

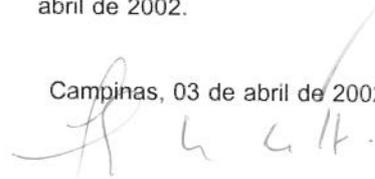
**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos**  
**Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição**

**INFLUÊNCIA DA ESTOCAGEM NAS CARACTERÍSTICAS E NA  
PROPRIEDADE DE GELEIFICAÇÃO DO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Vilene Braga Martins**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de abril de 2002.

Campinas, 03 de abril de 2002



**Profa. Dra. Flávia Maria Netto**  
Presidente da Banca

**Vilene Braga Martins**  
Engenheira de Alimentos

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Maria Netto**  
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição.

**Campinas, março de 2002**

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	M366i
V	EX
TOMBO	48800
FEA	16.837102
PREÇO	R\$11,00
DATA	07/05/02
Nº CPD	

CM00166939-5

BIBID. 244110

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M366i Martins, Vilene Braga  
Influência da estocagem nas características e na propriedade de geleificação do isolado protéico de soja / Vilene Braga Martins. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Flávia Maria Netto  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Soja. 2.Estocagem. 3. Geleificação. 4.Textura.  
5. Solubilidade. I.Netto, Flávia Maria. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

# Banca Examinadora

---

*Flávia Maria Netto*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Maria Netto

96

*Débora de Queiroz Tavares*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora de Queiroz Tavares  
(Membro)

97

*Maria Inês Genovese*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Genovese  
(Membro)

98

*Maria Teresa Bertoldo Pacheco*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Bertoldo Pacheco  
(Membro)

99

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

47867008



“ AMAR E MUDAR AS COISAS ME INTERESSAM MAIS...”

(Belchior)

## Dedicatória

---

Aos meus pais, Vicente e Lena,  
que tudo me ensinaram...

Ao Marcelo, que sempre esteve ao meu lado,  
tornando o meu caminhar mais leve e feliz.

## Agradecimentos

---

A “Flavita” pela paciência e amizade, sempre presente me auxiliando, corrigindo e puxando a minha orelha quando necessário.

A Vincent van Gogh, Fernando Pessoa, Florbela Espanca, Luis Fernando Verissimo, Herman Hesse, Nelson Rodrigues, Chico Buarque, Mônica Salmaso, Adriana Calcanhotto e Casseta & Planeta pelo apoio nas horas mais difíceis.

A meu grande amigo e companheiro Niudomar, pelo seu apoio e amizade.

Aos amigos de Campinas, Ana, Lê, Bia, Márcia, Bete, Vítor, Alvinho, Natal, Márcio, Homero e família, Arthur, Júnior e o pessoal da ITCP pela companhia preciosa.

A Maria Lúcia de Gomensoro e família, pelo carinho.

A todo pessoal do DEPAN e FEA, Carlos Grosso, Andréa Righetto, Flavinha, Sônia, Bethe, Rose, Eliana, Gustavo, Helenice, Cidinha, Robson, Chico, Patrícia, Nora, Fátima, Geraldo, Cosme, Estefane, Mauro e aos demais funcionários, alunos e professores que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Tereza Pacheco (ITAL) e Adilson (CPQBA) pelo grande e precioso auxílio nas análises de eletroforese.

A todas as pessoas que me ajudaram nas análises de microscopia, Iara, Prof<sup>a</sup> Débora, Prof<sup>a</sup> Hyde, Antônia, Adriane, Marcel e Dora.

A Alice e Prof. Carlos dos Anjos do DTA, pela atenção.

Aos meus amigos de Fortaleza e Icapuí, Mazé, Luiz, Laís, João Vítor, Juvaneide, Vilamar, Valci, Marcelino, Ester, Antônio, Weber, Delnine, Jean, Prof. Fred, Prof<sup>a</sup> Carminha, Dayse e Thiago que me ensinaram o caminho de volta para casa.

Aos Manezinhos da Ilha, Deisi, Moni (e toda família Narciso), Sid, Repolho e Marcelo, lembrando que NÃO É ASSIM NÃO !!!!

A Ronaldo, por todo seu carinho e atenção.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e a FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A FAEP pela concessão da bolsa auxílio.

VALEU CAMPINAS !!!!!

# ÍNDICE

---

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	xv
RESUMO	xxi
SUMMARY	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Atividade de água e estabilidade dos alimentos	3
3.2. Proteínas da soja	6
3.3. Isolado Protéico de Soja	8
3.4. Propriedades funcionais e aplicações das proteínas da soja	10
3.4.1. Solubilidade Protéica	12
3.4.2. Propriedade de geleificação	14
3.4.3. Capacidade de retenção de água (CRA) do gel	19
3.5. Textura: definição e classificação	21
3.5.1. Métodos objetivos de medição de textura	22
3.5.2. Análise do perfil de textura (TPA)	23
3.7.4. Microestrurura do gel	26

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
4.1. Matéria-Prima	29
4.2. Metodologia	29
4.2.1. Isoterma de sorção	29
4.2.2. Caracterização dos IPSs	30
4.2.2.1. Determinação de Umidade	30
4.2.2.2. Determinação de Cinzas	30
4.2.2.3. Determinação de Proteína Bruta	30
4.2.2.4. Determinação de Lipídeos totais	30
4.2.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	30
4.2.2.6. Solubilidade	31
4.2.3. Preparação do Gel de IPS	32
4.2.4. Análise do gel	32
4.2.4.1. Perfil de Textura (TPA)	32
4.2.4.2. Umidade Espremível do gel	33
4.2.4.3. Microestrutura do Gel	34
4.2.5. Experimento de estocagem	34
4.2.6. Análise Estatística	35
4.2.7. Modelo Cinético	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
5.1. Obtenção e caracterização inicial dos isolados protéicos de soja com diferentes atividades de água	37
5.1.1. Isoterma de sorção	37
5.1.2. Composição centesimal	41
5.1.3. Perfil eletroforético dos isolados protéicos de soja	42
5.1.4. Solubilidade	45
5.2. Caracterização do gel	49
5.2.1. Perfil de textura dos géis (TPA)	48
5.2.2. Umidade espremível dos géis	53
5.2.3. Microestrutura do gel inicial	57

5.3. Caracterização dos IPSs durante o armazenamento	61
5.3.1. Perfil eletroforético dos IPSs durante o armazenamento	61
5.3.2. Solubilidade dos IPSs durante o armazenamento	69
5.4. Caracterização do gel durante o armazenamento	75
5.4.1. Perfil de textura do gel durante o armazenamento	75
5.4.2. Umidade espremível do gel durante o armazenamento	86
5.4.3. Microestrutura do gel	99
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>115</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>119</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>129</b>

## Índice de Figuras e Tabelas

---

### ÍNDICE DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Curva da isoterma de sorção do IPS a 25°C (g H<sub>2</sub>O / g matéria seca X atividade de água)..... 39

**FIGURA 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida, em gradiente 8-25%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), dos isolados IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74, pelo sistema *Phastsystem* da Pharmacia ®..... 43

**FIGURA 3.** Solubilidade das amostras de isolados protéicos de soja equilibrados a diferentes atividades de água (IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74). Colunas identificadas por letras diferentes indicam que estas amostras diferem significativamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ )..... 47

**FIGURA 4.** Características de textura de géis obtidos de isolados protéicos de soja equilibrados a diferentes atividades de água (IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74): (a) dureza, (b) elasticidade e (c) coesividade. Colunas de um mesmo gráfico seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 51

**FIGURA 5.** Umidade espremível dos géis de isolados protéicos de soja equilibrados a diferentes atividades de água (IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74). Colunas identificadas por letras diferentes indicam que estas amostras diferem significativamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ )..... 55

**FIGURA 6.** Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), dos géis de isolados protéicos de soja equilibrados a diferentes atividades de água (IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74): (a) IPS-0,19, aumento de 220 vezes, (b) IPS-0,19, aumento de 3000 vezes, (c) IPS-0,33, aumento de 220 vezes, (d) IPS-0,33, aumento de 3000 vezes, (e) IPS-0,74, aumento de 220 vezes e (f) IPS-0,74, aumento de 3000 vezes. \_\_\_\_\_ 59

**FIGURA 7.** Composição relativa das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) da fração 11S, presentes na fração solúvel do IPS-0,19, extraídos com água destilada. Os valores representam a porcentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) em relação à área total das frações 7S e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese. \_\_\_\_\_ 63

**FIGURA 8.** Composição relativa das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) da fração 11S, presentes na fração solúvel do IPS-0,33, extraídos com água destilada. Os valores representam a porcentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) em relação à área total das frações 7S e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese. \_\_\_\_\_ 65

**FIGURA 9.** Composição relativa das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) da fração 11S, presentes na fração solúvel do IPS-0,74, extraídos com água destilada. Os valores representam a porcentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) em relação à área total das frações 7S e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese. \_\_\_\_\_ 67

**FIGURA 10.** Comportamento da solubilidade dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74: (a) durante 210 dias de estocagem a 25°C e (b) durante 150 dias de estocagem a 45°C. \_\_\_\_\_ 71

**FIGURA 11.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de perda da solubilidade dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74: (a) durante 60 dias de estocagem a 25°C e (b) durante 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação. \_\_\_\_\_ 73

**FIGURA 12.** Perfil de textura - dureza do gel dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74, durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C. \_\_\_\_\_ 77

**FIGURA 13.** Perfil de textura - elasticidade do gel dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C. \_\_\_\_\_ 79

**FIGURA 14.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de variação de elasticidade dos géis dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 60 dias de estocagem a 25°C e (b) 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação. \_\_\_\_\_ 81

**FIGURA 15.** Perfil de textura - coesividade do gel dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C. \_\_\_\_\_ 83

**FIGURA 16.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de variação de coesividade dos géis dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 60 dias de estocagem a 25°C e (b) 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação. \_\_\_\_\_ 85

**FIGURA 17.** Comportamento da umidade espremível do gel (UE%) dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C. \_\_\_\_\_ 87

**FIGURA 18.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de aumento de umidade espremível do gel (%UE) dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 60 dias de estocagem a 25°C e (b) 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação. \_\_\_\_\_ 89

**FIGURA 19.** Comparações entre o comportamento da umidade espremível do gel (%UE) com o perfil da solubilidade do IPS-0,74 durante estocagem a: (a) 25°C e (b) 45°C. \_\_\_\_\_ 93

**FIGURA 20.** Comparações entre o comportamento da umidade espremível do gel (%UE) com o perfil de dureza do gel do IPS-0,74 durante estocagem a: (a) 25°C e (b) 45°C. \_\_\_\_\_ 95

**FIGURA 21.** Comparações entre o comportamento da umidade espremível do gel (%UE) com o perfil de coesividade do gel do IPS-0,74 durante estocagem a: (a) 25°C e (b) 45°C. \_\_\_\_\_ 97

**FIGURA 22.** Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) dos géis do IPS-0,74, estocados a 25 e 45°C: (a) após 60 dias de estocagem a 25°C, aumento de 220 vezes; (b) após 60 dias de estocagem a 25°C, aumento de 3000 vezes; (c) após 180 dias de estocagem a 25°C, aumento de 220 vezes; (d) após 180 dias de estocagem a 25°C, aumento de 3000 vezes. (e) após 30 dias de estocagem a 45°C, aumento de 220 vezes; (f) após 30 dias de estocagem a 45°C, aumento de 3000 vezes; (g) após 75 dias de estocagem a 45°C, aumento de 220 vezes e (h) após 75 dias de estocagem a 45°C, aumento de 3000 vezes. \_\_\_\_\_ 101

**FIGURA 23.** Micrografías obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33, estocados a 25°C: (a) IPS-0,19, após 60 dias de estocagem, aumento de 220 vezes; (b) IPS-0,33, após 60 dias de estocagem, aumento de 220 vezes; (c) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 220 vezes; (d) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 220 vezes. (e) IPS-0,19, após 60 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes; (f) IPS-0,33, após 60 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes; (g) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes e (h) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes. \_\_\_\_\_105

**FIGURA 24.** Micrografías obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), com aumento de 220 vezes, dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33, estocados a 45°C: (a) IPS-0,19, após 45 dias de estocagem; (b) IPS-0,33, após 45 dias de estocagem; (c) IPS-0,19, após 90 dias de estocagem; (d) IPS-0,33, após 90 dias de estocagem; (e) IPS-0,19, após 135 dias de estocagem e (f) IPS-0,33, após 135 dias de estocagem. \_\_\_\_\_111

**FIGURA 25.** Micrografías obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), com aumento de 3000 vezes, dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33, estocados a 45°C: (a) IPS-0,19, após 45 dias de estocagem; (b) IPS-0,33, após 45 dias de estocagem; (c) IPS-0,19, após 90 dias de estocagem; (d) IPS-0,33, após 90 dias de estocagem; (e) IPS-0,19, após 135 dias de estocagem; (f) IPS-0,33, após 135 dias de estocagem. \_\_\_\_\_113

## ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1.** Quantidade relativa e composição das frações protéicas da soja.\_\_\_\_7
- TABELA 2.** Propriedades funcionais de proteínas em diferentes sistemas alimentares.\_\_\_\_\_ 11
- TABELA 3.** Relação das possíveis forças moleculares envolvidas na formação e manutenção da estrutura do gel de IPS, globulinas 7S e globulinas 11S.\_\_\_\_\_ 16
- TABELA 4.** Parâmetros estruturais e descrição do modo de agregação de proteínas do soro do leite visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).\_\_\_\_\_ 27
- TABELA 5.** Composição centesimal aproximada do IPS-0,19 e a umidade dos IPS-0,33 e IPS-0,74.\_\_\_\_\_ 40
- TABELA 6.** Composição relativa das frações 7S ( $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ ) e 11S (polipeptídeos ácido e básico), presentes na fração solúvel dos IPS ( $a_w$  0,19; 0,33 e 0,74) em água destilada, analisados por densitometria<sup>1</sup>.\_\_\_\_\_ 45
- TABELA 7.** Médias e coeficientes de variação (C.V.) dos parâmetros de textura dureza, elasticidade e coesividade, de géis de IPS equilibrados em diferentes atividades de água ( $a_w$  0,19; 0,33 e 0,74).\_\_\_\_\_ 53

## RESUMO

Atualmente, milhares de toneladas de proteína de soja são utilizadas como ingrediente funcional nas indústrias de alimentos e outras indústrias não alimentícias em diversas aplicações. No entanto, ainda faltam informações sobre o efeito das condições de armazenamento de isolados protéicos de soja nas propriedades funcionais destes isolados. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência das diferentes condições de estocagem (temperatura e atividade de água) sobre a propriedade de geleificação de isolado protéico de soja através da análise das mudanças sofridas pelas proteínas e das mudanças das características do gel. Isolado protéico de soja (IPS), com atividade de água ( $a_w$ ) inicial 0,19 (IPS-0,19), foi acondicionado em sistemas fechados contendo soluções saturadas de  $MgCl_2$  e NaCl, com umidade relativa de 33 e 74%, respectivamente. Os isolados IPS-0,33 ( $a_w$  0,33) e IPS-0,74 ( $a_w$  0,74) atingiram o equilíbrio após 20 dias de armazenamento a 25°C e foram, então, acondicionados em embalagens aluminizadas hermeticamente fechadas e armazenados em estufas a 25 e 45°C, por 210 dias. Durante a estocagem os IPSs foram avaliados quanto ao perfil eletroforético, solubilidade, perfil de textura, umidade espremível do gel (UE%) e microestrutura do gel. Modificações nas características das proteínas tiveram início no período de equilíbrio das amostras, principalmente em relação ao IPS-0,74. Observou-se, pela análise do perfil eletroforético, o desaparecimento na subunidade  $\beta$ -7S e diminuição do polipeptídeo B-11S da proteína solúvel em água do IPS-0,74 sugerindo agregação ocorrida durante o período de equilíbrio, o que pode ter contribuído para sua baixa solubilidade e diferenças nas características do gel (textura, microestrutura e UE%) quando comparado aos outros IPSs. Durante a estocagem os isolados IPS-0,19 e IPS-0,33 apresentaram comportamento semelhante para todos os atributos analisados. A solubilidade dos IPSs diminuiu no decorrer da estocagem, tanto a 25 como a 45°C. Pela análise do perfil de textura dos géis observou-se perda acentuada de elasticidade e de coesividade do gel do IPS-0,74 estocado a 25 e 45°C, enquanto que os IPS-0,19 e IPS-0,33 mostraram-se estáveis durante o armazenamento a 25°C. No entanto,

observou-se diminuição da coesividade do gel dos IPS-0,19 e IPS-0,33 em estocagem a 45°C. Devido à alta variabilidade da medida, não foi possível traçar um perfil para a dureza, embora se tenha percebido redução de dureza do gel do IPS-0,74. A UE% do IPS-0,19 e do IPS-0,33 permaneceu relativamente constante durante a estocagem a 25 e 45°C, já a UE% do IPS-0,74 aumentou 44% após 210 dias de estocagem a 25°C e após 90 dias de estocagem a 45°C este aumento foi superior a 100%. A análise do gel em microscópio eletrônico de varredura permitiu visualizar diferenças marcantes nas características dos géis, especialmente em relação ao gel do IPS-0,74, que apresentou estrutura grosseiramente agregada, o que pode ter resultado em baixa coesividade e capacidade de retenção de água do gel deste isolado. A aw e a temperatura de estocagem tiveram grande influência na estabilidade dos IPSs. Quanto maior a aw e maior a temperatura de estocagem, maior a velocidade com que a proteína perdia suas características originais. Os resultados sugerem que as condições de umidade relativa no armazenamento afetam as propriedades funcionais como solubilidade, geleificação e capacidade de retenção de água, importantes para a qualidade e utilização dos isolados protéicos de soja.

## ABSTRACT

Currently, thousands of tons of soy protein are used as functional ingredients in the food and non-food industries in various applications. However, information about the effect of the storage condition of protein isolates on their functional properties are still not available. The objective of the present work was to evaluate the influence of the different storage conditions (temperature and water activity) on the gelation properties of the soy protein isolate through the analysis of the changes occurred on the proteins and on the gel characteristics. Soy protein isolate (SPI), with initial  $a_w$  0.19 (SPI-0.19), was conditioned in closed systems containing saturated solutions of  $MgCl_2$  e  $NaCl$ , with relative humidity of 33% and 74%, respectively. The isolates SPI-0.33 ( $a_w$  0.33) and SPI-0.74 ( $a_w$  0.74) achieved equilibrium after 20 days at 25°C and were conditioned in sealed aluminum packages and stored at 25 and 45°C for 210 days. During the storage, the SPIs were evaluated according to their electrophoretic profile, solubility, texture profile, expressible moisture (EM%) of the gel and gel microstructure. Modifications on the protein characteristics already started in the equilibrium period of the samples, mainly regarding SPI-0.74. It was observed, by the analysis of the electrophoretic profile, the disappearing of the  $\beta$ -7S subunit and the reduction of the polypeptide B11-S of the water soluble protein of SPI-0.74, suggesting that some type of aggregation occurred during the equilibrium period, which might have contributed to its low solubility and difference in the characteristics of the gel (texture, microstructure and EM%) when compared to the other SPIs. During the storage the SPI-0.19 and SPI-0.33 isolates showed similar behavior for all attributes analysed. The solubility of the SPIs decreased during the storage period, both at 25 and at 45°C. By the analysis of the gel texture profile it was observed an accentuate loss of the elasticity and the cohesiveness of the SPI-0.74 gel stored at 25 and 45°C, while the SPI-0.19 and SPI-0.33 showed to be stable during the storage at 25°C. However it was observed a reduction on the gel cohesiveness of SPI-0.19 and SPI-0.33, stored at 45°C. Because of the high variability of the measure, it was not possible to get the hardness profile, while it was observed a

reduction on the hardness of the SPI-0.74 gel. The EM% of SPI-0.19 and SPI-0.33 keep relatively constant during the storage at 25 and 45°C, yet the EM% of SPI-0.74 increased 44% after 210 days of storage at 25°C and after 90 days of storage at 45°C this increase was over 100%. The analysis of the gel with scanning electronic microscope (SEM) made possible to observe the differences of gel characteristics, specially regarding the SPI-0.74 gel, which showed a coarse structure, which can have resulted the low cohesiveness and water holding capacity of this gel isolate. The storage conditions, temperature and aw of the SPIs had a great influence on the stability of the SPIs. The results suggested that aw was the main factor that affected the functional properties as solubility, geleification and water holding capacity, important to the quality and utilization of soy protein isolates.

# 1. INTRODUÇÃO

---

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa que constitui uma excelente fonte de proteína para a alimentação humana e animal, pois possui alta concentração de aminoácidos essenciais, particularmente lisina, leucina e aminoácidos aromáticos (Cheftel *et al.*, 1989).

Atualmente, milhares de toneladas de proteína de soja são utilizadas como ingrediente funcional nas indústrias de alimentos e outras indústrias não alimentícias em diversas aplicações (Rhee, 1994). As proteínas de soja têm como principais características funcionais: capacidade de hidratação, solubilidade, estabilidade coloidal, geleificação, emulsificação, formação de espuma e adesão/coesão (Morr, 1990), além de possuir aplicação como substituto de gordura em produtos à base de carne, peixe, leite, cereais e formulações infantis (Lusas & Riaz, 1995). Os isolados protéicos de soja agem como surfactantes na estabilização de emulsões, aumentando a vida de prateleira de diversos produtos (sopas, salsichas e maionese) (Yao *et al.*, 1990), sendo bastante utilizados em alimentos orientais tradicionais como o "tofu" e "tempeh" (Peng *et al.*, 1984).

Além de contribuir com suas propriedades funcionais, muitos estudos clínicos têm demonstrado vantagens associadas ao uso de produtos à base de soja na prevenção de doenças do coração, obesidade, colesterol, câncer, diabetes, doenças dos rins e osteoporose (Sirtori *et al.*, 1995 *apud* García *et al.*, 1997).

Segundo Rhee (1994), as características funcionais são dependentes das propriedades físico-químicas, as quais são afetadas pelas condições de processamento e estocagem. É importante um entendimento maior das condições de manufatura dos ingredientes a base de proteína de soja, já que estas afetam a composição, estrutura e propriedades funcionais das proteínas.

Uma das propriedades funcionais mais importantes do isolado protéico de soja é a sua capacidade de formar gel. A transição molecular da proteína do seu estado nativo para seu estado desnaturado envolve mudanças conformacionais nas estruturas quaternária, terciária e secundária, assim como nas suas ligações, como pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e ligações dissulfídicas. Estas mudanças determinam a estrutura final e textura do gel (Toledo & Ker, 1992). Diversos autores têm estudado as propriedades dos géis de IPS (Hermansson, 1986; Genovese e Lajolo, 1992; Puppo *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1991; Furukawa *et al.*, 1980; Lopez de Ogara *et al.*, 1992; Morr, 1990; Utsumi & Kinsella, 1985).

A estrutura do gel é responsável por diversas propriedades físicas como retenção de água e textura, estando intimamente relacionada com o comportamento da proteína durante a geleificação. Técnicas de microscopia eletrônica usadas para visualização e caracterização de estruturas de géis têm sido revisadas por Hermansson & Langton (1992) e Hermansson (1994).

Estudos foram feitos sobre a influência da estocagem nas propriedades funcionais de proteínas do soro do leite. Rector *et al.* (1991) mostraram que durante a estocagem ocorreu polimerização protéica, afetando a qualidade do gel de proteínas do soro do leite. Hsu & Fennema (1989) observaram alterações nas propriedades funcionais das proteínas do soro durante o armazenamento, possivelmente relacionadas com reações de Maillard, mudanças estruturais das proteínas, interações proteína-proteína, oxidação e outros fatores desconhecidos. Liu *et al.* (1991) observaram agregação protéica em soroalbumina bovina liofilizada após 24h de incubação a 96% de umidade e 37°C. Segundo os autores, esta agregação induzida pela umidade, pode ter sido resultado de formação de ligações S-S intermoleculares via reações de troca tiol-dissulfeto. Maior hidratação da proteína resulta em maior mobilidade molecular, que pode facilitar reações de troca tiol-dissulfeto.

O efeito das condições de armazenamento do IPS sobre as propriedades de geleificação ainda não foram adequadamente estudados. Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência de condições de estocagem, temperatura e atividade de água, em algumas propriedades do isolado protéico de soja e sobre a propriedade geleificante do IPS através da análise das mudanças sofridas pelas proteínas e das características do gel.

## **2. OBJETIVOS**

---

Avaliar as modificações das características do isolado protéico de soja e da propriedades de geleificação durante a estocagem.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### **3.1. Atividade de água e estabilidade dos alimentos**

O conteúdo e o estado físico da água nos alimentos influenciam as características físicas, químicas, qualitativas, sanitárias e funcionais dos componentes alimentares (Rockland & Stewart, 1981). Embora a umidade seja um parâmetro importante na conservação dos alimentos, tem sido observado que diversos produtos com mesmo conteúdo de água diferem significativamente em sua susceptibilidade as diversas alterações, não sendo seguro utilizar unicamente este parâmetro como indicativo de deterioração. Esta inadequação pode ser atribuída, em parte, às diferenças de intensidade com que as moléculas de água se associam com os constituintes não aquosos, já que a água fortemente ligada é menos disponível para o crescimento microbiano ou para reações químicas hidrolíticas (Fennema, 1996). Em muitos casos a atividade de

água (Aa) tem sido utilizada como parâmetro preferencial por representar melhor a água disponível ou o estado da água disponível, que melhor se correlaciona com o efeito na conservação dos alimentos (Teixeira Neto, 1997), no entanto outros fatores como concentração de oxigênio, pH, mobilidade da água e o tipo de soluto presente também podem, em alguns casos, exercer forte influência sobre a velocidade de degradação. Atividade de água, que numericamente varia de 0 a 1, é uma propriedade intrínseca da amostra e a umidade relativa é uma propriedade da atmosfera em equilíbrio da amostra (Fennema, 1996). Segundo Troller & Christian (1978) atividade de água pode ser definida como o quociente da pressão de vapor de água do alimento dividida pela pressão de vapor da água pura, a uma mesma temperatura:

$$Aa = \frac{p \text{ (pressão de vapor de água no sistema)}}{p_0 \text{ (pressão de vapor de água saturado)}}$$

Algumas categorias de água associada a proteínas com o aumento progressivo de Aa, foram apresentadas por Kinsella & Fox (1986):

#### **Água estrutural**

Água fortemente ligada, via ligações de hidrogênio, a grupos específicos da proteína, participando na estabilização da estrutura protéica, conseqüentemente indisponível para reações químicas ou como solvente.

#### **Água monocamada**

É a primeira camada de moléculas de água fortemente estruturadas, associadas quimicamente via ligações de hidrogênio e interações dipolo com grupos iônicos e polares da proteína, encontra-se na faixa de Aa de 0,05 a 0,2. Esta água (0,02-0,1g/1g de proteína) apresenta propriedades diferentes da água pura, não estando disponível como solvente para muitas reações químicas.

