHMIDT, R. H. Gelation and coagulation. In: CHERRY, J. P. (Ed.). **Protein Functionality of Foods.** Washington: American Chemical Society, 1981, p. 131-147.

SCHMIDT, R. H.; ILLINGWIRTH, B. L. and AHMED, E. M. Heat-induced gelation of peanut protein/whey protein blends. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 43, n. 2, p. 613-614, 1978a.

SCHMIDT, R. H.; ILLINGWIRTH, B. L.; AHMED, E. M. and RICHTER, R. L. The effect of dialysis on heat-induced gelation of whey protein concentrate. **Journal of Food Processing and Preservation,** Connecticut, v. 2, n. 2 , p. 111-121, 1978b.

SCHMIDT, R. H.; ILLINGWIRTH, B. L.; DENG, J. C. and CORNELL, J. A. Multiple regression and response surface analysis of the effects of calcium chloride and cysteine on heat-induced whey protein gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 27, n. 3, p. 529-532,1979.

SCHMIDT, R. H. and MORRIS, H. A. Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems. . **Food Technology,** Chicago, v. 38, n. 5, p. 85-87, 1984.

SHIMADA K. and CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl-group disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey-protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 1, p. 161-168, 1989.

SHIMADA, K. and CHEFTEL, J. C. Texture characteristics, protein solubility and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1018-1025,1988.

SHIMADA, K. and MATSUSHITA, S. Relationship between thermocoagulation of proteins and amino-acid compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 2, p. 413-417, 1980.

SHIMIZU, M.; SAITO, M. and YAMAUCHI, Y. Emulsifying and structural properties of β-lactoglobulin at different pHs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 189-194, 1985.

SHORT, J. L. Prospects for the utilization of deproteinated whey in New-Zealand. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology,** Palmerston North, v. 13, n.4, p. 181-194, 1978.

SMITH, D. M.; ROSE, A. J. Gel properties of whey protein concentrates as influenced by ionized calcium. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 5, p. 1115-1118, 1994.

SPERLING, L. H. **Introduction to Physical Polymer Science.** 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1992.

STADING, M. and HERMANSSON, A. –M. Viscoelastic behavior of β-lactoglubulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 121-135, 1990.

STERNBERG, M.; CHIANG, J. P. and EBERTS, N. J. Cheese whey proteins isolated whit polyacrilic acid. **Journal of Dairy Science,** Champaign, v. 59, n. 6, p. 1042-1050, 1976.

TOMBS, M. P. Gelation of globular protein. **Faraday Discussions**, Cambridge, v. 57, p. 158-164, 1974.

VARDHANABHUTI, B. and FOEGEDING, E. A. Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 9, p. 3649-3655, 1999.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. (Ed.). **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic & Professional, 1996, p. 11-61.

XIONG, Y. L. Influence of pH and ionic enviroment on thermal aggregation of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 3, p. 380-384, 1992.

ZIEGLER, G. R. and FOEGEDING, E. A. The gelation of proteins. In: **Advances in Food and Nutrition,** London: Academic Press, 1990, v. 34, p. 204-286.

ZIRBEL, F. and KINSELLA, J. E. Factors affecting the reological properties of gels made from whey protein isolate. **Milchwissenschaft-Milk Science International,** Munich, v. 43, n. 11, p. 691-694, 1988.