### **Água multicamada**

Água que ocupa os restantes dos sítios da primeira camada e forma várias capas adicionais em torno de grupos hidrofílicos de constituintes não aquosos. Predominam as ligações de hidrogênio água-água e água-soluto, corresponde à Aa de 0,3 a 0,7.

### **Água não congelável**

Inclui toda água estruturada com Aa 0,9 não congelável. A quantidade de 50g de água /g de proteína varia de acordo com o conteúdo de aminoácidos. Pode estar disponível para algumas reações químicas e como solvente.

### **Água Capilar**

Água fisicamente contida em cavidades, espaços vazios e fendas através de forças de superfície e capilares da molécula de proteína, encontra-se disponível como solvente e para reações químicas.

### **Água livre**

Água fracamente associada à proteína, apresenta características da água comum, afeta a viscosidade e difusão da proteína.

Para obtenção do valor da Aa nos alimentos, a temperatura deve ser especificada, pois os valores de Aa são dependentes da temperatura. Dependendo do produto, uma alteração de 10°C, na temperatura de estocagem, pode causar mudança na Aa de 0,03 a 0,2, podendo influir na estabilidade do produto (van den Berg & Leniger, 1978).

Segundo Richardson & Steinberg (1987) o processo de deterioração de alimento durante a estocagem está relacionado com a forma com que se liga a água aos componentes deste alimento. Labuza (1970) mostrou que diversas reações de deterioração em alimentos apresentam suas menores taxas na região da monocamada, a qual usualmente corresponde à faixa de Aa de 0,2 a 0,4. Um

aumento da Aa acima dessa região induz aumento na velocidade de reação de 50 a 100% para cada acréscimo de 0,1 de Aa.

Isotermas de sorção podem ser definidas como representações que interrelacionam o conteúdo de água de um alimento, expresso em massa de água por unidade de massa de matéria seca, com sua atividade de água a uma temperatura constante (Fennema, 1996). As isotermas são obtidas pela exposição da proteína seca a ambientes com diferentes umidades relativas até que atinjam o equilíbrio. Umidades relativas podem ser obtidas a partir de soluções saturadas de diferentes sais (Snyder & Kwon, 1987). O termo sorção de água refere-se a processos onde moléculas de água combinam progressivamente e reversivelmente com alimentos sólidos via sorção química, adsorção física e condensação multicamada e capilar (Kinsella & Fox, 1986). A sorção de água afeta a secagem, estabilidade de estocagem e o comportamento das proteínas em diferentes sistemas alimentares. Informações sobre interações da água com o alimento podem ser bastante úteis na determinação de condições de estocagem e na seleção de embalagem de diversos produtos (Kinsella & Fox, 1986).

### **3.2. Proteínas de soja**

As proteínas de soja foram inicialmente classificadas de acordo com sua velocidade de sedimentação em quatro frações: 2S, 7S, 11S e 15S (Naismith, 1955; Wolf & Briggs, 1956, *apud* Hermansson 1978). As quantidades relativas e as faixas de pesos moleculares representadas pela várias frações das proteínas são mostradas na Tabela 1.

**TABELA 1.** Quantidade relativa e composição das frações protéicas da soja.

Fração	% do total	Componentes	Peso Molecular
2S	22	Inibidores de tripsina	8.000- 21.000
		Citocromo C	12.000
7S	37	Hemaglutinina	110.000
		Lipoxigenases	102.000
		$\beta$ -amilase	67.700
		7S-Globulina	180.000-210.000
11S	31	11S-Globulina	350.000
15S	11	—	600.000

Fonte: Wolf & Cowan (1975) *apud* Hermansson (1978).

A glicinina (11S) e a  $\beta$ -conglucina (7S) são os principais componentes protéicos do IPS. Estas proteínas possuem estruturas quaternárias complexas que facilmente sofrem reações de associação-dissociação, dependendo das condições do meio (Morr *et al.*, 1986).

A fração 11S (320-350 kDa) é formada por seis subunidades (AB) composta de cadeias polipeptídicas ácidas (A) (pI 4,2-4,8) e básicas (B) (pI 8,0-8,5) unidas por ligações dissulfeto intermoleculares. O peso molecular dos polipeptídeos básicos pode variar de 19-22 kDa e os polipeptídeos ácidos de 34-45 kDa (Badley *et al.*, 1975).

A fração 7S (140-170 kDa) é um trímero formado a partir de várias combinações das suas três subunidades ( $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$ ) (Badley *et al.*, 1975). Estas subunidades são mantidas por ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Thanh e Shibasaki, 1976). O peso molecular das subunidades  $\alpha$  (pI 4,9),  $\alpha'$  (pI 5,2) e  $\beta$  (pI 5,7-6,0) pode variar de 57-76 kDa; 57-83 kDa e 42-53 kDa, respectivamente (Arrese *et al.*, 1991). A  $\beta$ -conglucina corresponde a mais de 90% da fração 7S e normalmente é encontrada na forma de dímero. A  $\beta$ -conglucina possui baixo conteúdo sulfidril e não apresenta ligações S-S intermoleculares entre suas subunidades (Thanh & Shibasaki, 1976).

A fração 7S possui apenas 4 átomos de enxofre que formam duas pontes dissulfeto intramoleculares. Contudo, pontes dissulfeto parecem não fazer parte das ligações entre as subunidades (Koshiyama, 1971 *apud* Hermansson, 1978). Já a fração 11S contém 48 átomos de enxofre e as ligações dissulfeto parecem participar das ligações entre os pares de subunidades ácidas e básicas (Badley *et al.*, 1975). Segundo Koshiyama (1971) a fração 7S contém apenas 2 ligações dissulfídicas por molécula (180,000 Da), enquanto que a fração 11S contém 20 ligações dissulfídicas por molécula (320,000 Da) (Draper & Catsimpoolas, 1978). Em relação à composição de aminoácidos, a fração 7S é rica em arginina e fenilalanina, enquanto que a fração 11S apresenta um maior conteúdo de  $\frac{1}{2}$ cistina, metionina, treonina, triptofano e glicina (García *et al.*, 1997). Tanto a fração 11S quanto a fração 7S são proteínas oligoméricas e seu estado de associação/dissociação e estabilidade térmica são dependentes do pH e força iônica. São capazes de formar ligações dissulfeto intermoleculares, diminuindo a flexibilidade, causando insolubilidade, turbidez e o aumento da viscosidade, contribuindo com as interações proteína-proteína. As ligações dissulfeto podem ser prontamente revertidas na presença de agentes redutores como o mercaptoetanol e sulfito de sódio (Badley *et al.*, 1975).

### 3.3. Isolado Protéico de Soja

O isolado protéico de soja é um dos ingredientes protéicos mais refinados, contendo  $\geq 90\%$  de proteína (Nx6,25) em base seca (Johnson & Kikuchi, 1988; Wolf & Cowan, 1975). É obtido a partir da farinha desengordurada de soja e pode ser preparado da seguinte maneira: a proteína da soja é primeiramente extraída da farinha desengordurada com solução alcalina (pH 8,5-9,0) e depois submetida à centrifugação para remoção do resíduo insolúvel. O líquido extraído é depois ajustado com adição de ácido até pH isoelétrico (pH 4,5) para precipitação das proteínas. Esta é separada por centrifugação, depois lavada com água para eliminar o resíduo ácido, e finalmente a proteína isolada é seca por atomização, obtendo-se o isolado protéico de soja. Esta forma de isolado é

freqüentemente utilizada em formulações e em aplicações nutricionais (Rhee, 1994).

Durante a obtenção de isolado protéico de soja podem ocorrer reações que alteram o estado inicial da proteína. O grau de desnaturação protéica afeta as propriedades funcionais como solubilidade, absorção de água, viscosidade e geleificação (Arrese *et al.*, 1991). Os diversos tipos de tratamento utilizados para extração e remoção de lipídios durante a preparação da farinha desengordurada, no processo de obtenção de isolados e concentrados protéicos de soja podem ocasionar mudanças químicas e físicas na proteína (Kinsella, 1979). O método de isolamento protéico afeta tanto a porcentagem das frações da proteína do isolado quanto a sua estrutura (López de Ogara *et al.*, 1992). Isolados protéicos de soja produzidos comercialmente podem apresentar características bastante diferentes das proteínas de soja nativa, devido às condições de processamento, as quais podem causar desnaturação e vários níveis de agregação protéica (Hermansson, 1986).

A relação entre os métodos de obtenção de isolados protéicos de soja e suas propriedades estruturais e funcionais foi investigada por Petruccelli & Añón (1994). Os autores observaram que após tratamento drástico a 98°C por 30 minutos, em pH 7,0 e 9,0, ocorreram reações de desnaturação e polimerização protéica. Os agregados eram formados tanto por subunidades AB da fração 11S, unidas por ligação dissulfeto, como pela subunidade  $\beta$  da fração 7S e o polipeptídeo B da fração 11S, mantidos por ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas. Segundo os autores, devido à grande variedade das espécies protéicas de soja, assim como devido à complexidade estrutural dos seus diversos componentes, torna difícil prognosticar as mudanças estruturais e funcionais que poderiam ocorrer quando a proteína for submetida a diversos tipos de tratamento.

### 3.4. Propriedades funcionais e aplicações das proteínas de soja

As propriedades funcionais das proteínas têm sido classificadas de acordo com suas propriedades físico-químicas, hidrofílicas, interfásicas e intermoleculares, as quais contribuem com características tecnológicas desejáveis nos produtos. Morr & Ha (1993) definem propriedades funcionais das proteínas como sendo as propriedades físico-químicas que influenciam a estrutura, aparência, textura, viscosidade ou a retenção de *flavor* do produto. Segundo os autores, a maioria das propriedades funcionais pode ser classificada em dois grupos principais: propriedades de hidratação e de superfície. Propriedades de hidratação incluem dispersibilidade, solubilidade, viscosidade e geleificação. As propriedades de superfície incluem emulsificação, formação de espuma e adsorção à interface de ar-água e óleo-água. Outras propriedades funcionais que não se encaixam em nenhuma dessas duas categorias incluem difusão, desnaturação e interações proteína-proteína e proteína-íon. As proteínas da soja apresentam boas propriedades de hidratação, capacidade de retenção de água (CRA), solubilidade, estabilidade coloidal, geleificação, emulsificação, formação de espuma e adesão/coesão (Morr, 1990). Propriedades funcionais de diversas proteínas em diferentes produtos alimentares estão listadas na Tabela 2.

As proteínas de soja, enquanto ingredientes funcionais, precisam apresentar propriedades específicas para determinadas aplicações. Estas propriedades correspondem às características físico-químicas intrínsecas que afetam o comportamento das proteínas em sistemas alimentares durante o processamento e estocagem (Kinsella, 1979; Morr, 1990; Peng *et al.*, 1984; Snyder & Kwon, 1987). Segundo Rhee (1994), a composição, estrutura e conformação das proteínas são fatores intrínsecos que influenciam significativamente nas suas propriedades funcionais. A elucidação sistemática das propriedades físico-químicas dos componentes protéicos, assim como as condições do meio, são críticas para o entendimento dos mecanismos de funcionamento das características funcionais.

**TABELA 2.** Propriedades funcionais de proteínas em diferentes sistemas alimentares.

Função	Mecanismo	Alimento	Tipo de Proteína
Solubilidade	Hidrofilicidade	Bebidas	P. do soro do leite
Viscosidade	CRA*, forma e tamanho hidrodinâmico	Sopas, sobremesas molhos	Gelatina
Geleificação	Formação de estrutura e mobilização de água	Géis, bolos, queijos e carnes	P. musculares, p. do ovo e do leite
Coesão/ adesão	Pontes de hidrogênio, lig. iônicas e hidrofóbicas	Carnes, salsichas e patês	P. musculares, p.
Elasticidade	Lig. hidrofóbicas e lig. cruzadas S-S	Carnes e produtos de panificação	P. musculares e cereais
Emulsificação	Adsorção e formação de filme	Salsichas, sopas, bolos	P. musculares, p. do ovo e do leite
Espuma	Adsorção interfacial e formação de filme	Sorvetes, bolos sobremesas	Proteínas do ovo e do leite

Fonte: Kinsella *et al.* (1985).

\* Capacidade de Retenção de Água

Os ingredientes protéicos de soja apresentam considerável potencial na manufatura de produtos substitutos do leite devido ao baixo custo, alto valor nutricional e reduzida alergenicidade. Contribui com suas características funcionais em diversos produtos como sorvetes, cremes, “coffee whiteners” e bebidas à base de soja (Rhee, 1994). Proteínas de soja, sob determinadas condições, podem formar estruturas de rede capazes de reter grandes quantidades de água e outros ingredientes em produtos gelatinosos como “tofu” e iogurte (Saio & Watanabe, 1978).

Atualmente é comum o uso de ingredientes protéicos de soja em sistemas cárneos processados. Ingredientes de proteína de soja são utilizados como substituintes parciais de carnes, agente ligante, acentuador de “flavor”, emulsificante, ingredientes de salmoura, contribuindo nutricionalmente e

funcionalmente com as características do alimento. As aplicações mais comuns de proteínas de soja como ingrediente funcional são na área de processados triturados e moídos (Rhee, 1994). Produtos a base de carne triturada contendo proteínas de soja como ingredientes possuem excelente textura, flavor e aparência, resultando em diminuição de custos de produção, porém sem reduzir a qualidade nutricional do produto (Kolar *et al.*, 1985; Kinsella *et al.*, 1985). IPS e concentrados proteicos de soja neutralizados são utilizados como ligantes e emulsificantes em produtos de carne para fatiar (bologna e frankfurters), melhorando suas propriedades de textura. Vários tipos de ingredientes protéicos de soja são utilizados em produtos reprocessados de carne para retenção dos sucos da carne e redução da separação da gordura durante o enlatamento, resultando em produtos de consistência mais firme, tais como sopas, apresuntados, recheios para bolos de carne, etc (Rhee,1994).

#### **3.4.1. Solubilidade Protéica**

A solubilidade protéica tem influência marcante em diversas propriedades funcionais, dentre elas, as mais afetadas são: emulsificação; formação de espuma e geleificação. Proteínas insolúveis, como ingrediente funcional, apresentam utilização limitada em alimentos (Damodaram, 1996).

Segundo Hayase *et al.* (1973), a solubilidade protéica é uma manifestação termodinâmica de equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente:



Diversos termos são utilizados para designar solubilidade protéica: proteínas solúveis em água (PSA), proteínas dispersas em água (PDA), índice de nitrogênio solúvel (INS) e índice de dispersibilidade protéica (IDP). Morr *et al* (1985) padronizaram um método para determinação da solubilidade protéica a

partir da modificação do INS, visando minimizar erros quando o método fosse utilizado em diferentes laboratórios.

A solubilidade é influenciada pela natureza iônica e hidrofóbica da proteína. Interações hidrofóbicas promovem ligações proteína-proteína, resultando na diminuição da solubilidade, já interações iônicas induzem a formação de ligações proteína-água, que resultam no aumento da solubilidade. Resíduos iônicos auxiliam na formação de dois tipos de forças repulsivas entre moléculas de proteína em solução. A primeira envolve repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína que possuem cargas negativas ou positivas, em pHs diferentes do  $pI$  e a segunda envolve repulsão entre os sítios de hidratação ao redor dos grupos iônicos (Damodaran, 1996).

As globulinas, principal fração das proteínas de soja, são solúveis em soluções salinas, embora possam ser extraídas com água. A solubilidade das proteínas de soja em água varia com o pH. A faixa de pH de maior extração destas proteínas varia de 6,4 a 6,6, onde aproximadamente 85% das proteínas de soja são extraídas. A adição de ácidos resulta na diminuição da solubilidade, atingindo o mínimo em pH 4,5, aproximadamente (Snyder & Kwon, 1987).

A desnaturação da proteína por aquecimento expõe seus grupos hidrofóbicos, os quais subseqüentemente interagem entre si, causando agregação e diminuição da solubilidade. Trocas dissulfídicas internas podem também estar envolvidas em agregações termicamente induzidas em proteínas (Morr, 1990). Reações de desnaturação protéica podem ocorrer durante o processamento e estocagem de produtos protéicos com alteração de suas propriedades funcionais (Damodaram, 1996). Segundo Snyder & Kwon (1987), a fração 11S apresenta um grande decréscimo de solubilidade durante a estocagem, e este decréscimo é geralmente atribuído à formação de polímeros via ligação dissulfídica.

As propriedades funcionais de IPS são reflexo da composição e estrutura de seus principais componentes, as globulinas 7S e 11S, e dependem basicamente do grau de dissociação, desnaturação e/ou agregação destas proteínas (Kinsella, 1979; Utsumi *et al.* 1984). Rector *et al.* (1991) observaram que reações de polimerização protéica foram responsáveis pela diminuição da solubilidade de proteínas do soro do leite após 7 dias de estocagem a 80°C, os autores sugerem que reações de polimerização podem causar alterações na conformação estrutural das moléculas de proteína, alterando assim sua funcionalidade.

### **3.4.2. Propriedade de Geleificação**

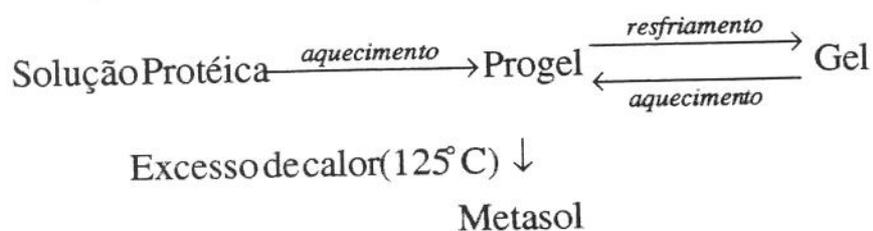
Géis protéicos podem ser definidos como redes nas quais interações polímero-polímero e polímero-solvente ocorrem de uma maneira ordenada resultando na imobilização de grande quantidade de água por meio de uma pequena proporção de proteína (Flory, 1974; Hermansson, 1979). A geleificação geralmente se dá em duas etapas: um desdobramento inicial de uma molécula de proteína seguida por subsequente agregação (Mangino, 1992). 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 na alteração da molécula protéica, é chamada de desnaturação. A medida que a desnaturação térmica ocorre, a maioria das moléculas de proteína começa a se desdobrar e aumentar a quantidade de moléculas de água que se liga à proteína. No entanto, este aumento ocorre até determinado grau de desnaturação protéica, após este ponto, a capacidade da proteína de ligar-se a água diminui. Se interações proteína-proteína levarem à formação de uma rede tridimensional capaz de englobar moléculas de água o gel se formará (Mangino, 1992).

Os fatores mais importantes que afetam a formação de gel são temperatura de desnaturação, concentração protéica, pH, concentração de sais, concentração de grupos sulfidrilas livres e a hidrofobicidade da proteína (Mangino, 1984). Em termos dos mecanismos envolvidos na formação da estrutura do gel, Hermansson (1986) verificou que estruturas ordenadas e regulares resultaram em géis transparentes com boas propriedades de retenção de água e que uma agregação molecular aleatória resulta em géis opacos com baixas propriedades de retenção de água.

Aquecendo proteínas de soja a temperaturas superiores a 70°C, ocorre a dissociação das suas estruturas quaternárias, desnaturação das suas subunidades, e a formação de agregados protéicos via interações eletrostáticas, hidrofóbicas e dissulfídicas (Morr, 1990). O aquecimento induz o desdobramento das proteínas, as quais adquirem um novo estado conformacional, alterando sua funcionalidade. Geralmente, aquecimento a temperaturas acima da temperatura mínima de desnaturação protéica é requerido para a formação do gel (Paulsson *et al.*, 1986).

A solução protéica, após aquecimento, passa para um estado de alta viscosidade chamado Progel, que através de um processo reversível pode formar gel após resfriamento. O Progel, caso seja submetido à aquecimento excessivo, 125°C, passa para um estado irreversível chamado Metasol. Segundo os autores, as ligações que estão envolvidas na fase de transição Progel → Gel são principalmente não-covalentes.

Catsimpoolas & Meyer (1970) propuseram um esquema para a geleificação das proteínas de soja:



Utsumi & Kinsella (1985) demonstraram que interações eletrostáticas e pontes dissulfeto estão envolvidas na geleificação da globulina 11S, pontes de hidrogênio na geleificação da 7S e pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas na geleificação de IPS com todas suas frações. As possíveis forças moleculares envolvidas na formação e manutenção da estrutura do gel de IPS, globulinas 7S e 11S são mostradas na Tabela 3.

**TABELA 3.** Relação das possíveis forças moleculares envolvidas na formação e manutenção da estrutura do gel de IPS, globulinas 7S e globulinas 11S.

Gel	Possíveis forças moleculares envolvidas na:	
	Formação do gel	Manutenção da estrutura do gel
11S	Ligações Dissulfídicas	Ligações Dissulfídicas
	Interações Eletrostáticas	Pontes de Hidrogênio
	Interações Hidrofóbicas	
7S	Pontes de Hidrogênio	Pontes de Hidrogênio
	Interações Eletrostáticas	
IPS	Interações Hidrofóbicas	Ligações Dissulfídicas
	Pontes de Hidrogênio	Pontes de Hidrogênio

Fonte: Utsumi & Kinsella (1985)

Os géis de glicinina (11S) são mais firmes e mais elásticos do que os obtidos com  $\beta$ -conglucina (7S), devido, provavelmente, aos géis de glicinina serem estabilizados por numerosas ligações dissulfeto (Saio & Watanabe, 1978). Puppo *et al.* (1995), em trabalho com géis de IPS em condições ácidas, sugerem que forças eletrostáticas possivelmente não estão envolvidas na manutenção da estrutura do gel. Nakamura *et al.* (1986), Utsumi & Kinsella (1985) e Yamauchi *et al.* (1991) investigaram o comportamento de géis de IPS em pH 7,6 a 8,0 e concluíram que ligações de hidrogênio e dissulfeto participam da estrutura do gel.

A propriedade da proteína de formar gel tipo coágulo ou translúcido está relacionada fundamentalmente com sua estrutura intrínseca e/ou características moleculares, tais como hidrofobicidade média (a qual depende da composição de aminoácidos), carga líquida, peso molecular e concentração protéica. Observou-se também que proteínas que apresentam conteúdos de aminoácidos apolares maiores que 31,5% formam gel tipo coágulo e proteínas com menos que 31,5% de aminoácidos apolares formam gel translúcido (Shimada & Matsushita, 1980). O conteúdo de aminoácidos apolares e, portanto, a intensidade das interações hidrofóbicas intramoleculares influencia as mudanças conformacionais que ocorrem logo após o aquecimento e interações subsequentes dentro da matriz do gel (Shimizu *et al.*, 1985).

A carga líquida das moléculas de proteína é responsável pela manifestação de forças atrativas e repulsivas e por consequência, as interações entre as moléculas de proteína e com o solvente. Por exemplo, para valores elevados de pH, as soluções de proteínas do soro do leite formam um gel translúcido, contudo, para pHs próximos ao ponto isoelétrico (pH 5,2) a carga líquida decresce, forças atrativas predominam e o coágulo é formado. Com o aumento do pH, as proteínas tornam-se mais negativamente carregadas, resultando em maior repulsão eletrostática, perda de interações proteína-proteína e, conseqüentemente, um gel mais fraco será formado (Zirbel & Kinsella, 1988).

A aparência do gel está relacionada com a concentração de grupos sulfidrilas livres; quanto maior a concentração destes grupos, mais opaco será o gel. A função das ligações dissulfídicas intermoleculares na geleificação da proteína pode estar relacionada com a sua habilidade em aumentar o comprimento da cadeia dos polipeptídeos antes da formação/estabilização inicial da rede (Snyder & Kwon, 1987). Um conteúdo reduzido de pontes dissulfeto resulta num decréscimo da força do gel (Yao *et al.*, 1990). Grupos tióis reativos quando expostos podem formar ligações covalentes dissulfídicas intermoleculares via tiol-dissulfeto e reações de oxidação (Matsudomi *et al.*, 1991). Em condições

aeróbicas, a concentração de grupos tióis livres diminui com o aumento do número de ligações dissulfídicas durante o tratamento térmico. As reações de troca tiol-dissulfeto são importantes na geleificação induzida por calor, pois formam ligações covalentes cruzadas envolvidas na formação da rede do gel, particularmente em géis de proteínas do soro. As propriedades elásticas dos géis são diretamente proporcionais à quantidade de ligações cruzadas S-S presentes (Rector, 1991).

A concentração protéica é um fator importante na determinação do tipo de gel e nas suas características finais, principalmente em relação a textura, sendo que a dureza do gel aumenta com o aumento da concentração protéica devido à formação de um número maior de ligações cruzadas. Interações protéicas intermoleculares ocorrem mais rapidamente em concentrações protéicas elevadas, dada a maior probabilidade de contatos intermoleculares. Abaixo de certa concentração e dependendo do tipo de proteína utilizada, a geleificação pode não ocorrer (Phillips *et al.*, 1994).

A temperatura tem influência marcante no processo de geleificação e nas características do gel. Damodaran (1994) observou que o aquecimento de soluções protéicas até uma temperatura ótima de aquecimento resultou num aumento da dureza do gel, após esta temperatura, a dureza do gel começou a diminuir. Esta dependência da temperatura está relacionada com a extensão do desdobramento da proteína. Para muitas proteínas a faixa de temperatura ótima para geleificação é definida pela sua temperatura de desnaturação. Aquecimento excessivo a temperaturas superiores a 100°C freqüentemente causa quebra das ligações peptídicas primárias em proteínas inibindo a formação da rede do gel (Damodaran, 1994).

Poucos estudos foram realizados sobre os efeitos da estocagem nas características e propriedades de isolados protéicos. Rector *et al.* (1991), em estudos feitos com proteínas do soro do leite, mostraram que o tempo e as condições de estocagem, 80°C/7 dias e 25°C/365 dias, afetam as propriedades

de geleificação, assim como as características da proteína. Desnaturação parcial e progressiva polimerização da proteína foram observados. Estes autores observaram, através da análise do perfil eletroforético, que no início da estocagem a 80°C ocorreu uma acentuada formação de dímeros, depois diminuindo devido à produção de material de alto peso molecular. A diminuição da força do gel coincidiu com o desaparecimento de monômeros de  $\beta$ -lactoglobulina durante a estocagem, devido à formação de polímeros protéicos. Após 365 dias de estocagem a 25°C, 18% da  $\beta$ -lactoglobulina monomérica foi convertida em material de alto peso molecular. Segundo os autores o decréscimo na qualidade do gel parece ter sido resultado de ligações cruzadas covalentes do tipo não dissulfídica que foram responsáveis pela polimerização das proteínas.

Hsu & Fennema (1989) estudaram o efeito de diversos fatores como atividade de água, temperatura e tempo de estocagem e atmosfera de empacotamento sobre as propriedades funcionais da proteína do soro concentrada (solubilidade, espuma e emulsificação). Constataram que as variáveis mais importantes foram tempo e temperatura de estocagem, seguida pela atividade de água nas condições de estudo. As causas das alterações nas propriedades funcionais das proteínas durante a estocagem possivelmente estiveram relacionadas com reações de Maillard, mudanças estruturais das proteínas, interações proteína-proteína, oxidação e outros fatores desconhecidos.

### **3.4.3. Capacidade de retenção de água (CRA) do gel**

A capacidade do gel de reter água, lipídeos, açúcares e outros constituintes é muito útil no desenvolvimento de novos produtos, como sausichas, tender, produtos de panificação e sistemas geleificados, e depende basicamente da interação da água com a proteína (Puppo *et al.*, 1995; Damodaran, 1996). A capacidade de retenção de água refere-se a habilidade da proteína de absorver e reter a água dentro de uma matriz protéica, contra a força gravitacional. Esta água refere-se a soma da água ligada, água livre e água fisicamente retida no gel

(Damodaran, 1996). Segundo Furukawa & Otha (1982), géis de IPS, artificialmente modificados pela adição de um agente redutor de ligações dissulfídicas, a CySH, apresentam alto nível de água livre devido à inibição da formação da rede do gel pela clivagem das ligações S-S e conseqüentemente, menor CRA .

A capacidade de retenção de água pode ser expressa pela porcentagem de água retida no gel após centrifugação (Puppo *et al.*, 1995), enquanto que a umidade espremível refere-se à água liberada pelo gel após a centrifugação (Jauregui *et al.*, 1981).

Mudanças na formação da estrutura da rede do gel resultam na alteração das propriedades mecânicas e CRA do gel (Furukawa & Otha, 1982). A CRA está fortemente relacionada com o tipo de estrutura protéica, dependendo principalmente do pH e da força iônica do gel. Estruturas protéicas homogêneas produzem gel com alta capacidade de retenção de água, enquanto que estruturas irregulares apresentam alto grau de sinerese (Puppo & Añón, 1988).

Puppo *et al.* (1995) estudaram o efeito do pH (2.5; 2.75; 3.0; 3.25; 3.5 e 8) e da concentração protéica (8, 10, 12 e 14%) na geleificação e na capacidade de retenção de água do isolado protéico de soja. A CRA em pH 8,0 foi semelhante à dos géis ácidos. A CRA permaneceu praticamente constante com o aumento da concentração protéica do gel a pH 2.75, contudo houve um pequeno decréscimo na CRA do gel a pH 3.5. Neste caso as interações proteína-proteína podem ter sido favorecidas pelo decréscimo da carga elétrica da proteína e também pelo aumento da concentração protéica.

### 3.5. Textura: definição e classificação

Os fatores de qualidade de um alimento determinam o preço ou o valor do produto para o consumidor (Aguilera & Stanley, 1990). Os quatro principais atributos de qualidade dos alimentos são:

- Aparência: baseada nas propriedades visuais do produto (cor, brilho, tamanho e formato);
- *Flavor*: relaciona-se com a percepção de estímulos químicos através do sentido do paladar (sabor) e do olfato (odor);
- Textura: detectada a partir de estímulos físicos, percebidos pelo sentido do tato, quando alguma parte do corpo entra em contato com o alimento;
- Valor nutricional

Textura é um termo difícil de ser definido por envolver características físicas e sensoriais de um produto. Kramer (1973) definiu textura como uma das propriedades sensoriais primárias do alimento e está intimamente relacionada com o sentido do tato, podendo ser medida objetivamente através de testes mecânicos e expressos em unidades de massa e força.

Segundo deMan (1975), a textura é resultado da maneira como os componentes estruturais do alimento se arranjam micro e macro-estruturalmente, das manifestações externas de sua estrutura em termos de escoamento e deformação. Esta definição leva em consideração a natureza das partículas e estruturas constituintes do alimento, além de sua aparência, relacionando-as com o comportamento do alimento nos testes sensoriais e mecânicos.

Bourne (1982) sugere que as propriedades de textura correspondem às características físicas dos elementos estruturais que compõe o alimento, podendo ser medidas tanto pelo sentido do tato, como através de testes objetivos,

relacionados à deformação e desintegração do alimento pela aplicação de uma força, expressos em função de massa, tempo e distância.

Szczesniak (1963) desenvolveu uma classificação para as características de textura, dividindo-a em três grupos:

1. Características mecânicas: manifestadas através da reação do alimento à aplicação de uma força.

2. Características geométricas: referem-se ao tamanho, forma e orientação dos constituintes estruturais de um alimento, refletindo principalmente na aparência do produto.

3. Outras características: relacionam-se com a percepção da umidade e gordura presente no alimento.

As características mecânicas foram subdivididas em:

(a) Características primárias: dureza, elasticidade, coesividade, viscosidade e adesividade;

(b) Características secundárias: fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade.

### **3.5.1. Métodos objetivos de medição de textura**

Devido a grande variedade dos tipos de alimentos, suas diferentes propriedades reológicas e texturais, como também as diversas técnicas existentes para medir tais propriedades, faz-se necessário classificar os métodos de medição de textura em grupos para poder melhor entender o sistema. Scott Blair (1958; *apud* Bourne, 1982) dividiu estes métodos em três categorias: métodos fundamentais, empíricos e imitativos.

- *Métodos fundamentais*: medem as propriedades reológicas fundamentais, como, por exemplo, viscosidade e elasticidade, relacionando a natureza do produto testado aos modelos reológicos

clássicos (Szczesniak, 1973). Através dos métodos fundamentais é possível determinar uma ou mais constantes físicas que descrevem exatamente as propriedades dos alimentos em unidades bem definidas (Voisey, 1976).

- *Métodos empíricos*: medem parâmetros pobremente definidos, porém apresentam boa correlação com os métodos sensoriais. Constitue ecanismo simples e rápido, adequado para a rotina de controle de qualidade na indústria (Bourne, 1975). Numerosos instrumentos, baseados nos princípios empíricos, podem ser classificados de acordo com o tipo de função exercida como: penetração, cisalhamento, extrusão, compressão e escoamento (Brennan, 1980).

- *Métodos imitativos*: envolvem o uso de instrumentos que imitam as condições do processo de mastigação do alimento. Poucos instrumentos foram citados, dentre eles estão o texturômetro da *General Foods*, farinógrafo, denturômetro e o consistômetro Adams (Bourne, 1982).

### **3.5.2. Análise do perfil de textura (TPA)**

A *General Foods* desenvolveu um aparelho capaz de simular a mastigação com a aplicação de dois ciclos de compressão sobre a amostra através da utilização de um cilindro. Este aparelho, chamado de texturômetro "*General Foods*" (*texturometer GM*), foi pioneiramente utilizado por Friedman *et al.* (1963), que desenvolveram e fundamentaram a análise do perfil de textura (TPA), mais tarde modificado por Bourne (1968), que adequou o uso do Instron UTM para a determinação do perfil de textura.

A compressão da amostra em texturômetro gera uma curva força-tempo da qual se pode calcular diversos parâmetros de textura (Friedman *et al.*, 1963; Szczesniak, 1963). A análise do perfil de textura (TPA) requer três diferentes medidas de força (dureza, fraturabilidade e gomosidade); duas de trabalho (adesividade e mastigabilidade); uma de distância (elasticidade) e uma de proporção (coesividade) (Bourne, 1968). Os parâmetros de textura foram definidos por Friedman *et al.* (1963), modificados por Bourne (1968) e apresentados por Van Vliet (1991) como:

- *Dureza TPA*: força necessária para atingir uma dada deformação;
- *Fraturabilidade TPA*: força necessária para fraturar o material;
- *Coesividade TPA*: força necessária para que o dispositivo se descole da amostra.
- *Elasticidade TPA*: é a velocidade com que um material deformado retorna a sua condição inicial após ser retirada a força deformante.
- *Adesividade TPA*: é a quantidade de força para simular o trabalho necessário para sobrepor as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície da sonda em contato com este.
- *Mastigabilidade TPA*: é a energia requerida para se mastigar um sólido até o ponto de ser engolido.
- *Gomosidade TPA*: é a energia requerida para se desintegrar um alimento semi-sólido até o ponto de ser engolido.

A análise do perfil de textura correlaciona atributos sensoriais com medidas objetivas de textura e tem sido bastante utilizada na avaliação das características de textura de diversos tipos de alimentos, particularmente de sistemas geleificados (Ju & Kilara, 1998; Genovese e Lajolo, 1992; Kang *et al.*, 1991; Furukawa *et al.*, 1980).

Kang *et al.* (1991) caracterizaram a textura e as propriedades mecânicas por testes de compressão de géis de proteínas de soja obtidas por precipitação ácida, em diferentes temperaturas (80-100°C), concentração protéica variada (18-20%) e diferentes proporções de glicinina/ $\beta$ -conglucina. Géis formados a altas temperaturas de aquecimento (>93°C) e alta concentração protéica (20%) apresentaram consistência mais coesa, dura e sem fraturas. A dureza do gel aumentou com o aumento da temperatura de aquecimento e concentração protéica. Segundo os autores o grande aumento da dureza e da coesividade do gel em temperaturas superiores à 93°C possivelmente está relacionado com mudanças conformacionais ocorridas em função da associação das moléculas de glicinina, com formação de uma nova estrutura de rede do gel mais firme. A elasticidade desses géis foi similar em todas as concentrações de proteína e menor quando aquecida a temperaturas maiores. A elasticidade decresceu significativamente com o aumento da temperatura de aquecimento ( $p < 0,05$ ), porém este decréscimo foi gradual abaixo da faixa de temperatura de desnaturação da glicinina ( $\cong 90^\circ\text{C}$ ). Para os autores, isto sugere que a contribuição da  $\beta$ -conglucina na estrutura do gel é refletida na elasticidade, levando-se em conta que as temperaturas de desnaturação da glicinina e da  $\beta$ -conglucina são respectivamente 90 e 75°C (Kinsella *et al.*, 1985; apud Kang *et al.*, 1991). O nível de glicinina/ $\beta$ -conglucina afetou a textura dos géis. Diferenças na estabilidade térmica da glicinina e  $\beta$ -conglucina, especialmente em diversas concentrações de sais, podem resultar em géis com diferentes propriedades físicas (Catsimpooulas & Meyer, 1970). Géis preparados com proteínas de soja contendo 56% de glicinina (glicinina/ $\beta$ -conglucina, nível 2,41) e 24% de glicinina (glicinina/ $\beta$ -conglucina, nível 0,88) foram comparados. Géis ricos em glicinina mostraram-se mais coesos e menos elásticos do que géis com maior proporção de  $\beta$ -conglucina.

### 3.6. Microestruturura do gel

O tipo de estrutura de rede formada pela proteína durante a geleificação contribui com as características de textura de muitos alimentos e com sua capacidade em reter água, gordura e outros componentes. Embora se saiba que a microestrutura do gel está fortemente relacionada com as propriedades funcionais, pouco se sabe sobre a estrutura do gel de um modo geral, especialmente a nível coloidal e supramolecular e sobre a relação estrutura–função (Hermansson, 1994).

Existem diferentes tipos de géis e para cada tipo há uma maneira adequada de analisá-lo. Se a estrutura do gel for composta por uma rede fina e transparente, este poderá ser analisado por microscópio eletrônico de transmissão, que possui alta resolução. Contudo, se o gel for opaco e de formação agregada, ele poderá ser analisado por microscópio eletrônico de varredura (MEV) ou ainda, por microscópio óptico (Hermansson, 1994).

A microestrutura pode ser descrita através de parâmetros estruturais bem definidos, os quais podem ser quantificados através da análise de imagens por MEV. Microscopistas desenvolveram uma tabela com diversos atributos estruturais para descrever o tipo de agregação de géis de proteínas do soro do leite preparados em diferentes condições de pH, adição de sal e temperatura de aquecimento. Foram estabelecidos cinco parâmetros estruturais: porosidade (*porosity*), empilhamento em forma de cachos (*clusters*), conglomerados (*conglomerates*), cordões de contas (*string of beads*) e pequenos pêlos (*hairness*) (Langton & Hermansson, 1996). Estes parâmetros são mostrados na Tabela 4.

**TABELA 4.** Parâmetros estruturais e descrição do modo de agregação de proteínas do soro do leite visualizadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Atributos	Descrição
Porosidade	Quantidade de poros.
Cachos	Partículas globulares agrupadas formando estruturas semelhantes a cachos de uva.
Conglomerados	Partículas dispostas sob forma irregular, não linear e não homogênea.
Cordão de contas	Partículas dispostas sob forma regular e linear formando estruturas semelhantes a cordão de contas.
Projeções aciculares	Pequenas projeções aciculares presos à superfície das partículas.

Fonte: Langton & Hermansson (1996).

Gel de isolado protéico de soja foi estudado através de microscópio eletrônico por Hermansson & Buchheim (1981). Estes autores observaram que IPS podem formar géis de diferentes tipos de estrutura (agregada, separada e cadeia ordenada). A glicinina (fração 11S) e a conglucina (fração 7S) têm habilidade de formar géis de cadeia ordenada. A rede do gel de ambas as proteínas é composta de monômeros associados, organizados de forma circular. A rede do gel de glicinina é mais regular e o número de ligações cruzadas é menor do que em géis de conglucina.

Fatores estruturais responsáveis pelas propriedades de textura de géis de IPS foram investigados com utilização de técnicas microscópicas e testes mecânicos. Furukawa *et al.* (1980) investigaram a influência da temperatura (25-130°C) sobre as características de textura de géis de IPS (20%). Para avaliação da textura dos géis foram utilizados texturômetro, reômetro e microscópio eletrônico de varredura. Os géis formados foram classificados em macio, duro e frágil. O aquecimento da amostra a temperaturas abaixo de 50°C resultou na formação de géis macios, diferentes dos formados entre 60-110°C, que

apresentaram consistência mais firme e dura. Em temperaturas superiores a 120°C houve formação de géis mais frágeis, correspondendo ao “metasol” definido por Catsimpoolas & Meyer (1970). O acompanhamento da formação da rede do gel através da visualização da estrutura dos poros e do gel por SEM permitiu observar com clareza a relação entre a textura e a estrutura do gel de IPS. A formação da estrutura de rede não foi completa em géis induzidos termicamente a 40°C. Géis formados a 80°C revelaram a presença de uma membrana fina e compacta e poros com 10-20µm de diâmetro. Géis frágeis (120°C) apresentaram estrutura do gel parcialmente colapsada (Furukawa *et al.* 1980).

Puppo *et al.* (1995) estudaram o efeito do pH (2.5; 2.75; 3.0; 3.25; 3.5 e 8) e da concentração protéica (8, 10, 12 e 14%) na geleificação do isolado protéico de soja. Géis com pH 3,5 apresentaram microestrutura mais agregada e menos homogênea do que a pH 2,75 e 8. Géis com pH 8,0 apresentaram estrutura similar à de géis ácidos, porém com distribuição estrutural diferente. Os autores observaram que géis a pH 3,5 são menos transparentes do que géis a pH 2,75 e 8,0.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. Matéria-Prima

O isolado protéico de soja comercial Samprosoy 90 - MP foi fornecido pela CEVAL (Brasil). Para obtenção das amostras com as atividades de água (Aa) desejadas, o IPS foi colocado em ambientes fechados contendo soluções saturadas de  $MgCl_2$  e  $NaCl$ , com umidades relativas de 33 e 74%, respectivamente, até atingirem o equilíbrio após 20 dias a 25°C. Como controle, utilizou-se amostra de IPS com sua atividade de água inicial (Aa 0,19). A composição centesimal do IPS-0,19 no seu estado inicial foi determinada (A.O.A.C., 1995). Para os IPS-0,33 e IPS-0,74 foi determinada apenas a umidade, os teores de proteína, cinzas e lipídeos foram calculados a partir dos valores obtidos para o IPS-0,19. Os isolados protéicos de soja, com atividade de água 0,19 (IPS-0,19); 0,33 (IPS-0,33) e 0,74 (IPS-0,74), antes de serem estocados a 25 e 45°C, foram caracterizados quanto à sua solubilidade protéica, perfil eletroforético, perfil de textura, umidade espremível e microestrutura do gel.

### 4.2. Metodologia

#### 4.2.1. Isoterma de sorção

A isoterma de sorção foi obtida segundo método proposto por Labuza *et al.* (1985), onde amostras de IPS, com umidade inicial de 0,19g  $H_2O/100g$  de sólidos, foram colocadas em sistemas fechados contendo soluções saturadas de sais de  $LiCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Mg(NO_3)_2$ ,  $NaCl$  e  $BaCl_2$  durante 20 dias, a 25°C. Após o equilíbrio, as amostras foram pesadas. Os dados de umidade de equilíbrio das amostras foram analisados pelo modelo de GAB (Guggenheim - Anderson - de Boer), utilizando o programa Water Analyzer Series - Isotherm/BET/GAB, Versão 2.05p. As análises foram feitas em triplicata.

## **4.2.2. Caracterização dos IPSs**

### **4.2.2.1. Determinação de Umidade**

A umidade foi determinada segundo o método da AOAC (1995), no qual as amostras foram secas em estufa a 105<sup>o</sup>C até atingir peso constante. A determinação foi feita em triplicata.

### **4.2.2.2. Determinação de Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado segundo o método da AOAC (1995) onde as amostras foram incineradas a 550<sup>o</sup>C. A determinação foi feita em triplicata.

### **4.2.2.3. Determinação de Proteína Bruta**

Foi determinada segundo o método (semi-micro Kjeldahl) da AOAC (1995). A porcentagem de nitrogênio presente nas amostras foi quantificada e convertida a proteína bruta utilizando fator 6,25. A determinação foi feita em triplicata.

### **4.2.2.4. Determinação de Lipídeos Totais**

A porcentagem de lipídeos da amostra foi determinada pelo método Bligh e Dyer (1959). A determinação foi feita em triplicata.

### **4.2.2.5. Eletroforese em SDS-PAGE**

As proteínas solúveis dos isolados protéicos de soja foram analisadas, segundo método proposto por Arrese *et al.* (1991), por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente 8-25%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) pelo sistema *Phastsystem* da Pharmacia ®. Amostras contendo 300 mg de proteína foram dispersas em 4mL de água destilada e colocadas sob agitação por 1h, à temperatura ambiente. As soluções foram então centrifugadas por 20 min/1200 g a 21<sup>o</sup>C e filtradas. Em seguida, 0,5 mL de sobrenadante filtrado foi adicionado a 0,5 mL de tampão contendo 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 10%

glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol. As amostras foram aquecidas a 90°C por 3 minutos, resfriadas e então aplicadas em gel de eletroforese. Os géis foram corados e descorados segundo o método nº 200 do *PhastSystem* (Pharmacia-LKB Biotechnology Bromma, Sweden). Para identificação das frações protéicas utilizou-se padrão Pharmacia de baixo peso molecular: fosforilase b (94 kDa); albumina bovina (67 kDa); ovalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor tripsina (20 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). As amostras foram analisadas em densitômetro modelo Sharp JX 330, utilizando *software* Image Master (Pharmacia), obtendo-se a composição relativa das frações protéicas 7S e 11S.

#### 4.2.2.6. Solubilidade

A solubilidade do IPS foi determinada segundo método proposto por Morr *et al.* (1985). Amostras (10mg proteína/mL de solução) foram diluídas em NaCl 0,1M, pH 7,0 e mantidas sob agitação por 1 hora. As soluções protéicas foram centrifugadas a 21.000 g por 30 minutos a 4°C, filtradas em papel de filtro Whatman nº 2. Alíquotas de 5 mL do sobrenadante foram retiradas para determinação do conteúdo protéico pelo método Kjeldahl. A determinação foi feita em triplicata. A solubilidade foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Solubilidade protéica} = [ *A \text{ (mg/mL)} \times 50 \text{ mL} ] \div [ P(\text{mg}) \times S/100 ] \times 100$$

$$*A = *N\% \times 6,25$$

$$*N\% = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_{\text{Bco}}) \times N \times 0,014 \times 100}{5 \text{ mL (alíquota)}}$$

Onde:

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

N%= Porcentagem de nitrogênio protéico no sobrenadante

N = Normalidade do HCl

$V_{\text{HCl}}$  = Volume de HCl gasto na titulação da amostra

$V_{\text{Bco}}$  = Volume de HCl gasto na titulação do branco

P = Peso da amostra (mg)

S = Concentração de proteína na amostra (%)

#### **4.2.3. Preparação do Gel de IPS**

Os géis foram preparados segundo método proposto por Puppo *et al.* (1995), com algumas modificações: soluções protéicas 13%, com pH ajustado para 7,0, foram homogeneizadas em misturador magnético por dez minutos, depois centrifugadas por dez minutos a 1200g para a desaeração da solução e então transferidas para tubos de vidro vazado com rolha de borracha medindo 6 cm de altura e 2 cm de diâmetro interno. O fechamento dos tubos foi feito com rolha e vedados com filme plástico, os tubos foram então aquecidos em banho-maria a 90°C por 30 minutos, sendo depois resfriados rapidamente em banho a 15°C. As amostras foram armazenadas a 6°C por 24h, para então serem feitas as análises de textura.

#### **4.2.4. Análise do gel**

##### **4.2.4.1. Perfil de Textura (TPA)**

O perfil de textura do gel foi determinado segundo método proposto por Ju & Kilara (1998), em texturômetro modelo TA XT-2 (Stable Microsystems SMS). Blocos dos géis medindo 2,6 cm de diâmetro por 1,0 cm de altura foram cortados a 1cm da base do gel e então avaliados quanto ao seu perfil de textura. As análises foram feitas com amostra a 25°C. Na análise da textura os resultados são apresentados na forma gráfica e a integração realizada pelo software do equipamento. O procedimento adotado foi o de medida de força por compressão e os parâmetros avaliados foram: dureza, elasticidade e coesividade. Para a análise do perfil de textura dos géis foram feitas 5 repetições.

As condições de operação do aparelho foram:

- Probe cilíndrico, com 4 cm de diâmetro;
- Velocidade pré -teste de 3,0 mm/s;
- Velocidade pós-teste de 1,0 mm/s;
- Velocidade no gel 1,0 mm/s;
- Compressão 50%;
- Tempo de parada de 0,5 s;
- Força aplicada = 5 g.

#### 4.2.4.2. Umidade Espremível do gel

Foi determinada segundo método proposto por Jauregui *et al.* (1981), com algumas modificações. Pesou-se inicialmente um tubo de centrífuga de 50 mL com tampa, juntamente com duas folhas de papel de filtro secas. Nos papéis de filtro, previamente tarados, pesou-se 1 a 2g dos géis das amostras que foram acondicionadas em tubos de centrífuga de peso conhecido e depois centrifugados a 750g por 10 minutos a 5°C. Após centrifugação, as amostras foram cuidadosamente retiradas com espátula e o tubo/papel de filtro úmido foram pesados. A porcentagem de umidade espremível foi calculada a partir da diferença de peso do papel de filtro úmido e seco através da fórmula:

$$UE\% = \frac{Pf (g) - Pi (g)}{Pa (g)} \times 100$$

Onde:

UE% = porcentagem de umidade espremível do gel;

Pf = peso final do tubo da centrífuga + papel de filtro úmido;

Pi = peso inicial do tubo da centrífuga + papel de filtro seco;

Pa = peso da amostra em gramas

#### **4.2.4.3. Microestrutura do Gel**

As análises da microestrutura do gel foram feitas segundo método proposto por Ker & Toledo (1992) com algumas modificações. Amostras do gel foram imersas em fixador paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,25 por 24h. Foram, então, lavadas duas vezes em tampão fosfato, por 30 min cada e pós-fixadas com OsO<sub>4</sub> 1%, em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2, durante 1h. As amostras foram lavadas com água destilada por 30 min e em seguida desidratadas em seqüências de diluições de etanol, 30, 50, 70, 95 e 100% por três vezes de 15 min cada e depois secadas até o ponto crítico (CPD 030-Balzers). Após a secagem, as amostras foram montadas em suportes de alumínio, fixadas por fita prateada condutora e cobertas com ouro em evaporador (Sputter Coater Balzers-SCD 050). As amostras foram então observadas em microscópio eletrônico de varredura JSM-5800LV a 10kV.

#### **4.2.5. Experimento de estocagem**

Foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Davis *et al.* (1998). As amostras de isolado protéico de soja com diferentes Aa (0,19; 0,33 e 0,74) foram colocadas em embalagens herméticas e estocadas em duas condições de temperatura (25 e 45<sup>o</sup>C) por 210 dias.

Durante a estocagem foram retiradas amostras para análise em período de 15 ou 30 dias. Os isolados estocados a 25<sup>o</sup>C foram retirados a cada 30 dias e os estocados a 45<sup>o</sup>C, a cada 15 dias. Os isolados foram avaliados quanto a seu perfil eletroforético, solubilidade, perfil de textura, umidade espremível do gel e microestrutura do gel. O esquema do experimento de estocagem está apresentado na forma de fluxograma no Anexo 1.

#### **4.2.6. Análise Estatística**

Os resultados obtidos para os isolados IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74, no seu estado inicial, foram avaliados por Análise de Variância e Teste de Tukey para verificar as médias estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System).

#### **4.2.7. Modelo Cinético**

Os resultados obtidos durante o armazenamento, em cada uma das condições de estocagem (Aa X temperatura), foram analisados segundo modelo de ordem zero. A significância dos modelos foi determinada pelos valores dos coeficientes de correlação  $R^2$ . Para esta avaliação utilizou-se apenas os resultados obtidos nos primeiros 60 dias de estocagem a 25°C e nos primeiros 30 dias para os isolados estocados a 45°C, onde observou-se uma maior variação nas características das amostras (Aguilera & Ballivian, 1987).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1. Obtenção e caracterização inicial dos isolados protéicos de soja com diferentes atividades de água

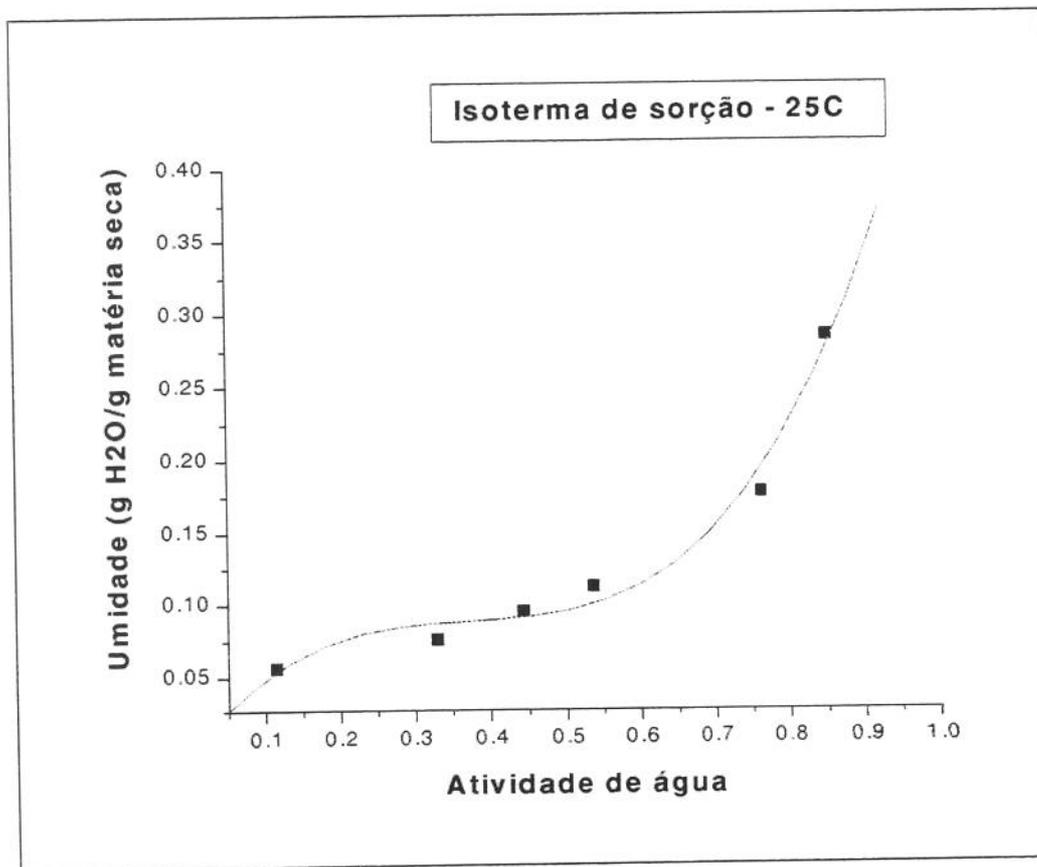
O IPS estudado apresentou atividade de água inicial de 0,19. Amostras do IPS foram então acondicionadas em sistemas fechados contendo soluções saturadas de  $MgCl_2$  e  $NaCl$ , com umidade relativa de 33 e 74% respectivamente. As amostras atingiram o equilíbrio após 20 dias de armazenamento a 25°C. Os IPSs com diferentes atividades de água foram então analisados quanto à solubilidade, perfil eletroforético, perfil de textura e microestrutura do gel antes do início do experimento de estocagem.

#### 5.1.1. Isoterma de sorção

Isotermas de sorção são úteis na determinação das condições de estocagem, secagem e na seleção de embalagem de diversos produtos, por fornecerem informações importantes das interações da água com o alimento, além do comportamento das proteínas em diferentes sistemas alimentares (Kinsella & Fox, 1986). Segundo Brunauer *et al.* (1938; *apud* Kinsella & Fox, 1986) as isotermas de sorção são divididas arbitrariamente em três regiões. Na região I, com  $A_a$  entre 0-0,25, a água presente no sistema, que varia de 0,07 a 0,11g de  $H_2O/g$  de sólidos, é fortemente ligada aos grupos hidrofílicos, grupos carregados e grupos polares, apresentando uma entalpia de vaporização consideravelmente mais alta do que a da água pura. Esta água não está disponível para reações químicas ou de plastificação e não é congelável a - 40°C. Entre  $A_a$  0,25 e 0,70 a sorção da água é gradual e linear, alcançando valores de umidade entre 0,18 e 0,25 g por 1 grama de sólidos. Esta região inclui moléculas de água que formaram inicialmente monocamada, mas principalmente a água que através da condensação, forma progressivamente camadas adicionais. A água na região II

apresenta propriedades intermediárias entre as regiões I e III, refletindo a transição gradual de suas propriedades. Na região III, com Aa entre 0,75 e 1,0, a absorção de água se acelera atingindo valores de umidade entre 0,18 e 0,25 g de água por grama de sólidos. Isto representa água de multicamada, pobremente associada a proteínas e contidas fisicamente em capilares ou espaços livres. A transição brusca na isoterma representa a solvatação e a dissolução gradual dos componentes. Segundo Fennema (1996), processos de dissolução do soluto começam a ocorrer a Aa em torno de 0,25, a água poderá atuar como agente plastificante, promovendo um inchaço da matriz sólida. Segundo o autor, a água absorvida em regiões com maior Aa (0,75 a 1,0) encontra-se fracamente ligada, possibilitando uma maior mobilidade molecular. Esta água exibe uma entalpia de vaporização igual à da água pura, é congelável e está disponível como solvente permitindo que reações químicas e crescimento microbiano ocorram rapidamente.

A isoterma de sorção do IPS, mostrada na Figura 1, mostrou boa correlação com o modelo de GAB (Guggenheim - Anderson - de Boer) ( $p < 0,05$ ). Na isoterma observou-se um aumento lento da umidade de equilíbrio das amostras com o aumento da Aa entre 0,1 e 0,53, atingindo valores de 0,05 a 0,11 g de H<sub>2</sub>O por 1g de matéria seca. Após esta faixa de Aa observou-se um rápido aumento da umidade de equilíbrio, atingindo 0,28 g de água por 1 g de matéria seca em Aa 0,85. O modelo de sorção seguiu o exposto acima, embora as umidades de equilíbrio observadas para o IPS, estejam abaixo dos valores indicados pelos autores (Kinsella & Fox, 1986).



**FIGURA 1.** Curva da isoterma de sorção do isolado protéico de soja a 25°C (g H<sub>2</sub>O / g matéria seca X atividade de água).

### 5.1.2. Composição centesimal

A composição centesimal do isolado protéico inicial, IPS-0,19, foi determinada. Para os IPS-0,33 e IPS-0,74 determinou-se apenas a umidade (Tabela 5). Os isolados protéicos devem conter uma quantidade de proteína igual ou superior a 90% (Snyder & Kwom, 1987), no entanto, o IPS-0,19 apresentou porcentagem de proteína abaixo desse valor. Arrese *et al.* (1991) encontraram valores na faixa de 83,0 a 90,0% de proteína em isolados protéicos de soja comerciais. Para o cálculo da proteína utilizou-se fator de conversão 6,25 por ser bastante utilizado na indústria e pela maioria dos pesquisadores, embora seja recomendado utilizar fator 5,71 para as proteínas de soja (Smith & Circle, 1972).

A umidade dos IPS estudados variou de 5,4 (IPS-0,19) a 14,3% (IPS-0,74), observou-se que quanto maior a Aa dos isolados, maior a umidade apresentada pela amostra. Os valores de umidade estão de acordo com os valores obtidos pela isoterma de sorção (Figura 1).

Os valores de cinzas e lipídeos estão de acordo com os encontrados na literatura (Henn & Netto, 1998; Smith & Circle, 1972; Wolf & Cowan, 1975).

**TABELA 5.** Composição centesimal aproximada do IPS-0,19 e a umidade dos IPS-0,33 e IPS-0,74.

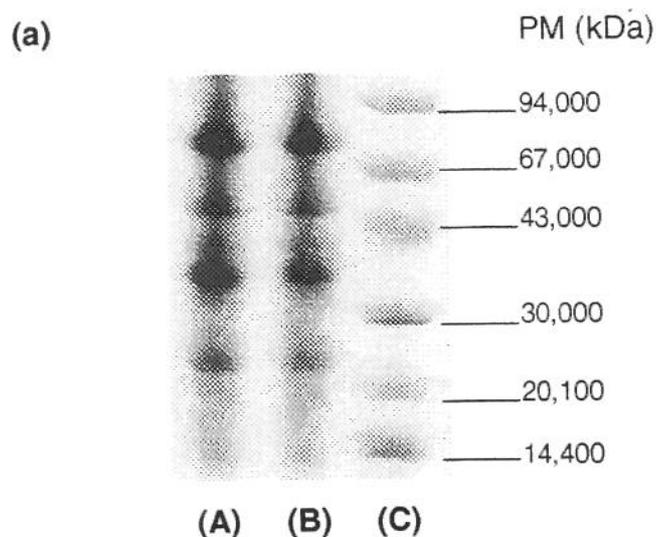
Amostras (%) <sup>1</sup>	Proteína (%) <sup>1 2</sup>	Umidade (%)	Cinzas (%) <sup>1</sup>	Lipídeos
IPS-0,19 <sup>3</sup>	81 ± 0.57	5,4 ± 0.01	3,5 ± 0.08	3,1 ± 0.27
IPS-0,33 <sup>3</sup>	-	6,7 ± 0.05	-	-
IPS-0,74 <sup>3</sup>	-	14,3 ± 0.03	-	-

(<sup>1</sup> Valores expressos em base seca; <sup>2</sup> Nx 6,25; <sup>3</sup> Valores médios de três determinações ± desvio padrão)

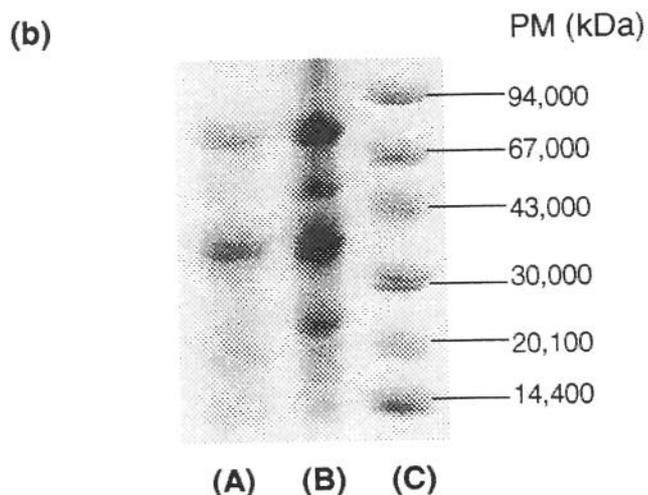
### 5.1.3. Perfil eletroforético dos isolados protéicos de soja

A Figura 2 mostra o perfil eletroforético das proteínas solúveis em água destilada dos IPSs equilibrados a diferentes atividades de água. A composição relativa das frações está apresentada na Tabela 6. Em relação à porcentagem das frações 7S e 11S, os IPS-0,19 e IPS-0,33 apresentaram resultados semelhantes (Tabela 6). No entanto, no IPS-0,74 pode-se observar o desaparecimento completo da subunidade  $\beta$ -7S e redução do polipeptídeo básico da fração 11S (pB-11S) quando comparado aos dos outros isolados. Isto pode estar relacionado com reações de associação com formação de agregados insolúveis (Arrese *et al.*, 1991). Reações de associação normalmente referem-se a mudanças no nível molecular, caracterizadas por fracas interações de sítios específicos e dependendo das condições, estas associações podem ser reversíveis (Hermansson, 1978).

Liu *et al.* (1991) observaram agregação protéica em soroalbumina bovina liofilizada. A soroalbumina foi incubada a 96% de umidade relativa a 37°C e após 24h, 69% da proteína encontrava-se agregada. Segundo os autores, esta agregação induzida pela umidade, pode ter sido resultado de formação de ligações S-S intermoleculares via reações de troca tiol-dissulfeto. Uma maior hidratação da proteína resulta em maior mobilidade molecular, que pode facilitar reações de troca tiol-dissulfeto.



**Gel (a):** coluna (A) - frações solúveis do IPS-0,33; Coluna (B) - frações solúveis do IPS-0,19; coluna (C) - marcadores (fosforilase b - 94,000; albumina - 67,000; ovoalbumina - 43,000; anidrase carbônica - 30,000; inibidor de tripsina - 20,100;  $\alpha$ -lactoalbumina - 14,400).



**Gel (b):** coluna (A) - frações solúveis do IPS-0,74; Coluna (B) - frações solúveis do IPS-0,19; coluna (C) - marcadores (fosforilase b - 94,000; albumina - 67,000; ovoalbumina - 43,000; anidrase carbônica - 30,000; inibidor de tripsina - 20,100;  $\alpha$ -lactoalbumina - 14,400).

**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida, em gradiente 8-25%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), dos isolados IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74, pelo sistema *Phastsystem* da Pharmacia®.

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

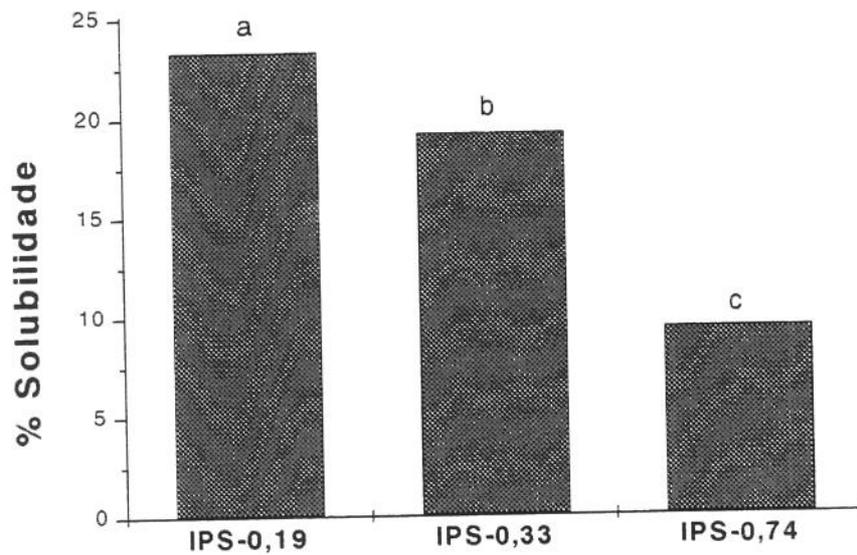
**TABELA 6.** Composição relativa das frações 7S ( $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ ) e 11S (polipeptídeos ácido e básico), presentes na fração solúvel dos IPS (Aa 0,19; 0,33 e 0,74) em água destilada, analisados por densitometria<sup>1</sup>.

Amostra	7S			11S	
	$\alpha'$	$\alpha$	$\beta$	Ácido	Básico
IPS-0,19	22.0	12.0	13.0	29.0	45.0
IPS-0,33	23.0	16.0	14.0	26.0	45.0
IPS-0,74	26.0	9.0	0.0	50.0	14.0

<sup>1</sup>Os valores correspondem à porcentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e dos polipeptídeos ácido e básico em relação à área total das frações 7S e 11S, respectivamente.

#### 5.1.4. Solubilidade

A solubilidade dos IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74 está apresentada na Figura 3. A solubilidade diminuiu com o aumento da atividade de água dos IPSs, apresentando os seguintes valores: 23,3%(IPS-0,19), 19,2%(IPS-0,33) e 9,4%(IPS-0,74). Durante o período em que os isolados foram equilibrados, 20 dias, podem ter ocorrido modificações na estrutura da proteína, possivelmente devido a reações de agregação, que resultaram na alteração de sua solubilidade. Segundo Kinsella & Fox (1986), além de afetar as reações químicas, a atividade de água de proteínas em pó pode também afetar sua estabilidade. Desnaturação e insolubilização podem ocorrer durante a incubação pois existem limites críticos de umidade que permitem mudanças conformacionais e subsequente formação de interações intra e interpeptídicas via ligações de Van der Waals, hidrofóbicas e oxidação do grupo tiol. A baixa solubilidade observada para o IPS-0,74 pode estar relacionada com reações de polimerização protéica que levaram à diminuição das subunidades  $\alpha$ -7S e  $\beta$ -11S e o desaparecimento da subunidade  $\beta$ -7S, conforme observado no perfil eletroforético (Tabela 6). Rector *et al.* (1991) também observaram que reações de polimerização protéica resultaram na diminuição da solubilidade de proteínas do soro do leite.



**FIGURA 3.** Solubilidade das amostras de isolados protéicos de soja equilibrados a diferentes atividades de água (IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74). Colunas identificadas por letras diferentes indicam que estas amostras diferem significativamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

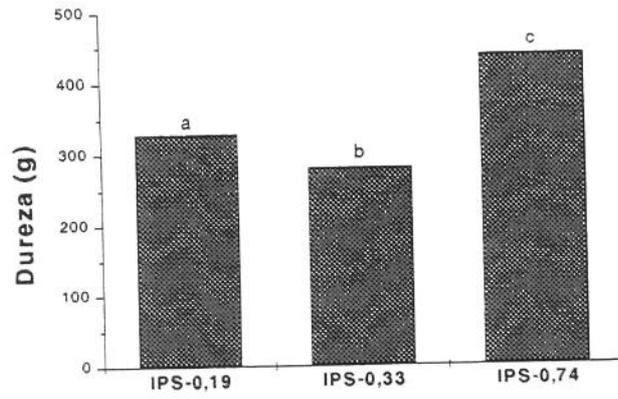
## 5.2. Caracterização do gel

### 5.2.1. Perfil de textura dos géis (TPA)

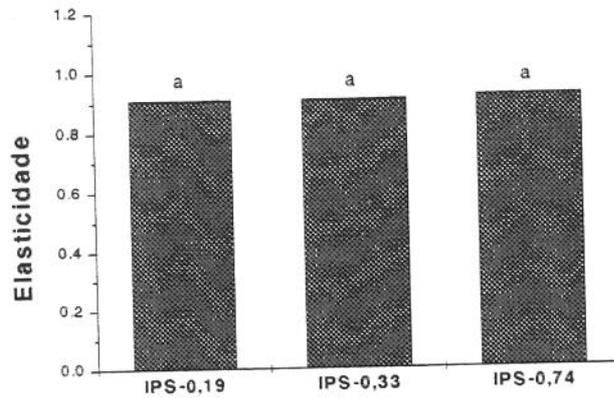
No estudo do perfil de textura foram determinados os atributos de dureza, elasticidade e coesividade. Em relação à dureza, os géis (Figura 4a) dos isolados mostraram-se diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). A dureza do gel do IPS-0,74 foi 25 e 36% maior em relação aos IPS-0,19 e IPS-0,33, respectivamente. O parâmetro de textura “dureza” foi o que apresentou maior coeficiente de variação (Tabela 7), principalmente as medidas obtidas para o gel IPS-0,74. Deve-se ressaltar que antes do aquecimento, as dispersões protéicas apresentavam-se muito viscosas, dificultando sua manipulação. Outra dificuldade encontrada foi que o IPS-0,74 apresentou aspecto arenoso e não dispersava totalmente na água, dividindo-se em duas fases distintas após a centrifugação, sendo necessário homogeneizar novamente a solução antes do preenchimento dos tubos utilizados para a formação do gel, o que provavelmente contribuiu para o aparecimento das bolhas no gel.

Analisando a Figura 4b, pode-se observar que as diferenças das amostras também não tiveram grande impacto na elasticidade dos géis, que apresentaram valores bastante próximos (Tabela 7), não diferindo estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

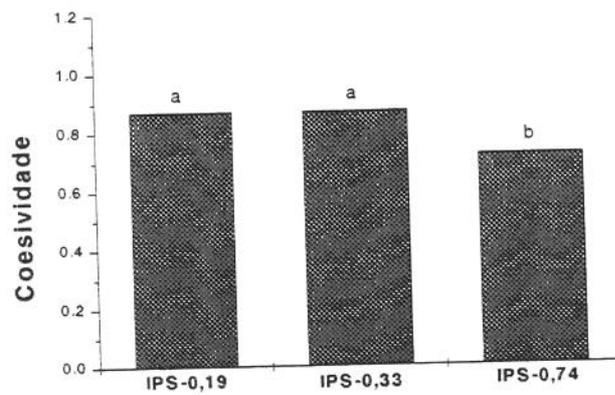
A coesividade do gel do IPS-0,74 foi 17% menor do que a apresentada pelos IPS-0,19 (0,88) e IPS-0,33 (0,88), que mostraram-se estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ) (Figura 4c). A baixa coesividade do gel do IPS-0,74 pode estar relacionada com a diminuição da fração 11S neste isolado, pois segundo Kang *et al.* (1991) esta fração é a responsável pela coesividade dos géis de isolados protéicos de soja. Provavelmente a redução desta fração limitou a participação dos grupos sulfidríla, devido ao fenômeno de agregação durante a geleificação.



(a)



(b)



(c)

**FIGURA 4.** Características de textura de géis obtidos de isolados protéicos de soja equilibrados a diferentes atividades de água (IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74): (a) dureza, (b) elasticidade e (c) coesividade. Colunas de um mesmo gráfico seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo Kang *et al.* (1991), a dureza e a elasticidade dos géis de IPS dependem de ligações S-S. No entanto, Furukawa e Otha (1982) observaram que em géis de IPS, a dureza e a coesividade do gel diminuíram com a adição de hidrocloreto L-cisteína (CySH), que tem a habilidade de quebrar ligações S-S intermoleculares. No entanto, a elasticidade do gel apresentou pouca variação. Os autores sugerem que a dureza e a coesividade são fortemente influenciadas pelo número de ligações S-S e que a elasticidade não depende basicamente destas ligações. Okamoto *et al.* (1973) também observaram, em géis de gelatina, que ligações S-S tem participação limitada na elasticidade do gel.

**TABELA 7.** Médias e coeficientes de variação (C.V.) dos parâmetros de textura dureza, elasticidade e coesividade, de géis de IPS equilibrados em diferentes atividades de água (Aa 0,19; 0,33 e 0,74).

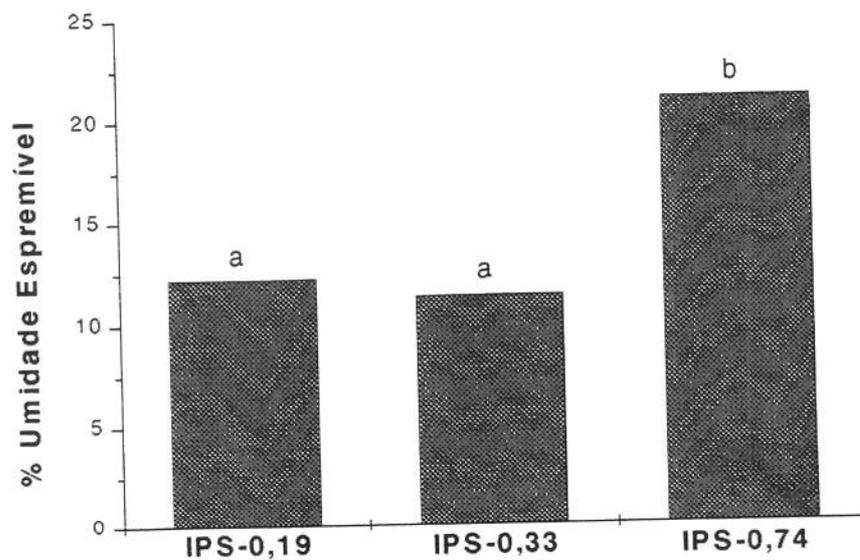
	Dureza (g)			Elasticid.			Coesivid.		
	(IPS-0,19)	(IPS-0,33)	(IPS-0,74)	(IPS-0,19)	(IPS-0,33)	(IPS-0,74)	(IPS-0,19)	(IPS-0,33)	(IPS-0,74)
Méd.	328,6	280,4	437,1	0,91	0,91	0,92	0,87	0,87	0,72
C.V.	2,09	6,79	8,11	0,54	1,42	1,41	1,30	1,24	0,60

### 5.2.2. Umidade espremível dos géis

A umidade espremível dos géis (UE%) dos IPSs em estudo está apresentada na Figura 5. Os IPS-0,19 e IPS-0,33 apresentaram valores semelhantes ( $p < 0,05$ ), 12,2 (C.V.=0,32) e 11,3% (C.V.=11,5), respectivamente, enquanto que a UE% do IPS-0,74, 21% (C.V.=0,97), mostrou-se significativamente maior ( $p < 0,05$ ). Segundo Jauregui *et al.* (1981), quanto maior o índice de UE%, menor a capacidade do gel de reter água, já que este índice é medido a partir da quantidade de água liberada pelo gel após centrifugação.

Arrese *et al.* (1991) avaliaram a capacidade de retenção de água de diferentes IPSs. Estes autores observaram que IPS parcialmente desnaturados ( $\Delta H_T = 0,085-0,65$  cal/g) apresentaram maior capacidade de retenção de água

(CRA) que amostras com alta concentração de proteínas nativas ou proteínas completamente desnaturadas ( $\Delta H_T = 0$  cal/g). Os autores sugerem que um mínimo de desnaturação protéica com desdobramento da cadeia polipeptídica é necessário para a formação de uma estrutura capaz de reter água ou outros componentes e que em valores extremos de solubilidade e desnaturação podem levar a formação de géis protéicos com baixa CRA. No presente estudo, a baixa solubilidade do IPS-0,74 (Figura 3) pode ter resultado em um gel com alta porcentagem de UE% (Figura 5), provavelmente devido a ocorrência de reações de agregação protéica.



**FIGURA 5.** Umidade espremível dos géis de isolados protéicos de soja equilibrados a diferentes atividades de água (IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74). Colunas identificadas por letras diferentes indicam que estas amostras diferem significativamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.3. Microestrutura do gel inicial

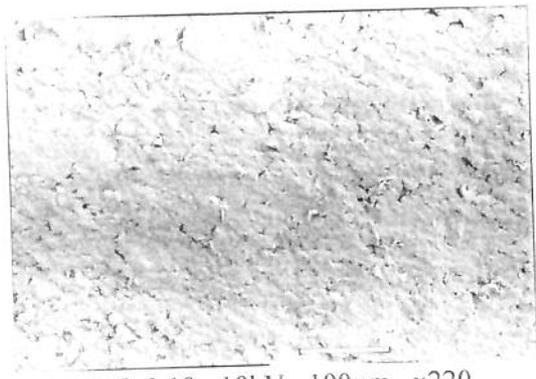
Para a caracterização da microestrutura do gel, diferentes técnicas são necessárias, tanto para obtenção de detalhes como para eliminação de possíveis artefatos (Hermansson & Langton, 1992). Géis protéicos, normalmente, contém mais de 90% de água. Para a observação da estrutura do gel através do microscópio, esta água deve ser solidificada ou removida durante a preparação sem modificar a estrutura original do gel. (Hermansson, 1994). A água pode ser solidificada através de congelamento rápido sem formação de cristais de gelo, que é um artefato comum durante o congelamento. Para microscopia eletrônica de varredura (SEM), um método alternativo consiste em fortalecer quimicamente o gel e substituir a água por solventes. Este tipo de microscopia é indicado para géis não transparentes. A técnica mais comum de preparação para SEM é através da fixação química, desidratação e ponto-crítico de secagem (Hermansson, 1994).

As micrografias obtidas por MEV dos géis dos IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74 são mostradas na Figura 6. A análise das imagens mostrou semelhanças entre os géis obtidos a partir dos IPS-0,19 (Figuras 6a e 6b) e IPS-0,33 (Figuras 6c e 6d), com estrutura de gel bastante coesa e uniforme, porém o gel IPS-0,19 (Figura 6b) apresentou aparência mais floclada. O gel do IPS-0,74 (Figuras 6e e 6f) apresentou características bastante diferentes do gel dos outros isolados, com formação de massas poliédricas de diversos tamanhos, aglomerados de forma aleatória demonstrando um tipo de reestruturação, sem aparentemente haver formação de rede. Estrutura similar foi observada por Hermansson (1986) em gel de IPS comercial, obtido a partir do aquecimento de solução protéica 20% com cloreto de sódio 0,2M, pH 7,0, a 85°C. Este IPS apresentava baixa solubilidade em presença de sal na faixa de pH 2-9. Imagens obtidas por MEV exibiram estruturas agregadas de glóbulos intumescidos, bastante semelhante às estruturas globulares apresentadas pelo gel do IPS-0,74 (Figuras 6e e 6f). Segundo a autora este tipo de estrutura de gel pode estar relacionada com a baixa solubilidade do IPS. O gel do IPS-0,74, que apresentou este mesmo

tipo de estrutura, também apresentou baixa solubilidade, que é fator determinante em diversas propriedades funcionais, especialmente no processo de geleificação (Snyder & Kwon, 1987).

A agregação protéica ocorrida durante o período de equilíbrio no IPS-0,74 pode ter alterado sua funcionalidade. Segundo Aguilera & Stanley (1990), as características de textura são determinadas pela organização estrutural dos componentes do alimento e alterações nessa organização são refletidas em mudanças na textura. Comparando as micrografias do gel do IPS-0,74 (Figuras 6e e 6f) com os dos outros IPSs (Figuras 6a-6d) pode-se perceber que o gel do IPS-0,74 aparentemente não formou estrutura de rede de gel, seus componentes encontram-se apenas agregados, esta característica da microestrutura pode estar relacionada com a baixa coesividade e capacidade de retenção de água do gel do IPS-0,74. Segundo Hermansson (1994) estruturas grosseiramente agregadas, semelhantes ao gel do IPS-0,74, normalmente apresentam CRA menor do que géis com estrutura de rede mais coesa.

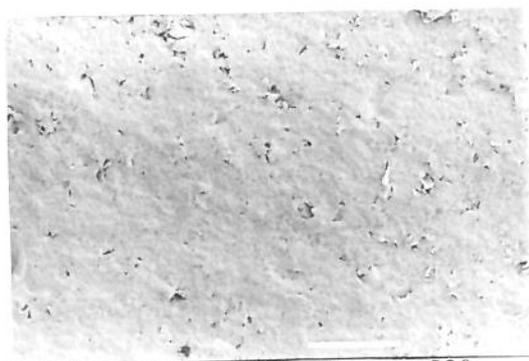
**FIGURA 6.** Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), dos géis de IPS com diferentes atividades de água (0,19; 0,33 e 0,74): (a) IPS-0,19, aumento de 220 vezes, (b) IPS-0,19, aumento de 3000 vezes, (c) IPS-0,33, aumento de 220 vezes, (d) IPS-0,33, aumento de 3000 vezes, (e) IPS-0,74, aumento de 220 vezes e (f) IPS-0,74, aumento de 3000 vezes.



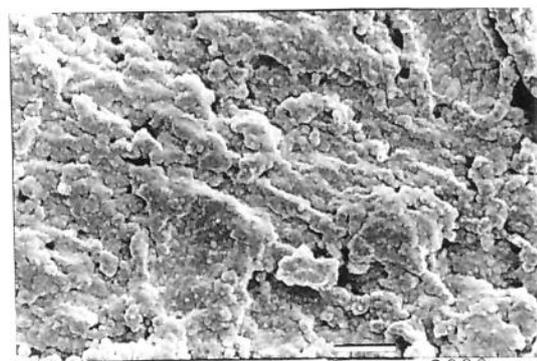
(a) IPS-0,19 10kV 100 $\mu$ m x220



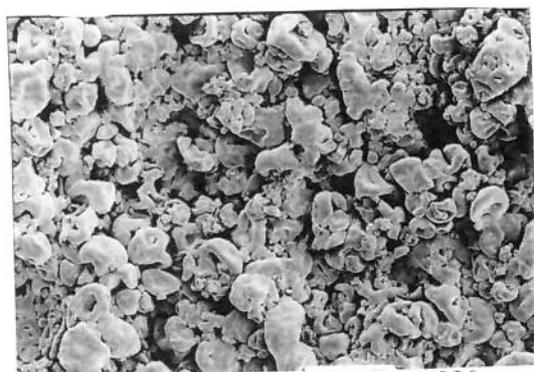
(b) IPS-0,19 10kV 5 $\mu$ m x3000



(c) IPS-0,33 10kV 100 $\mu$ m x220



(d) IPS-0,33 10kV 5 $\mu$ m x3000



(e) IPS-0,74 10kV 100 $\mu$ m x220



(f) IPS-0,74 10kV 5 $\mu$ m x3000

### 5.3. Caracterização dos IPSs durante o armazenamento

#### 5.3.1. Perfil eletroforético dos IPSs durante o armazenamento

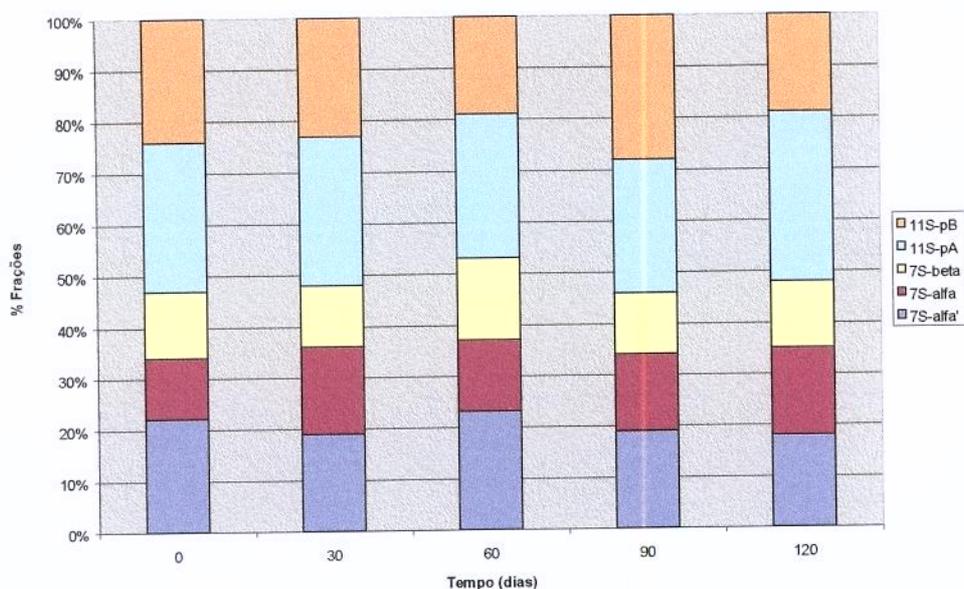
A composição relativa das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S e dos polipeptídeos ácidos (pA) e básicos (pB) da fração 11S, presentes na fração solúvel dos IPS-0,19 (Figuras 7a e 7b), IPS-0,33 (Figuras 8a e 8b) e IPS-0,74 (Figuras 9a e 9b) está apresentada nas Figuras 7 a 9.

Observou-se pequenas variações na composição relativa das frações 7S e 11S na fração solúvel dos IPS-0,19 (Figura 7a e 7b) e IPS-0,33 (Figura 8a e 8b), no decorrer da estocagem a 25 e 45°C. O IPS-0,74 apresentou perfil diferenciado desde o início da estocagem (Tabela 6), com a completa ausência da fração  $\beta$ -7S. O perfil deste isolado não se alterou durante a estocagem a 25°C (Figura 9a). No entanto, após 90 dias de estocagem a 45°C, apenas o polipeptídeo ácido da fração 11S permaneceu solúvel em água (Figura 9b). Durante a estocagem podem ter ocorrido reações de polimerização protéica com a formação de agregados insolúveis. Rector *et al.* (1991) também observaram reações de polimerização protéica durante a estocagem de proteínas do soro do leite. Os autores observaram que após 7 dias de estocagem a 80°C, a concentração de monômeros de  $\beta$ -lactoglobulina diminuiu de 60-64% para 33,3% e após 1 ano de estocagem a 25°C, 18% de  $\beta$ -lactoglobulina monomérica foi convertida em moléculas de peso molecular maior. Segundo os autores esta polimerização não envolveu ligações dissulfídicas cruzadas.

Liu *et al.* (1991), analisaram o processo de agregação protéica da soroalbumina bovina induzida pela umidade (30%) e observaram que após 24h de incubação da proteína a 37°C, 22°C e 4°C, ocorreu 97%, 56% e 12% de agregação protéica, respectivamente.

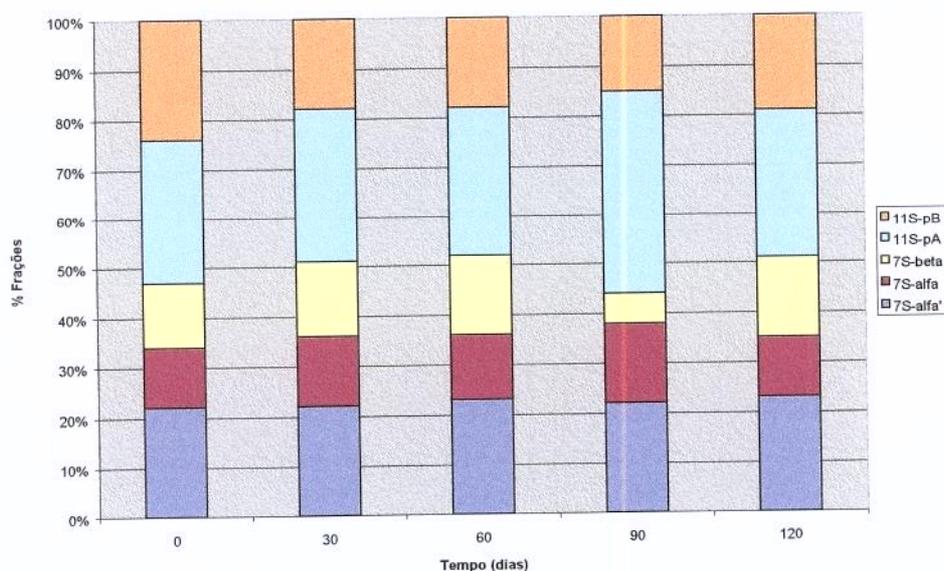
Durante o processamento e estocagem de alimentos podem ocorrer reações de desnaturação protéica induzidas pelo calor, com modificação das propriedades funcionais das proteínas (Damodaram, 1996). O aquecimento causa grau variado de desnaturação, com dissociação e desenrolamento parcial ou total das moléculas de proteína, bem como a formação de agregados, o que pode resultar numa diminuição da solubilidade (Kinsella, 1979). Arrese *et al.* (1991), que realizaram estudo com 19 IPS comerciais, observaram que quanto maior o grau de desnaturação dos IPSs, menor a proporção de subunidade  $\beta$  da fração 7S em relação à composição relativa das proteínas totais solúveis dos IPS. A proporção de polipeptídeos básicos da porção solúvel da fração 11S (pB-11S) também foi menor em IPS com alto grau de desnaturação. Com base nestes resultados os autores sugerem que as subunidades B-11S e  $\beta$ -7S de IPSs completamente desnaturados podem formar agregados insolúveis em água. No entanto, Hermansson (1978) sugere que reações de associação-dissociação podem ocorrer sem necessariamente haver desnaturação. Contudo a dissociação da estrutura quaternária em subunidades está freqüentemente associada a reações de desnaturação. A desnaturação da proteína por aquecimento expõe seus grupos hidrofóbicos, os quais subseqüentemente interagem entre si, causando agregação e diminuição da solubilidade. Trocas dissulfídicas internas podem também estar envolvidas em agregações termicamente induzidas em proteínas (Morr, 1990).

IPS-0,19/25C



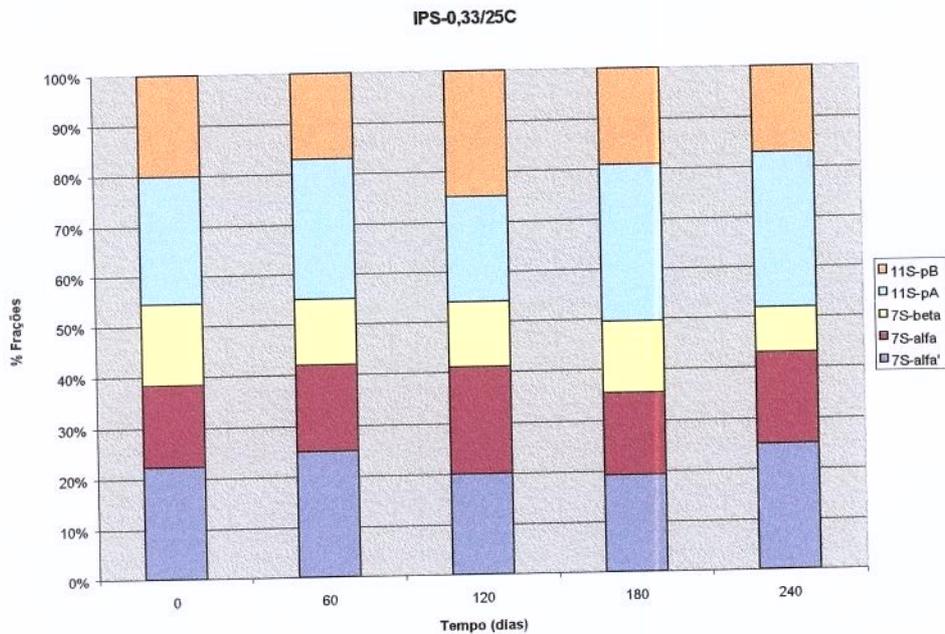
(a)

IPS-0,19/45C

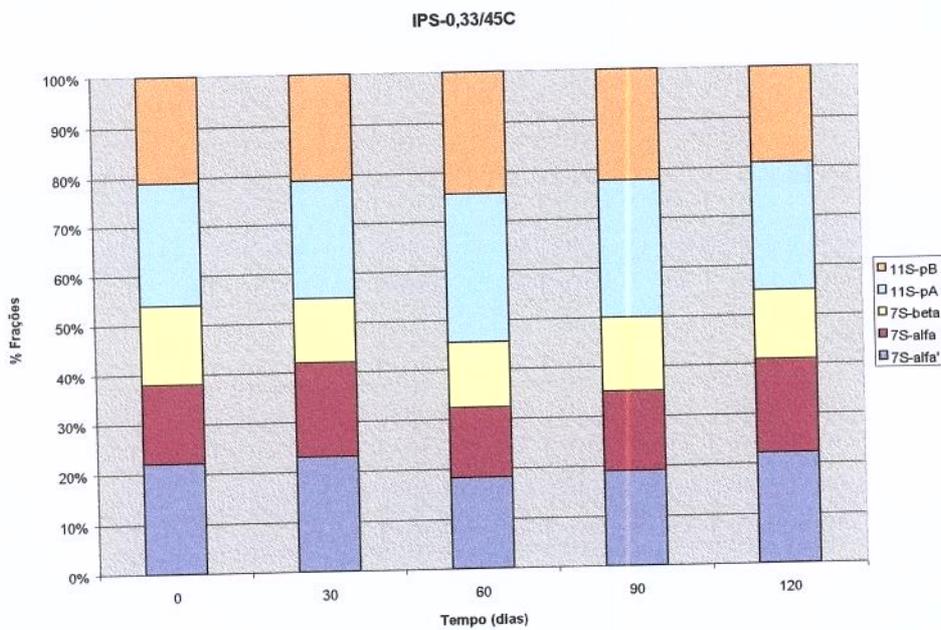


(b)

**FIGURA 7.** Composição relativa das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) da fração 11S, presentes na fração solúvel do IPS-0,19, extraídos com água destilada. Os valores representam a porcentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) em relação à área total das frações 7S e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

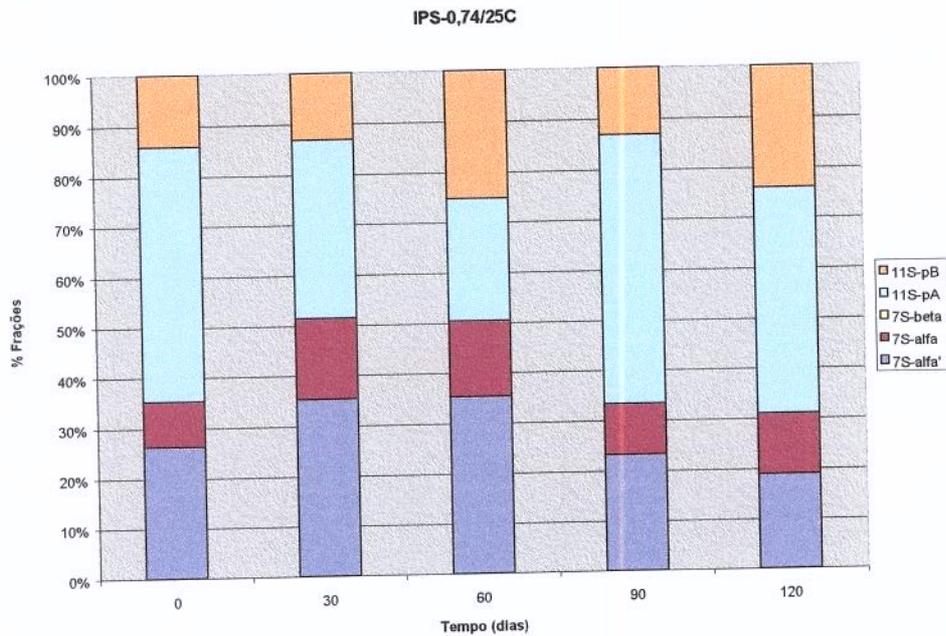


(a)

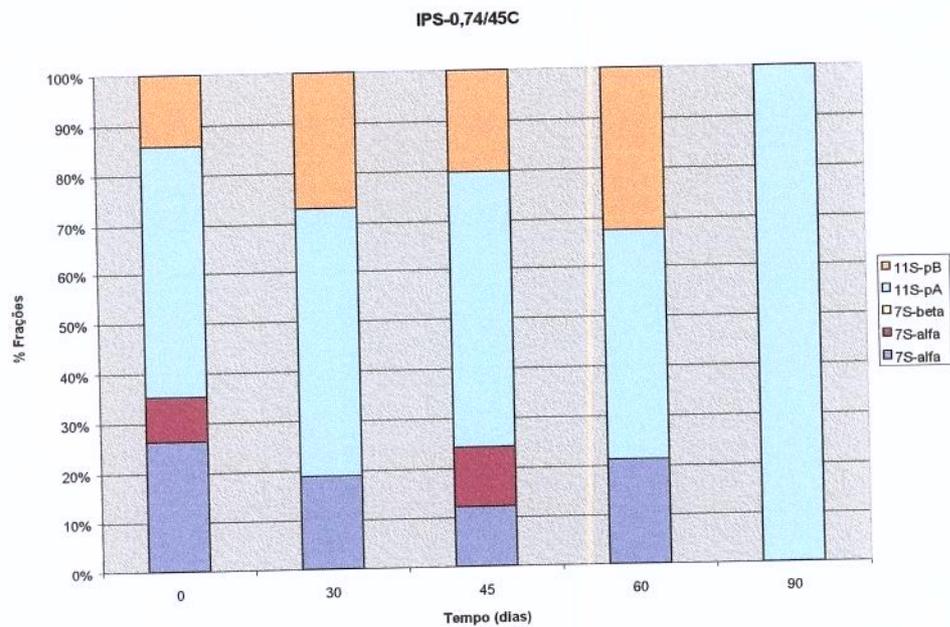


(b)

**FIGURA 8.** Composição relativa das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) da fração 11S, presentes na fração solúvel do IPS-0,33, extraídos com água destilada. Os valores representam a porcentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) em relação à área total das frações 7S e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.



(a)



(b)

**FIGURA 9.** Composição relativa das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) da fração 11S, presentes na fração solúvel do IPS-0,74, extraídos com água destilada. Os valores representam a porcentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e dos polipeptídeos ácido (pA) e básico (pB) em relação à área total das frações 7S e 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

### 5.3.2. Solubilidade dos IPSs durante o armazenamento

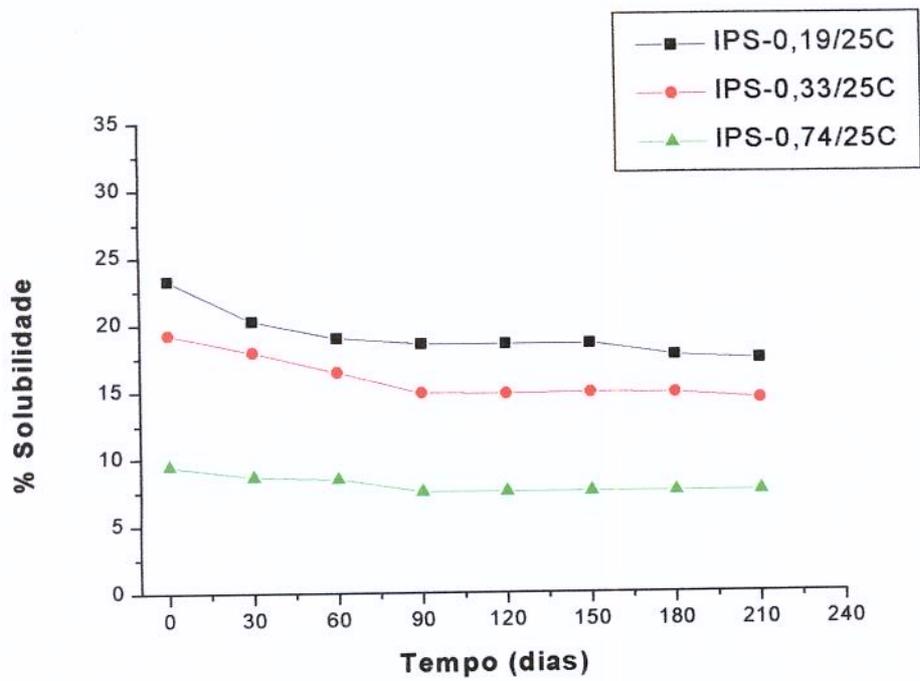
A solubilidade inicial dos isolados IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74 foi 23,3, 19,2 e 9,4%, respectivamente. Durante o armazenamento ocorreu diminuição da solubilidade dos isolados estocados a 25 e 45°C (Figuras 10a e 10b). Os isolados submetidos à maior temperatura de estocagem apresentaram a maior redução da solubilidade e quanto maior a atividade de água, maior foi esta redução. A redução da solubilidade dos isolados estocados a 25°C ocorreu de forma gradual e após 210 dias, a solubilidade teve uma redução de 20 a 25,7% para os isolados IPS-0,74 e IPS-0,19, respectivamente. Nas amostras estocadas a 45°C esta redução foi mais acentuada nos 30 primeiros dias de estocagem, 37,5% para o IPS-0,19 e 38% para o IPS-0,74, apresentando pequena variação após este período.

Observa-se na Figura 10a que a velocidade da perda de solubilidade durante o tempo de estocagem foi menor para o IPS-0,74 que para os demais isolados. Deve-se ressaltar que a perda da solubilidade já havia ocorrido no período de equilíbrio para obtenção das amostras com diferentes  $A_w$  e possivelmente as reações de agregação, que geralmente são a causa da perda de solubilidade, já haviam ocorrido antes do início da estocagem. Reações de polimerização protéica podem ocorrer durante a estocagem, causando uma diminuição da solubilidade da proteína (Rector *et al*, 1991).

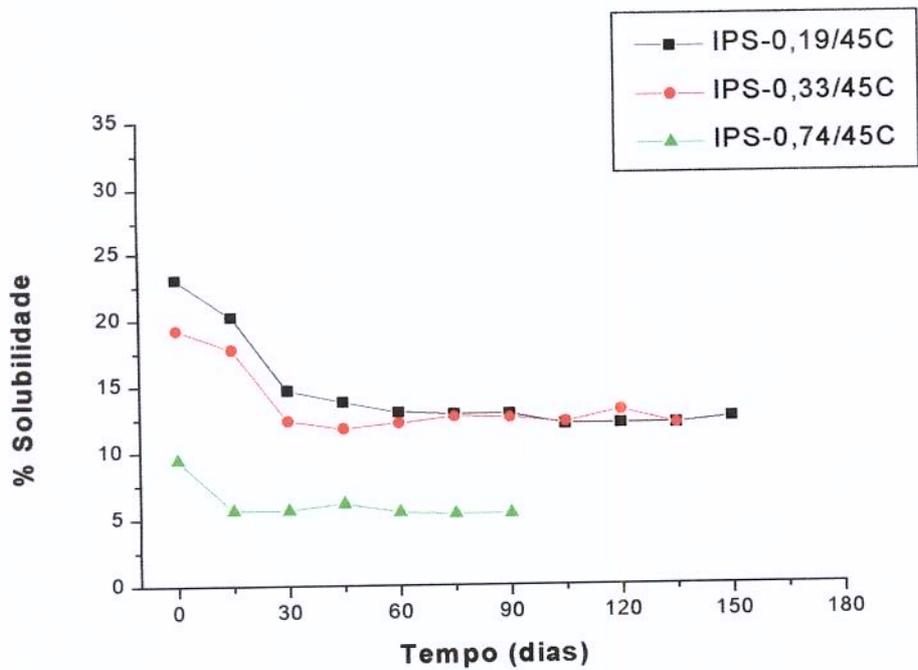
Nas Figuras 11a e 11b estão apresentados os gráficos com os 90 dias iniciais de estocagem a 25°C e 45 dias de estocagem a 45°C, respectivamente, quando foram observadas as maiores variações de solubilidade. Observa-se que a cinética da perda de solubilidade obedeceu um modelo de reação pseudo-ordem zero, onde o ângulo da reta corresponde à constante de velocidade da reação. Na Figura 11b pode-se observar que a constante de velocidade de reação para o IPS-0,19 a 45°C é 4 vezes superior à constante a 25°C.

A solubilidade, em algumas condições, fornece uma boa indicação de desnaturação protéica. Isto se deve ao fato de que a solubilidade é, provavelmente, a medida mais prática de desnaturação-agregação da proteína e também porque proteínas que apresentam-se inicialmente no estado desnaturado, parcialmente agregado, mostram freqüentemente um decréscimo de solubilidade (Cheftel *et al.*, 1989). Comparando a solubilidade com o perfil eletroforético dos isolados observa-se que o isolado IPS-0,74 que apresentou a menor taxa de solubilidade, 9,3%, também apresentou redução ou desaparecimento de componentes das frações 7S e/ou 11S (Figura 9). Os resultados sugerem que, neste caso, a baixa solubilidade do isolado IPS-0,74 estaria relacionada com o grau de desnaturação protéica, uma vez que quanto mais desnaturada a proteína, maior sua tendência a formação de agregados insolúveis (Arrese *et al.*, 1991).

Li-Chan (1983) observou um decréscimo de 14% da solubilidade de concentrado protéico de soro após ser estocado por 42 dias a 37°C. Segundo o autor o decréscimo da solubilidade durante a estocagem ocorre devido às mudanças na estrutura protéica seguida de agregação, entretanto a reação de Maillard pode também ter contribuído para esta redução, assim como no presente trabalho pois a reação de Maillard é importante via de deterioração na estocagem do IPS (Davies *et al.*, 1998).

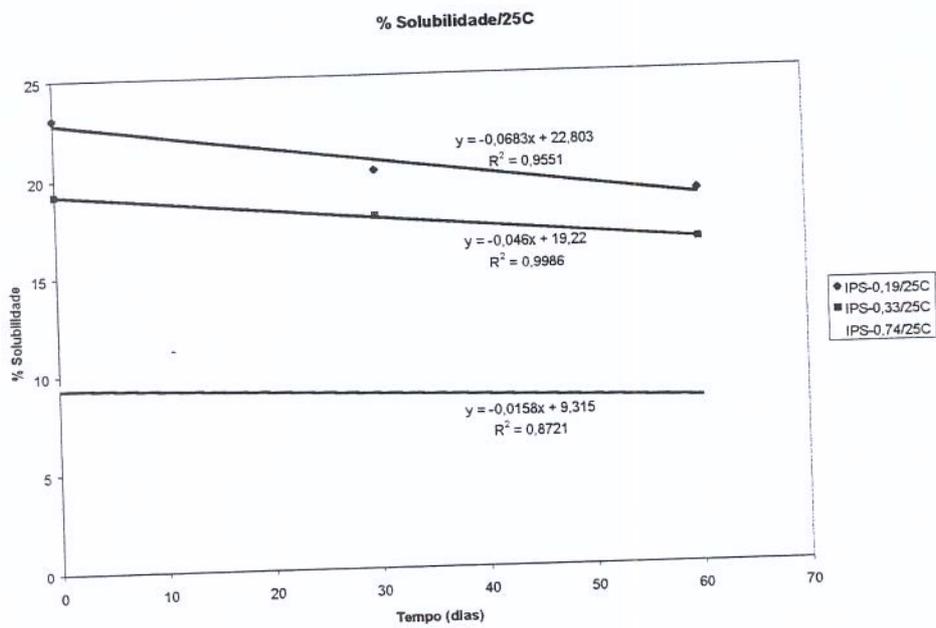


(a)

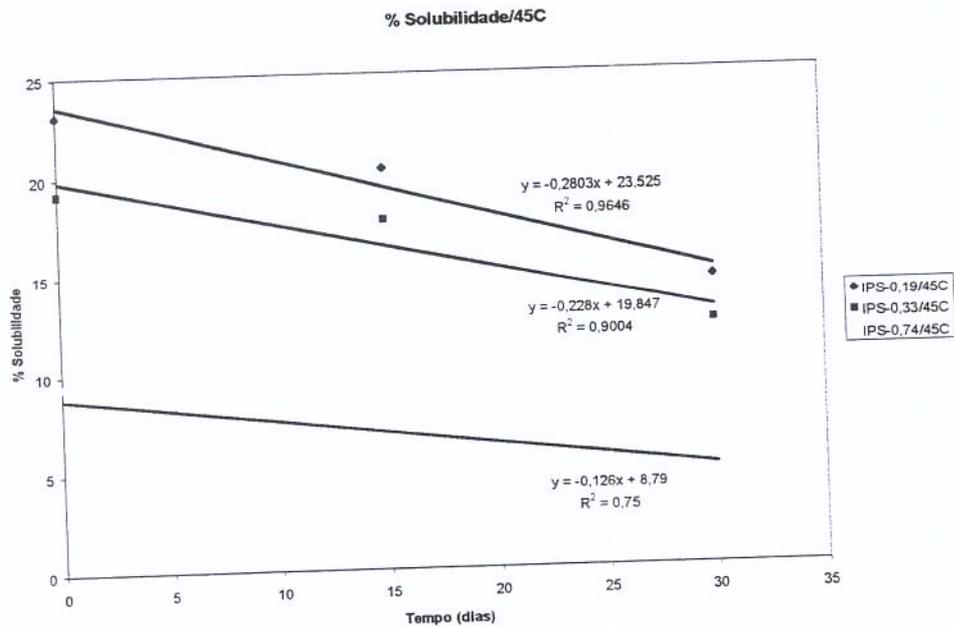


(b)

**FIGURA 10.** Comportamento da solubilidade dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74: (a) durante 210 dias de estocagem a 25°C e (b) durante 150 dias de estocagem a 45°C.



a)



b)

**FIGURA 11.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de perda da solubilidade dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74: (a) durante 60 dias de estocagem a 25°C e (b) durante 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação.

## 5.4. Caracterização do gel dos IPSs durante o armazenamento

### 5.4.1. Perfil de textura dos géis dos IPSs durante o armazenamento

O perfil de textura dos géis, obtido a partir da medida de textura instrumental por compressão, está apresentado nas Figuras 12 a 17.

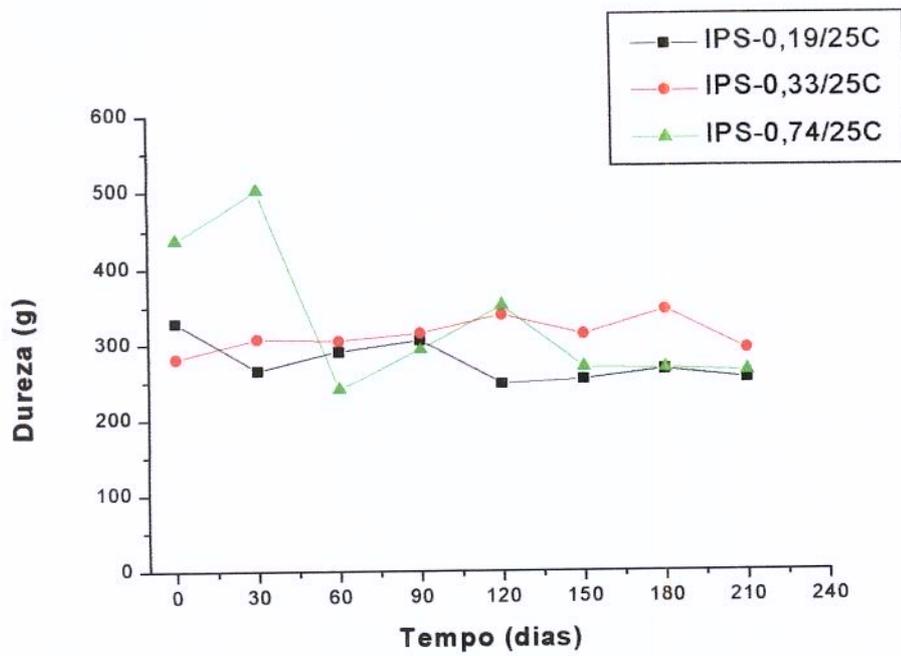
Assim como foi observado na análise de textura no início do armazenamento, a dureza foi a medida que apresentou maior variabilidade, particularmente para os géis obtidos do IPS-0,74. Este gel apresentou-se quebradiço e de difícil manuseio. Apesar da alta variabilidade, pode-se observar que não houve mudança da dureza ao longo da estocagem a 25°C e a 45°C (Figura 12) para os isolados IPS-0,19 e IPS-0,33. O gel do IPS-0,74 apresentou uma diminuição da dureza após 60 dias quando estocado a 25°C e após 15 dias a 45°C, alcançando valores semelhantes aqueles obtidos para os outros isolados. No entanto, os géis apresentaram grandes diferenças entre si. O gel do IPS-0,74, inicialmente com maior dureza e boa coesão, mostrou-se extremamente friável no decorrer da estocagem, fato não observado para os demais isolados.

Interações protéicas ocorridas durante a estocagem podem ter alterado a conformação estrutural das moléculas de proteína, resultando em mudanças nas características do gel e em outras propriedades funcionais dos isolados. Rector *et al.* (1991) estudaram mudanças no comportamento da geleificação de isolados protéicos do soro do leite (IPSL) e  $\beta$ -lactoglobulina durante a estocagem. Observaram que após 7 dias a 80°C a dureza do gel obtido diminuiu de 1,55 N para 0,49 N. Este decréscimo coincidiu com o desaparecimento de monômeros de  $\beta$ -lactoglobulina durante a estocagem. Os autores sugerem que a diminuição da dureza do gel está relacionada com reações de polimerização protéica. Segundo os autores, polímeros protéicos não podem participar com sucesso de diversas ligações cruzadas durante a geleificação devido às suas características estruturais e conformacionais. Ferry (1948; apud Rector *et al.*, 1991) sugere que a dureza do

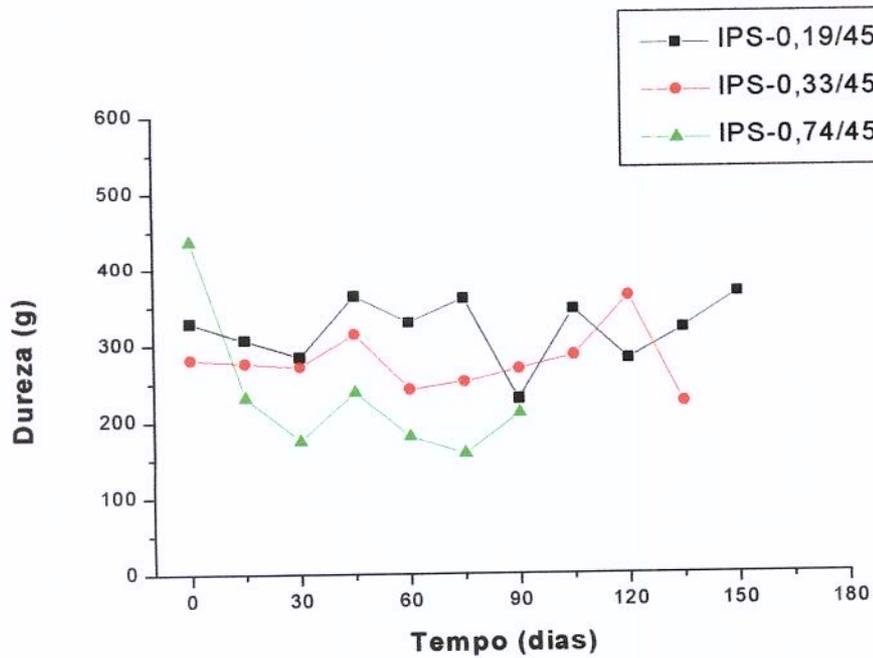
gel é diretamente proporcional ao número de ligações cruzadas S-S, então, um decréscimo do número de ligações cruzadas pode resultar num decréscimo da dureza do gel.

A elasticidade dos IPS-0,19 e IPS-0,33 permaneceu praticamente constante durante estocagem a 25 e 45°C (Figuras 13a e 13b). No entanto, a elasticidade do gel do IPS-0,74 apresentou redução de 26% do valor inicial, após 60 dias de estocagem a 25°C (Figura 14a) e 56%, após 30 dias de estocagem a 45°C (Figura 14b). Segundo Katsuta *et al.* (1990), ligações cruzadas S-S são responsáveis pela natureza elástica dos géis.

A coesividade do gel dos isolados IPS-0,19 e IPS-0,33 manteve-se estável durante estocagem a 25°C (Figuras 15a e 15b). O IPS-0,33, em 30 dias de estocagem a 45°C, apresentou uma redução de 36% na coesividade do gel, enquanto que a coesividade do gel do IPS-0,19, não apresentou alteração neste período (Figuras 16a e 16b). Em estocagem a 45°C, a coesividade do IPS-0,19 permaneceu estável até 30 dias de armazenamento, ao passo que a coesividade do IPS-0,33 diminuiu em 36% neste período. Tanto o IPS-0,74 estocado a 25 como a 45°C (Figuras 15a e 15b) apresentaram considerável perda de coesividade do gel durante a estocagem. Após 60 dias de estocagem a 25°C, o IPS-0,74 apresentou uma redução de coesividade de 56% (Figura 16a), permanecendo estável até o final do armazenamento (Figura 15a). Para o IPS-0,74 estocado a 45°C, observou-se uma redução mais intensa da coesividade já nos 15 primeiros dias, apresentando uma redução de 63% após 30 dias de estocagem (Figura 16b), quando também observou-se perda de 40% da solubilidade do isolado.

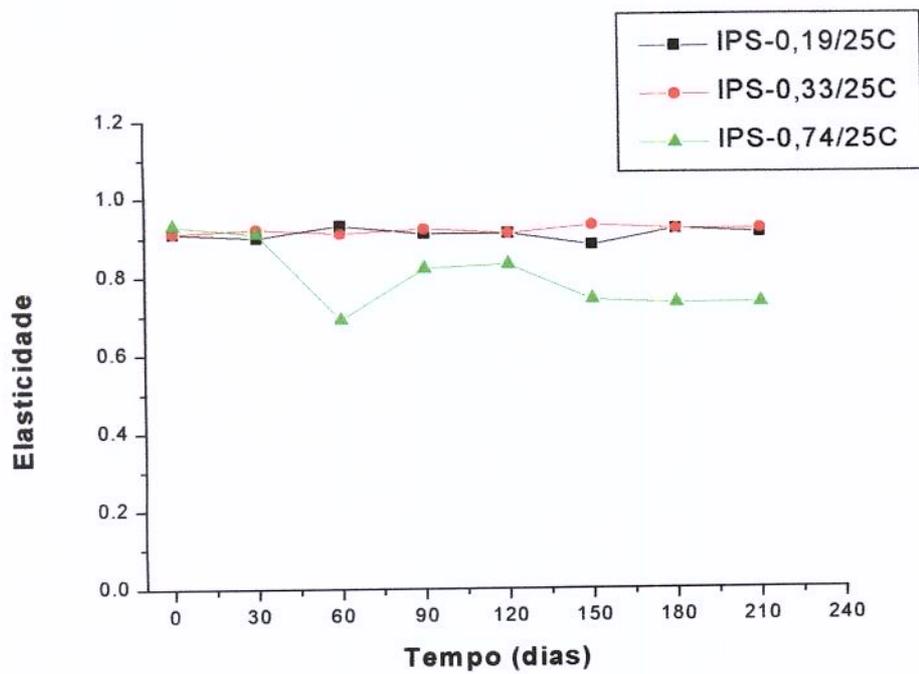


(a)

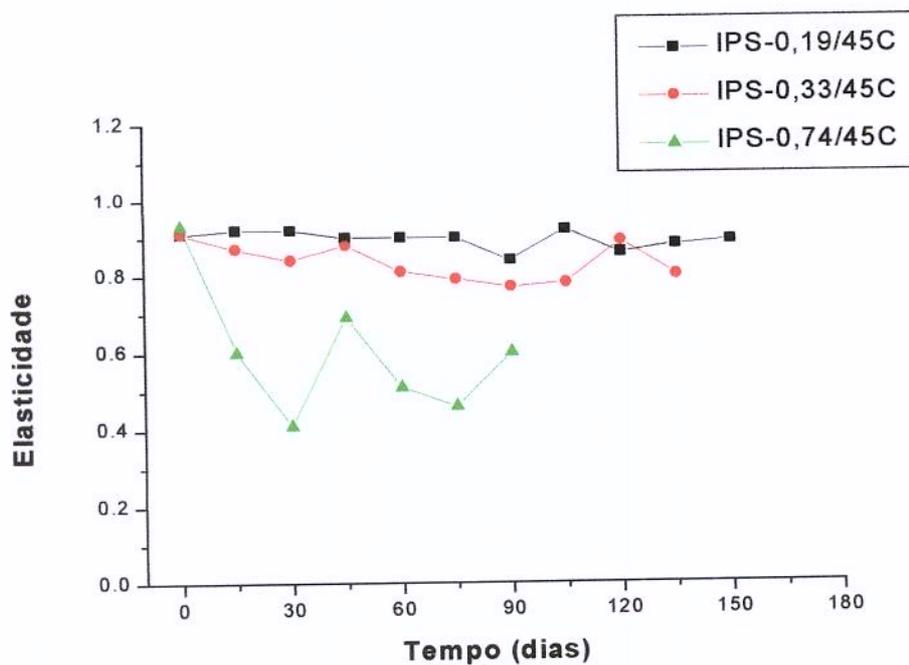


(b)

**FIGURA 12.** Perfil de textura - dureza do gel dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74, durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C.

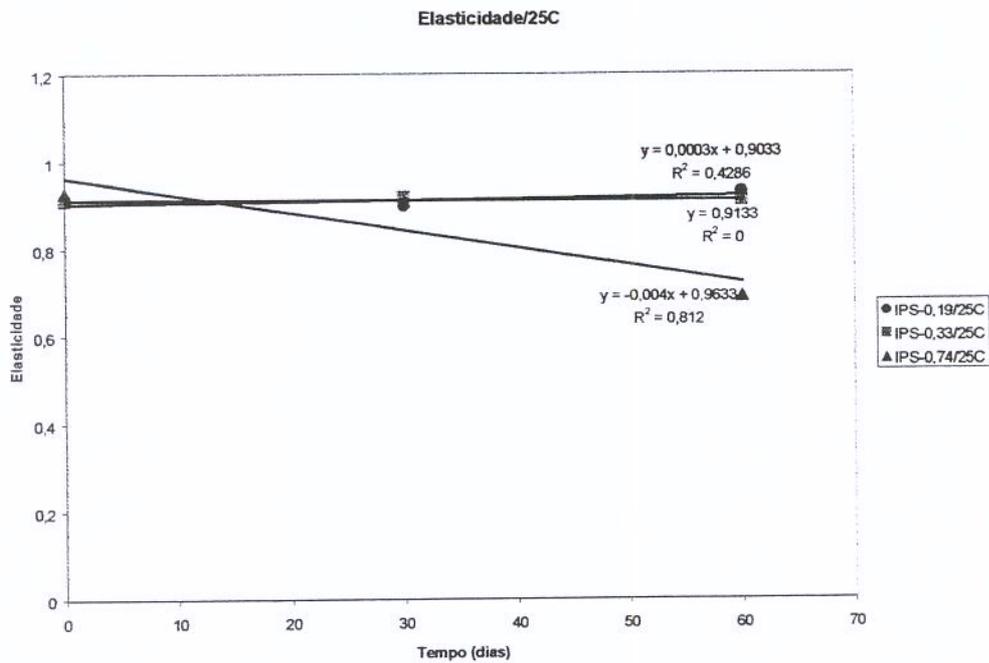


(a)

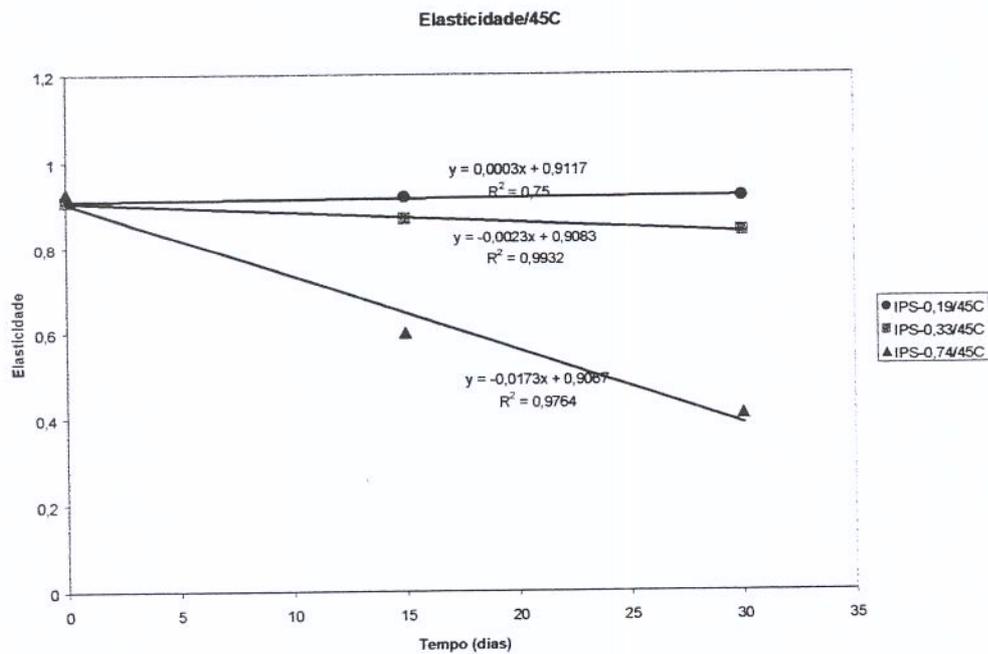


(b)

**FIGURA 13.** Perfil de textura - elasticidade do gel dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C.

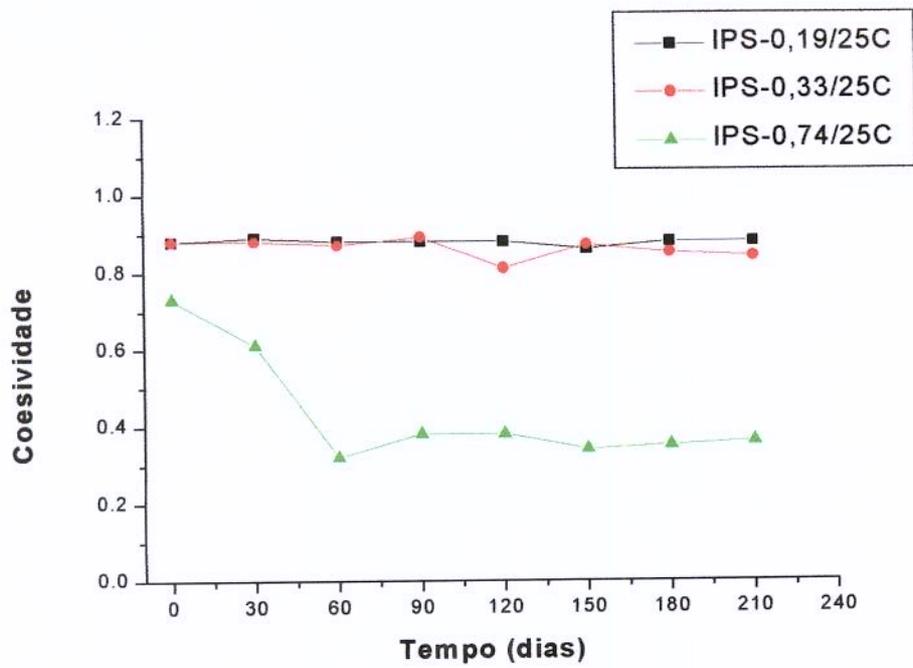


(a)

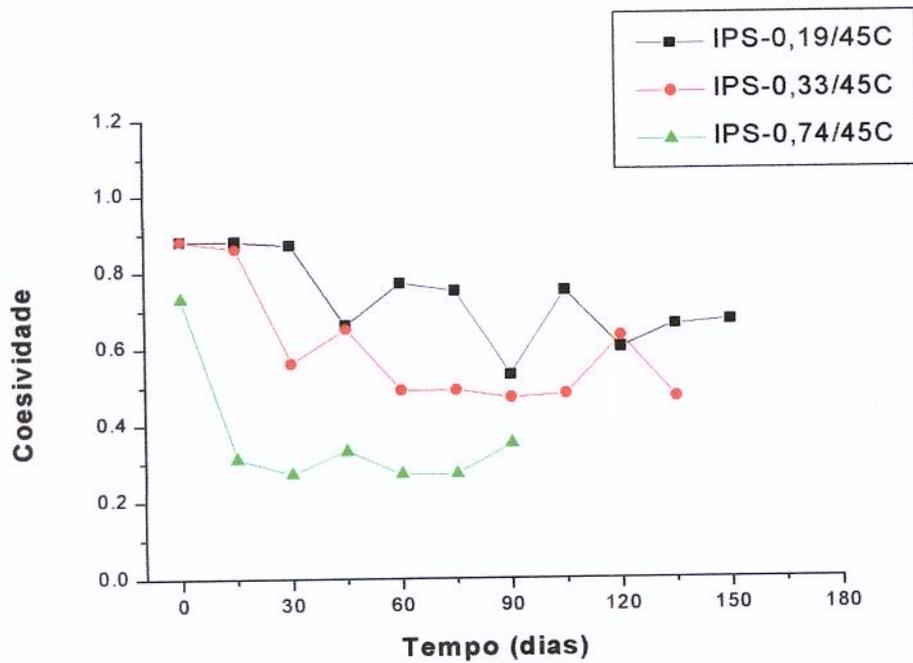


(b)

**FIGURA 14.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de perda de elasticidade dos géis dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 60 dias de estocagem a 25°C e (b) 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação.

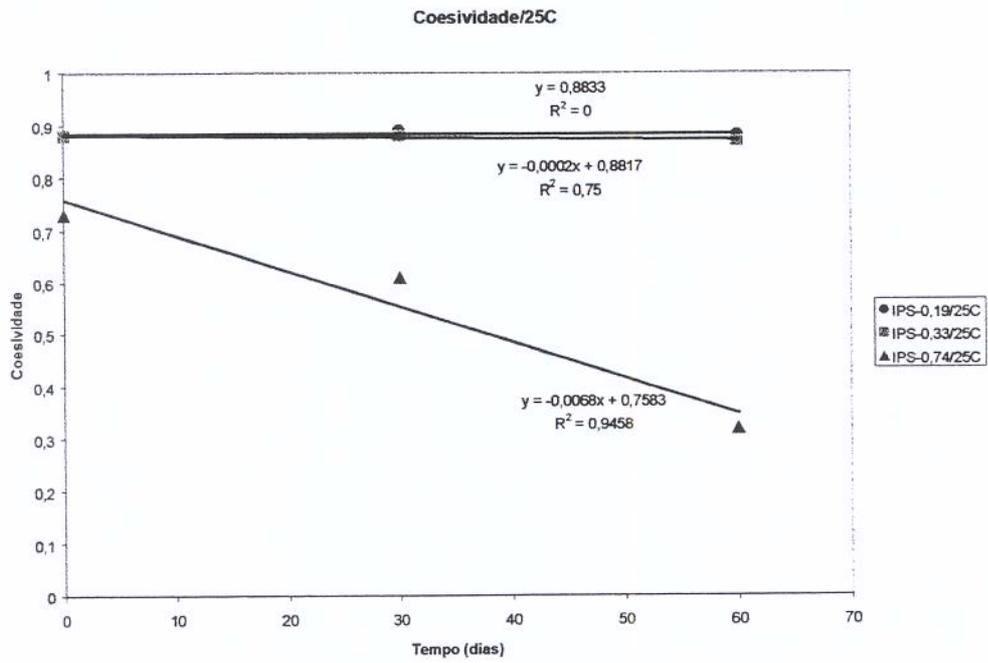


(a)

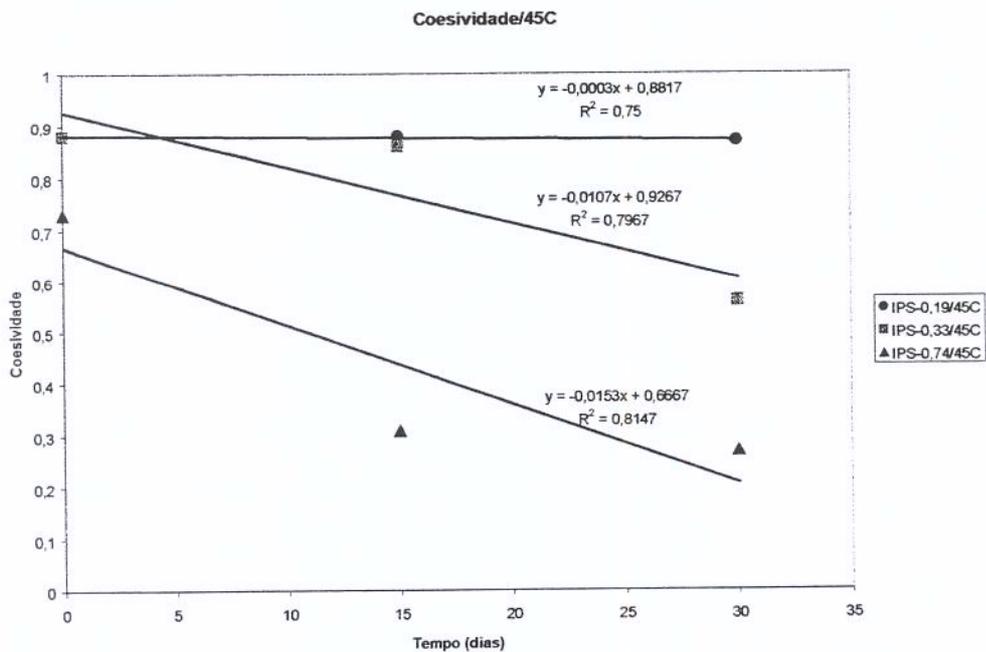


(b)

**FIGURA 15.** Perfil de textura - coesividade do gel dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C.



a)



(b)

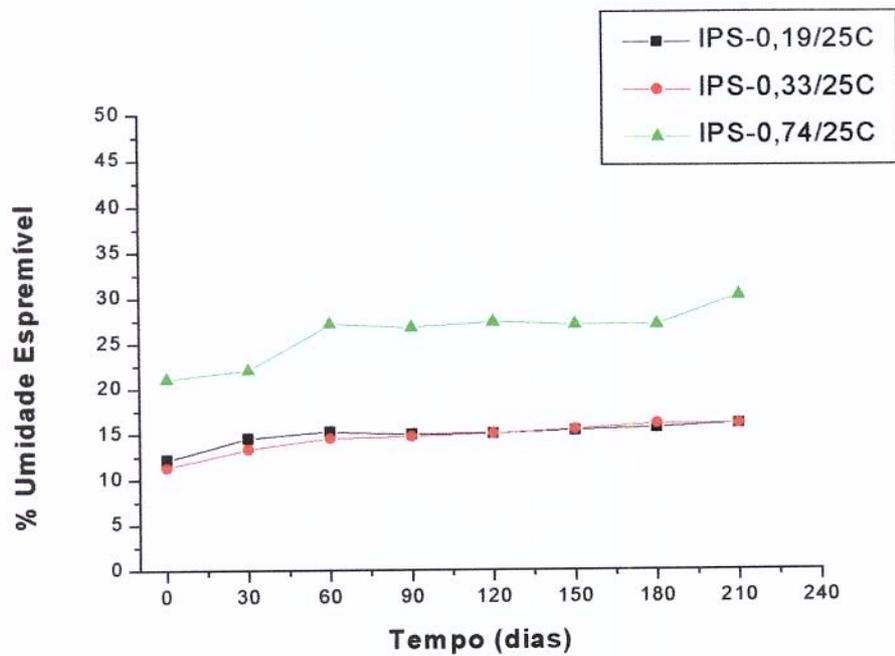
**FIGURA 16.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de perda de coesividade dos géis dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 60 dias de estocagem a 25°C e (b) 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação.

Mudanças na composição relativa das frações solúveis dos isolados, principalmente em relação ao IPS-0,74, podem ter influenciado na alteração das características do gel. No trabalho de Arrese *et al.* (1991), IPS contendo proteínas completamente desnaturadas apresentaram baixa capacidade de geleificação. Segundo os autores as características do gel estão fortemente relacionadas com as quantidades relativas das frações 7S e 11S. Kang *et al.* (1991) observou que géis com conteúdo de frações 7S maior do que frações 11S apresentaram maior elasticidade do que géis de IPS. No entanto, tem sido reportado que géis formados por frações 11S são mais duros e elásticos do que géis formados por frações 7S (Saio *et al.*, 1974 e Hashizume *et al.*, 1975; *apud* Kang *et al.*, 1991).

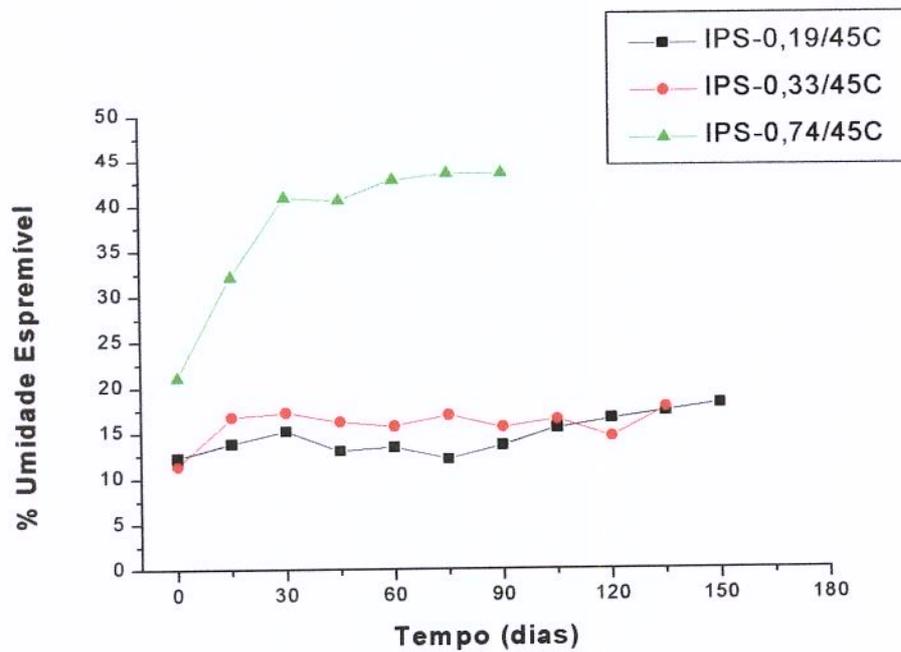
#### **5.4.2. Umidade espremível dos géis dos IPSs durante o armazenamento**

O comportamento da UE% dos isolados IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74, ao longo do armazenamento a 25°C e 45°C está mostrado na Figura 17. Observa-se que os isolados estocados a 45°C apresentaram um aumento da taxa de UE% superior ao dos estocados a 25°C. A taxa inicial de UE% dos IPS-0,19, IPS-0,33 e IPS-0,74 foi de 12,2; 11,3 e 21%, respectivamente. Observou-se que os géis das amostras IPS-0,19 e IPS-0,33 apresentaram comportamento semelhante em relação à UE%, que aumentou gradualmente no decorrer da estocagem a 25 (Figura 17a) e 45°C (Figura 17b). Nos primeiros 60 dias de estocagem a 25°C (Figuras 18a), as constantes de velocidade da UE% dos IPS-0,19 e do IPS-0,33 foram iguais, 0,05 (UE%/dia) enquanto que para os isolados IPS-0,19 e do IPS-0,33 estocados a 45°C (Figura 18b), estes coeficientes foram 0,10 (g/s) e 0,19 (g/s), respectivamente, ou seja, valor 2 e 4 vezes maior.

Da mesma forma, para o IPS-0,74, o aumento do teor de UE% foi maior para o isolado estocado a 45°C (Figura 17b) do que para o estocado a 25°C (Figura 17a). Em 30 dias de estocagem a 45°C, o aumento da UE% do IPS-0,74 foi superior a 100% e para o isolado estocado a 25°C, após 60 dias, este aumento foi de apenas 28%.



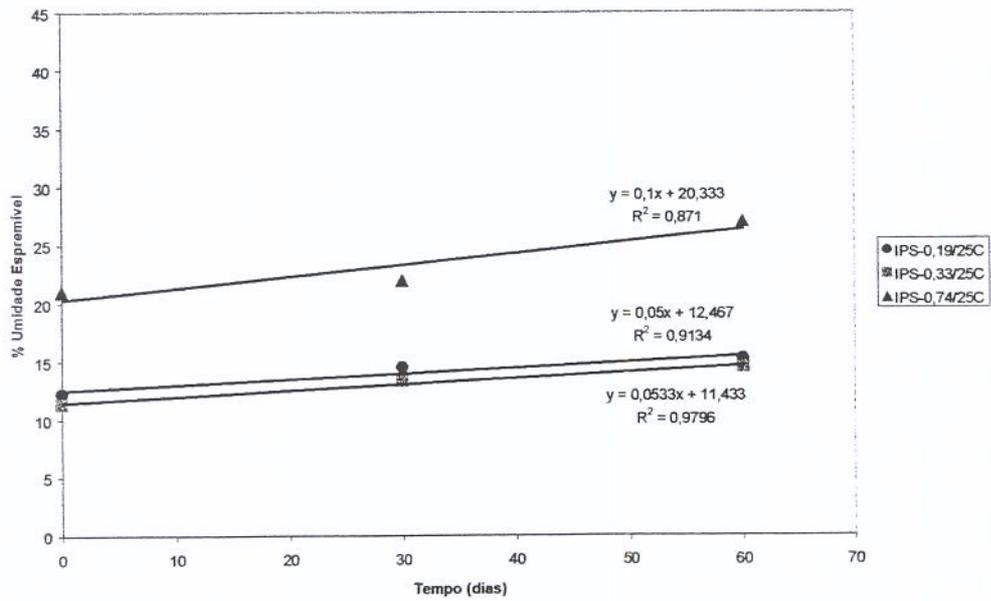
(a)



(b)

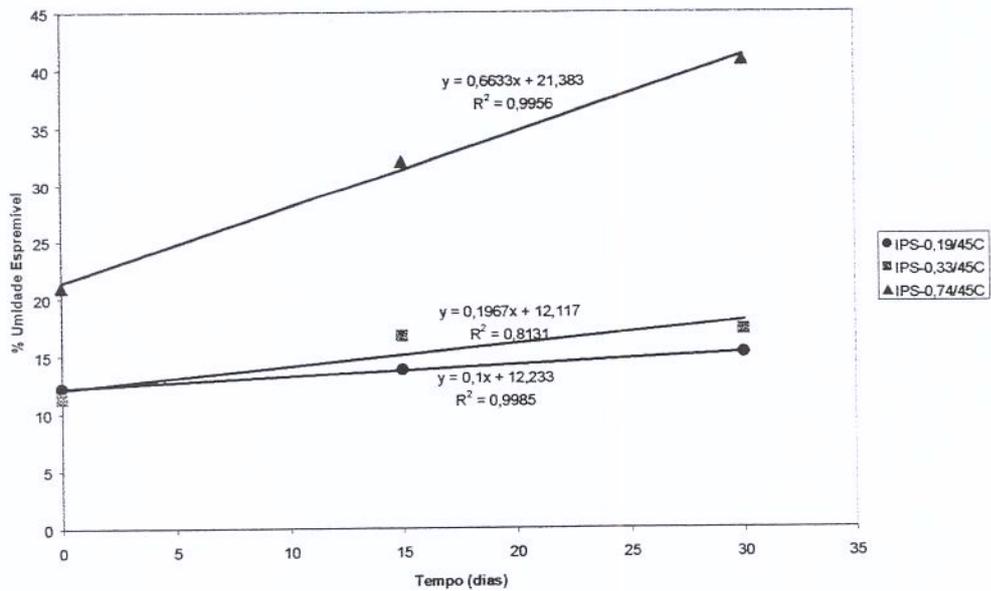
**FIGURA 17.** Comportamento da umidade espremível do gel (UE%) dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 210 dias de estocagem a 25°C e (b) 150 dias de estocagem a 45°C.

% Umidade Espremível/25C



(a)

% Umidade Espremível/45C



(b)

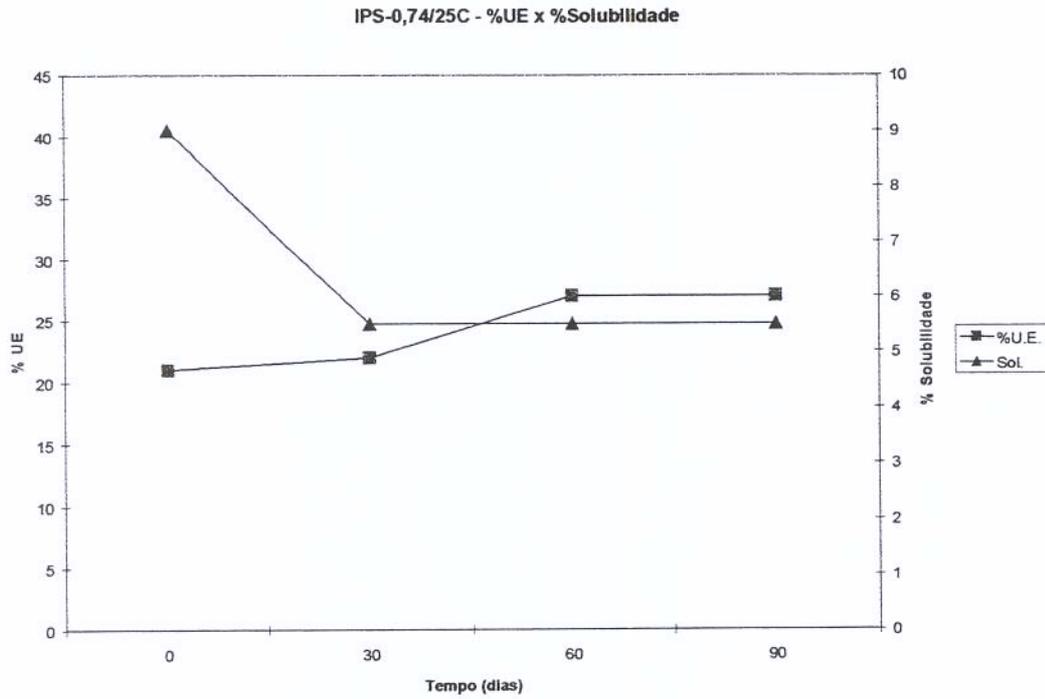
**FIGURA 18.** Gráfico dos coeficientes de velocidade de aumento de umidade espremível do gel (%UE) dos isolados IPS-0,19; IPS-0,33 e IPS-0,74 durante: (a) 60 dias de estocagem a 25°C e (b) 30 dias de estocagem a 45°C. Onde o ângulo de inclinação da reta corresponde à constante de velocidade da reação.

O perfil da UE% do IPS-0,74 foi comparado com o comportamento da solubilidade (Figura 19), dureza (Figura 20) e coesividade do gel (Figura 21) durante a estocagem.

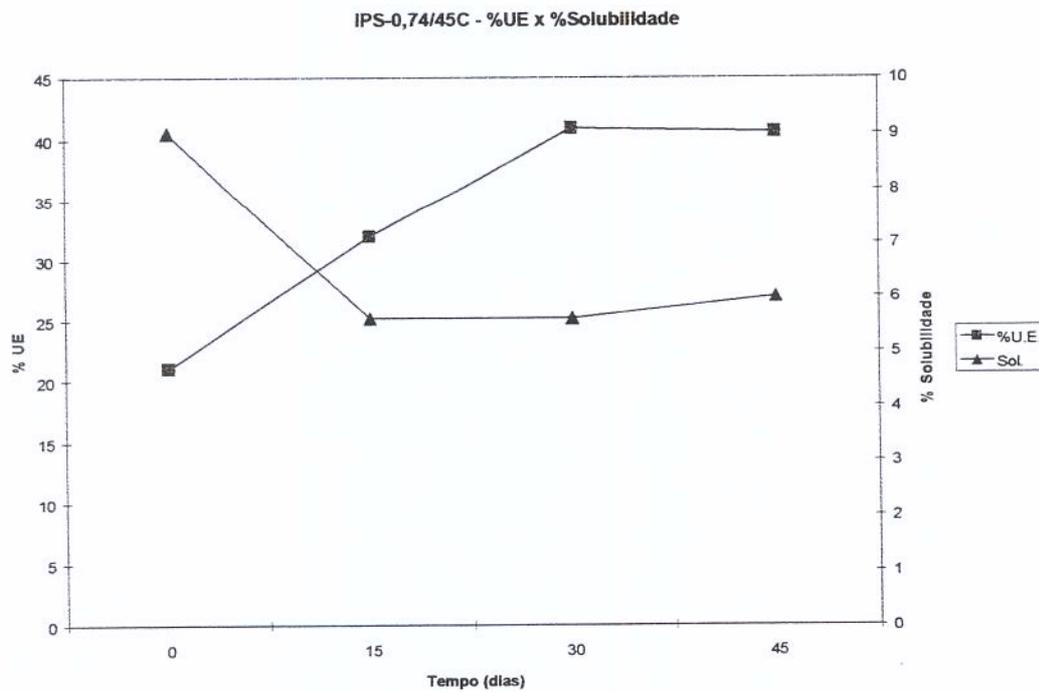
Na Figura 19 pode-se observar que, no decorrer da estocagem, a UE% do IPS-0,74 aumentou concomitantemente a diminuição da solubilidade do isolado. Beschel *et al.* (1992) observou que géis de concentrados protéicos de soro do leite com os menores valores de solubilidade, apresentavam maior UE%.

Analisando a Figura 20 pode-se observar que o aumento da UE% coincidiu com a diminuição da dureza do gel do IPS-0,74. Beschel *et al.* (1992), em géis de concentrados protéicos de soro do leite, também observaram que a UE% aumenta com a diminuição da dureza do gel. Em outro estudo, com proteínas de soja, Furukawa & Otha (1982) observaram um aumento da capacidade de retenção de água com o aumento da dureza do gel. No entanto, Hermansson (1982), em trabalho com géis de plasma sangüíneo, coloca que mudanças na estrutura do gel podem afetar a capacidade de retenção de água e as características de textura diferentemente e que estas propriedades deveriam portanto, serem tratadas separadamente.

Na Figura 21 observa-se que a UE% do IPS-0,74 aumenta com a diminuição da coesividade do gel. Segundo Hermansson (1996), estruturas mais coesas apresentam maior capacidade de retenção de água do que estruturas de gel grosseiramente agregadas, como no caso do gel do IPS-0,74 (Figuras 6e e 6f).

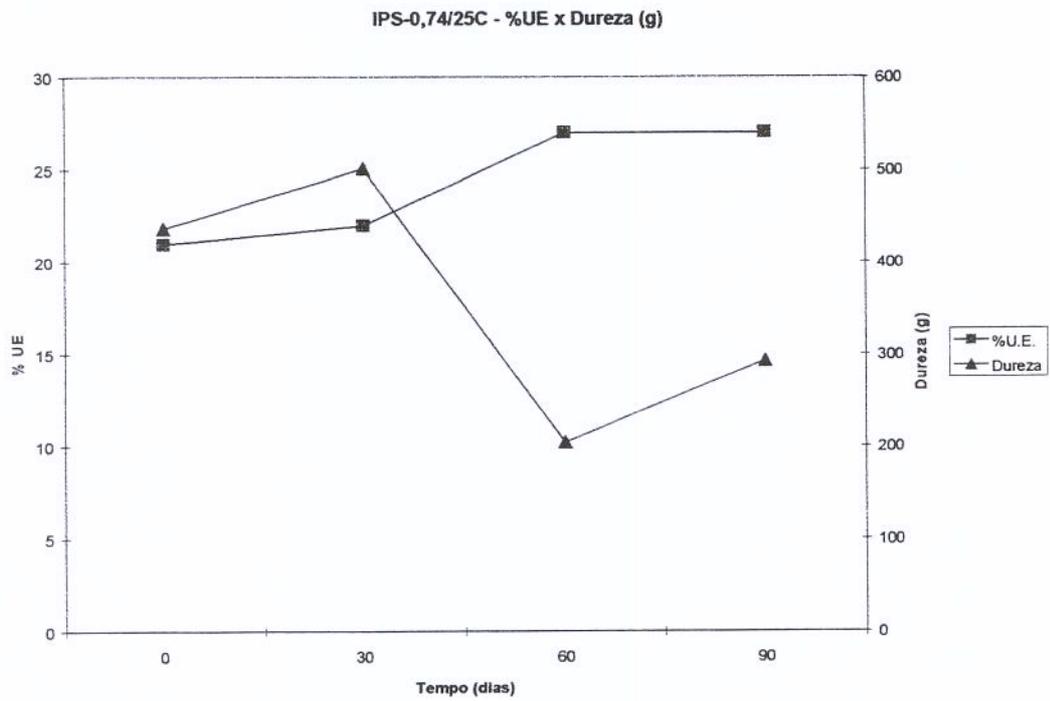


(a)

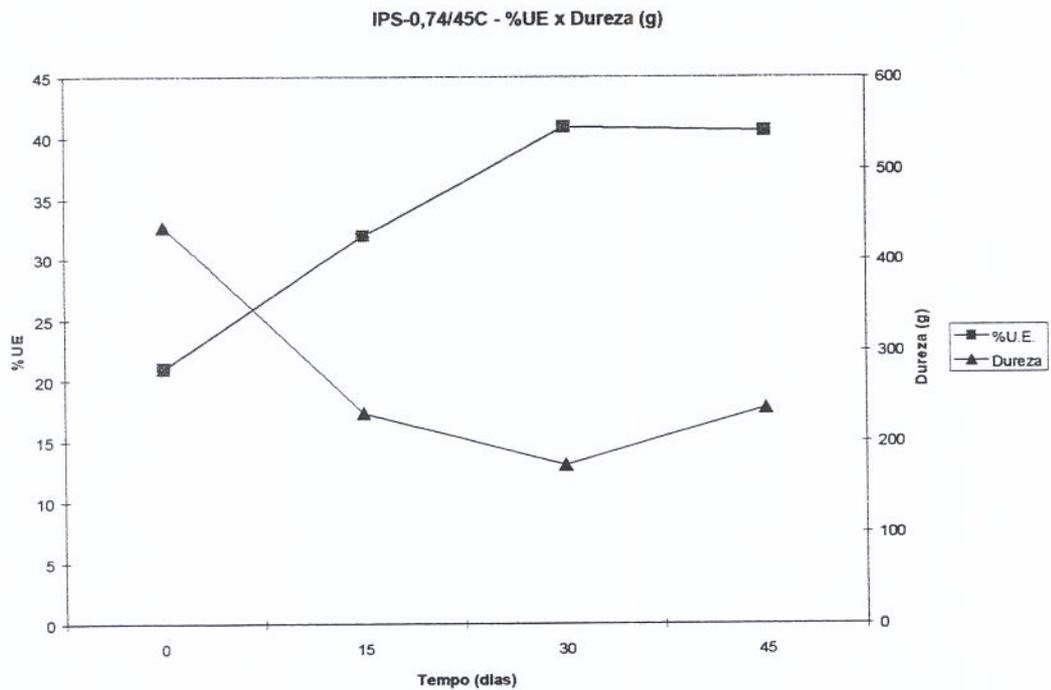


(b)

**FIGURA 19.** Comparações entre o comportamento da umidade espremível do gel (%UE) com o perfil da solubilidade do IPS-0,74 durante estocagem a: (a) 25°C e (b) 45°C.

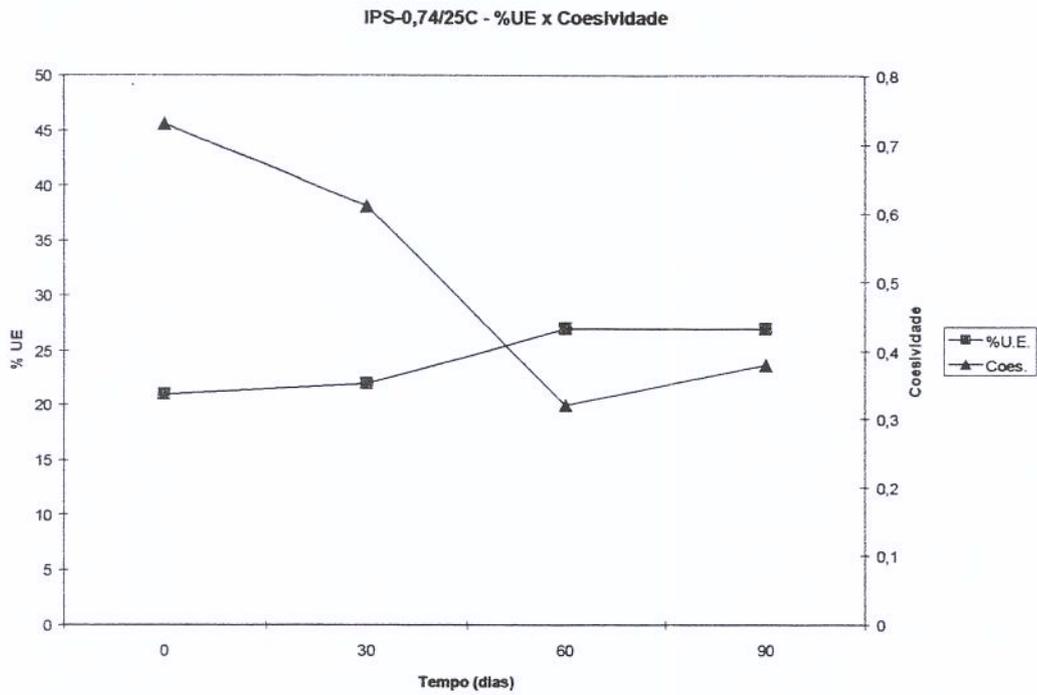


(a)

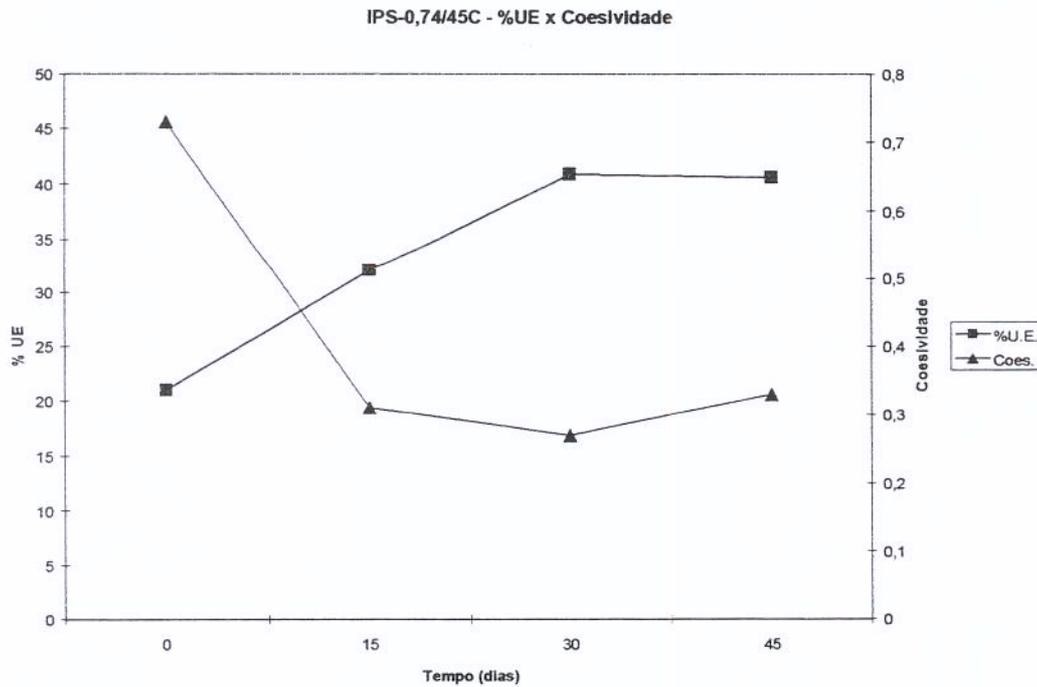


(b)

**FIGURA 20.** Comparações entre o comportamento da umidade espremível do gel (%UE) com o perfil de dureza do gel do IPS-0,74 durante estocagem a: (a) 25°C e (b) 45°C.



(a)



(b)

**FIGURA 21.** Comparações entre o comportamento da umidade espremível do gel (%UE) com o perfil de coesividade do gel do IPS-0,74 durante estocagem a: (a) 25°C e (b) 45°C.

### 5.4.3. Microestrutura dos géis dos IPSs durante o armazenamento

Analisando as micrografias obtidas pode-se observar mudanças na microestrutura dos géis no decorrer da estocagem a 25 e 45°C. O gel do IPS-0,74 apresentou características microestruturais bastante diferentes das outras amostras, por isso foi analisado separadamente. Micrografias do gel IPS-0,74 estocado a 25 e 45°C, em diferentes tempos de estocagem, estão mostrados na Figura 22. Não foram observadas mudanças significativas na estrutura destes géis com o tempo e temperatura de estocagem. A microestrutura dos géis exibidas pelas amostras destes isolados são bastante semelhantes ao do gel IPS-0,74 no seu estado inicial (ver Figura 6e-6f), constatando-se que o isolado IPS-0,74, desde do início da estocagem, já apresentava alterações, ocorridas durante o período de equilíbrio da amostra.

Micrografias obtidas por MEV dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33 após 60 (Figuras 23a; 23b; 23e; 23f) e 150 (Figuras 23c; 23d; 23g; 23h) dias de estocagem a 25°C estão mostradas à seguir. A microestrutura do gel do IPS-0,19 após 60 dias de estocagem a 25°C (Figuras 23a e 23e) foi bastante similar à da amostra no tempo inicial (ver Figura 6a-6b), apresentando uma estrutura de gel homogênea. Porém, após 150 dias de estocagem a 25°C, pode-se observar algumas diferenças na microestrutura do gel (Figuras 23c e 23g). Na Figura 23c observou-se uma maior “aspereza” da superfície do gel quando comparada ao gel do IPS-0,19 após 60 dias de estocagem (Figura 23a). O gel do IPS-0,19 após 150 dias de estocagem a 25°C apresentou uma maior descontinuidade do gel (Figura 23g), massas protéicas agruparam-se de forma aleatória formando uma estrutura de gel não muito uniforme. Alterações na microestrutura do gel do IPS-0,33 foram facilmente perceptíveis (Figuras 23b; 23d; 23f; 23h). O gel do IPS-0,33 após 60 dias de estocagem a 25°C adquiriu uma aparência mais floculada em relação ao gel do IPS-0,33 antes da estocagem (ver Figura 6c). Após 150 dias de estocagem (Figura 23h) observou-se grande fragmentação do gel e presença de partículas de tamanho e forma variadas em sua superfície. .

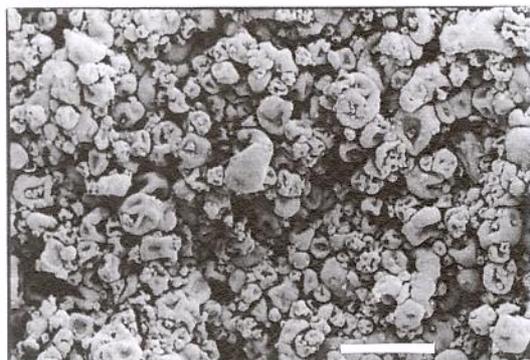
**FIGURA 22.** Micrografías obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) dos géis do IPS-0,74, estocados a 25 e 45°C: (a) após 60 dias de estocagem a 25°C, aumento de 220 vezes; (b) após 60 dias de estocagem a 25°C, aumento de 3000 vezes; (c) após 180 dias de estocagem a 25°C, aumento de 220 vezes; (d) após 180 dias de estocagem a 25°C, aumento de 3000 vezes. (e) após 30 dias de estocagem a 45°C, aumento de 220 vezes; (f) após 30 dias de estocagem a 45°C, aumento de 3000 vezes; (g) após 75 dias de estocagem a 45°C, aumento de 220 vezes e (h) após 75 dias de estocagem a 45°C, aumento de 3000 vezes.



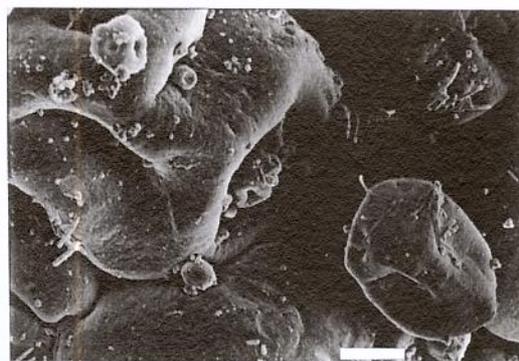
(a) IPS-0,74/25°C-60dias 100µm x220



(b) IPS-0,74/25°C-60 dias 5µm x3000



(c) IPS-0,74/25°C-180dias 100µm x220



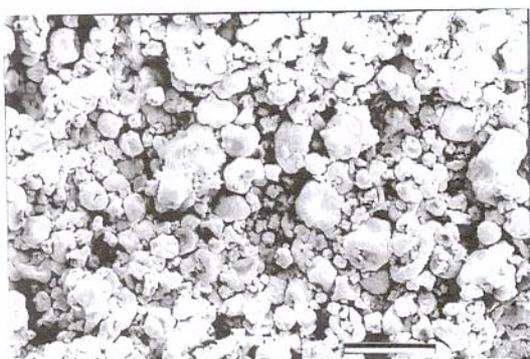
(d) IPS-0,74/25°C-180 dias 5µm x3000



(e) IPS-0,74/45°C-30dias 100µm x220



(f) IPS-0,74/45°C-30 dias 5µm x3000

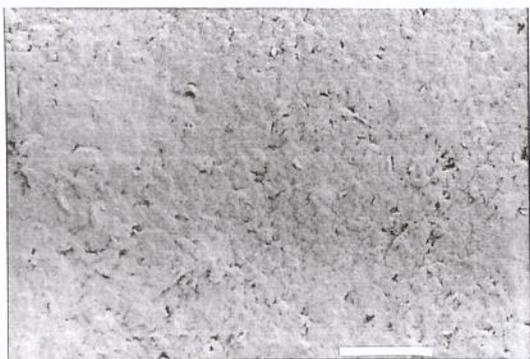


(g) IPS-0,74/45°C-75dias 100µm x220



(h) IPS-0,74/45°C-75 dias 5µm x3000

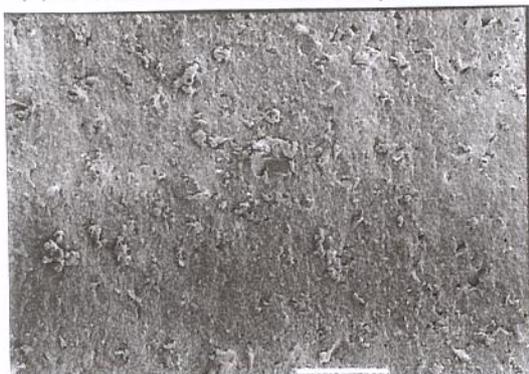
**FIGURA 23.** Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33, estocados a 25°C: (a) IPS-0,19, após 60 dias de estocagem, aumento de 220 vezes; (b) IPS-0,33, após 60 dias de estocagem, aumento de 220 vezes; (c) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 220 vezes; (d) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 220 vezes. (e) IPS-0,19, após 60 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes; (f) IPS-0,33, após 60 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes; (g) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes e (h) IPS-0,19, após 150 dias de estocagem, aumento de 3000 vezes.



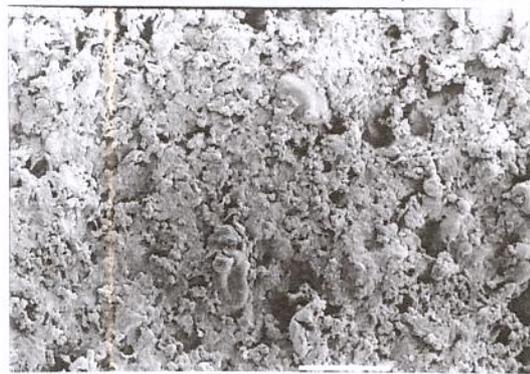
(a) IPS-0,19/25°C-60dias 100µm x220



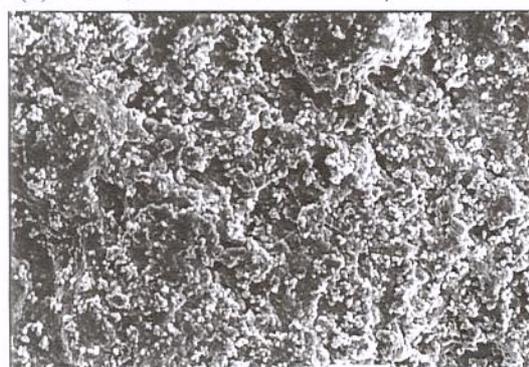
(b) IPS-0,33/25°C-60 dias 100µm x220



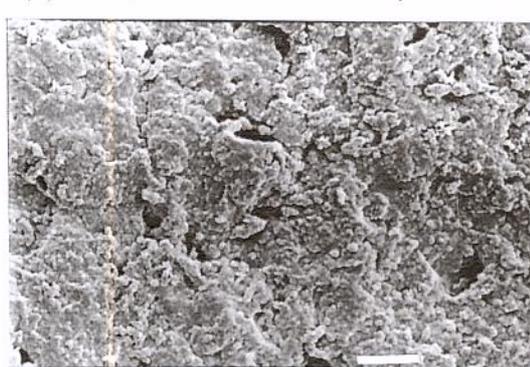
(c) IPS-0,19/25°C-150dias 100µm x220



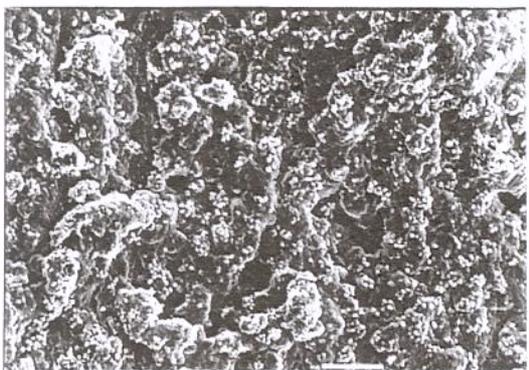
(d) IPS-0,33/25°C-150 dias 100µm x220



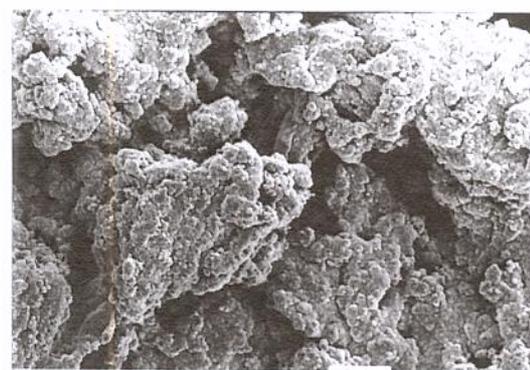
(e) IPS-0,19/25°C-60dias 5µm x3000



(f) IPS-0,33/25°C-60 dias 5µm x3000



(g) IPS-0,19/25°C-150 dias 5µm x3000



(h) IPS-0,33/25°C-150 dias 5µm x3000

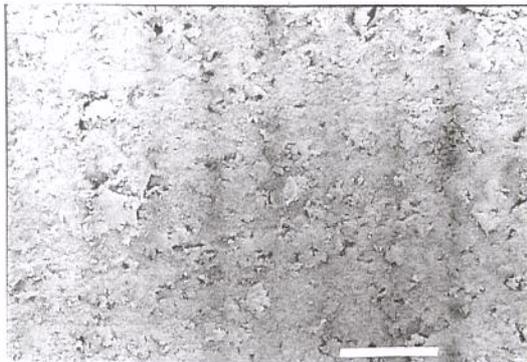
Na Figura 24 estão apresentadas as micrografias dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33 após 45 (a; b), 90 (c; d) e 135 (e; f) dias de estocagem a 45°C, com aumento de 100µm (x220). Observou-se que no decorrer da estocagem os géis das duas amostras foram perdendo coesividade/aderência e homogeneidade, tornando-se mais fragmentados, e ao final de 135 dias os géis IPS-0,19 (Figura 24e) e IPS-0,33 (Figura 24f) apresentaram formação de grandes massas globulares semelhantes às obtidas pelo IPS-0,74 (Figura 18), porém o gel do IPS-0,19 aparentou ter maior adesão (Figura 24e). O IPS-0,33 após 45 dias de estocagem a 45°C apresentou diferenças marcantes em comparação com a estrutura do gel antes do início do armazenamento (Figura 6a e 6b), apresentando uma estrutura de gel bastante floculada, podendo-se observar a presença de massas globulares destacáveis em sua superfície, evoluindo até a formação de partículas esféricas maiores distribuídas independentemente (Figura 24f). A estrutura do gel IPS-0,33 aparentou ser menos coesa do que a do IPS-0,19 (Figura 24a).

Pode-se observar pequenos filamentos presos em toda a superfície do gel do IPS-0,19 (Figura 25a; 25c e 25e), filamentos semelhantes a estes foram também observados por Langton & Hermansson (1996) em gel de proteínas do soro do leite, definidos pelos autores como “*hairness*” (pequenos pêlos). Após 135 dias de estocagem observou-se a formação de estruturas alongadas na forma de grandes blocos, porém estruturas esféricas foram também observadas (Figura 25e).

O IPS-0,33 após 45 dias/45°C de estocagem apresentou uma estrutura de gel formada por massas globulares unidas de forma irregular, com formação de aglomerados (Figura 25b). Após 90 dias de estocagem observou-se a formação de inúmeras partículas esféricas bem definidas, distribuídas de forma linear formando pequenos cordões de contas. Langton *et al.* (1996) observaram estrutura similar em gel de proteínas do soro do leite. Após 135 dias pode-se observar a formação de massas poliédricas sobrepostas semelhantes a do gel do

IPS-0,74 (Figura 6f), porém com presença de pequenas partículas esféricas aderidas em toda a superfície do gel (Figura 25f). Mudanças na estrutura de géis protéicos podem ser induzidas por fatores como temperatura de aquecimento, pH ou adição de sais (Hermansson, 1994).

**FIGURA 24.** Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), com aumento de 220 vezes, dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33, estocados a 45°C: (a) IPS-0,19, após 45 dias de estocagem; (b) IPS-0,33, após 45 dias de estocagem; (c) IPS-0,19, após 90 dias de estocagem; (d) IPS-0,33, após 90 dias de estocagem; (e) IPS-0,19, após 135 dias de estocagem e (f) IPS-0,33, após 135 dias de estocagem.



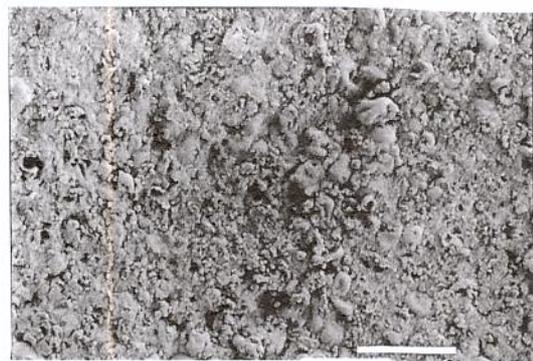
(a) IPS-0,19/45°C-45dias 100µm x220



(b) IPS-0,33/45°C-45 dias 100µm x220



(c) IPS-0,19/45°C- 90dias 100µm x220



(d) IPS-0,33/45°C- 90 dias 100µm x220

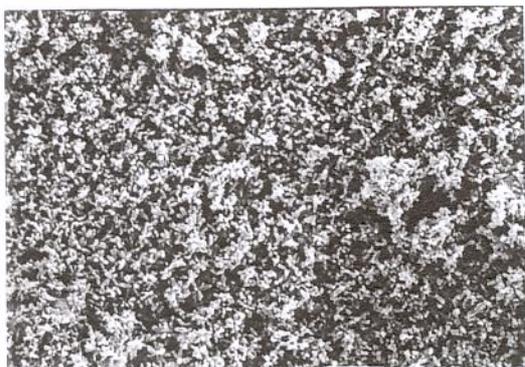


(e) IPS-0,19/45°C-135 dias 100µm x220



(f) IPS-0,33/45°C-135 dias 100µm x220

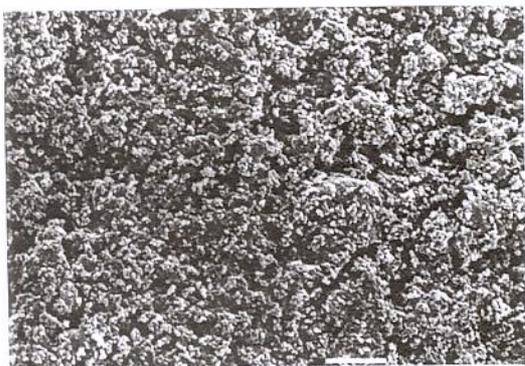
**FIGURA 25.** Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), com aumento de 3000 vezes, dos géis dos IPS-0,19 e IPS-0,33, estocados a 45°C: (a) IPS-0,19, após 45 dias de estocagem; (b) IPS-0,33, após 45 dias de estocagem; (c) IPS-0,19, após 90 dias de estocagem; (d) IPS-0,33, após 90 dias de estocagem; (e) IPS-0,19, após 135 dias de estocagem; (f) IPS-0,33, após 135 dias de estocagem.



(a) IPS-0,19/45°C-45dias 5µm x3000



(b) IPS-0,33/45°C-45 dias 5µm x3000



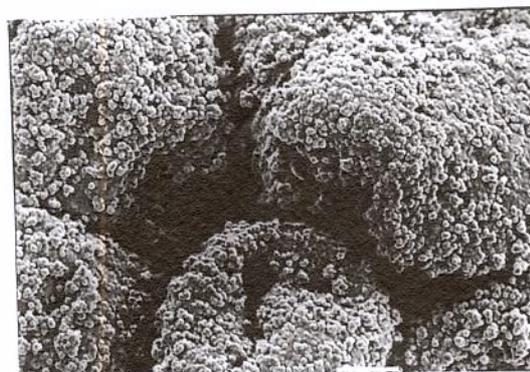
(c) IPS-0,19/45°C-90dias 5µm x3000



(d) IPS-0,33/45°C-90 dias 5µm x3000



(e) IPS-0,19/45°C-135 dias 5µm x3000



(f) IPS-0,33/45°C-135 dias 5µm x3000

## 6. CONCLUSÕES

---

1. Em relação às características dos isolados, pode-se concluir que:

1.1. Período de equilíbrio nas diferentes umidades relativas:

- Modificações nas características das proteínas tiveram seu início já no período de equilíbrio das amostras. No entanto, estas modificações foram mais intensas para o isolado de maior Aa.
- A análise do perfil eletroforético das frações hidrosolúveis dos isolados demonstra mudanças na composição relativa das frações 7S e 11S do IPS-0,74, onde ocorreu o desaparecimento da subunidade  $\beta$ -7S e a diminuição do polipeptídeo pB-11S, sugerindo reações de agregação durante o período em que as amostras foram equilibradas;
- Alterações na Aa dos isolados levaram à modificações de suas características, com formação de agregados insolúveis em água, o que resultou na diminuição da solubilidade;

1.2. No decorrer da estocagem:

- A análise do perfil eletroforético da proteína solúvel dos isolados, durante a estocagem, demonstra que a composição relativa das frações para isolados com Aa 0,19 (IPS-0,19) e 0,33 (IPS-0,74) praticamente não apresentou variação no decorrer do armazenamento. No IPS-0,74, observou-se o desaparecimento completo da subunidade  $\beta$  da fração 7S já início da estocagem e após 90 dias de estocagem a 45°C, apenas o polipeptídeo ácido da fração 11S permaneceu solúvel;

- A estocagem a 25 e 45°C resultou na diminuição da solubilidade dos isolados. Os isolados submetidos à maior temperatura de estocagem apresentaram maior redução da solubilidade e quanto maior a atividade de água, maior foi esta redução.

2. Em relação às características do gel dos isolados, pode-se concluir que:

2.1. Período de equilíbrio nas diferentes umidades relativas:

- Os isolados IPS-0,19 e IPS-0,33 mostraram comportamento semelhante em diversos parâmetros avaliados, sugerindo que nesta faixa de Aa (0,19 - 0,33) as proteínas apresentam características funcionais semelhantes. Modificações sofridas pelos IPSs no período de equilíbrio resultaram na modificação da dureza dos géis, mas não na elasticidade e na coesividade;
- Na análise do perfil de textura, o parâmetro de dureza mostrou-se inadequado para avaliação das modificações das características do gel dos isolados, porém os parâmetros de elasticidade e coesividade mostraram-se adequados;

2.2. No decorrer da estocagem:

- Interações protéicas, tipo agregação, ocorridas durante a estocagem resultou em mudanças nas características do gel e em outras propriedades funcionais dos isolados;
- A estocagem a 25°C e a 45°C não apresentou grande influência na elasticidade do gel dos isolados IPS-0,19 e IPS-0,33;
- Mudanças na composição relativa das frações solúveis dos isolados, principalmente em relação ao IPS-0,74, com diminuição da solubilidade, podem ter influenciado na alteração das características do gel.

- A Aa e a temperatura de estocagem tiveram grande influência na capacidade de retenção de água do gel dos isolados. Quanto maior a Aa e maior a temperatura de estocagem, maior a umidade espremível dos géis;
- O aumento da umidade espremível do gel do IPS-0,74 coincidiu com a diminuição da coesividade e dureza do gel, que também apresentou diminuição da solubilidade durante o armazenamento;
- A análise do gel em MEV permitiu visualizar diferenças marcantes nas características dos géis, especialmente em relação ao gel do IPS-0,74. Estas diferenças foram confirmadas pelas análises de UE% e TPA-coesividade do IPS-0,74, uma vez que este isolado aparentemente não formou estrutura de rede de gel, resultando na baixa coesividade e capacidade de retenção de água do gel.
- Após 135 dias de estocagem a 45°C, os géis dos isolados IPS-0,19 e IPS-0,33 apresentaram características de microestrutura semelhantes ao do IPS-0,74, que manteve as mesmas características durante todo o armazenamento, sugerindo que o isolado IPS-0,74 encontrava-se alterado desde o início da estocagem;

O estudo sugere que durante a estocagem dos isolados podem ter ocorrido mudanças estruturais nas moléculas, possivelmente do tipo agregação-dissociação, resultando em alteração da solubilidade e modificações das características do gel. As condições de umidade relativa no armazenamento de produtos protéicos demonstram afetar propriedades funcionais como solubilidade, geleificação e capacidade de retenção de água, importantes para a qualidade e utilização destes produtos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. AGUILERA, J. M.; BALLIVIAN, A. A kinetic interpretation of textural changes in black beans during prolonged storage. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 52, n. 3, p. 691-695, 1987.
2. AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. Food microstructure and quality. In: AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. (Ed.). **Microstructural Principles of Food Processing and engineering**. New York: Elsevier Applied Science, 1990, cap. 5, p. 161-192.
3. ARRESE, E. L., SORGENTINI, D. A., WAGNER, J. R. ; AÑÓN, M. C. Eletrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1029-1032, 1991.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. William Horwitz (Ed.). Whashington: D.C., p. 195 - 197, 1995.
5. BADLEY, R. A.; ATKISON, D.; HAUSER, H.; OLDANI, D.; GREEN, J. P. ; STUBBS, J. M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochemistry Biophysical Acta**, "S.I", v. 412, n. 1, p. 214-228, 1975.
6. BLIGHT, E. C. ; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Candian Journal Biochemistry and Physiologic**, Washington, v.37, p. 911-917, 1959.
7. BOURNE, M. C. Texture measurements in vegetables. **Theory, determination and control of physical properties of food materials**. In: RHA, C. (Ed.). Reidel Publishing, Dordrecht-Netherlends, p. 131-162, 1975.
8. BOURNE, M. C. Texture profile of ripening pears. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 2, n.1, p. 223-226, 1968.
9. BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity**: concept and measurement. New York: Academic Press, 1982, 325p.
10. BRENNAN, J. G. Food texture measurement. In: **Developments in Food Analysis Techniques - 2**. KING, R. D. (Ed). Applied Science Publishers LTD, London. Chap. 1, p. 1-27, 1980.

11. BRUNAUER, S., EMMETT, P.; TELLER, E., **Journal of the American Chemistry Society**, Champaign, v. 60, n.3, p. 309 - 315, 1938. *Apud: CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. New York: Academic Press, 1986, v. 5, cap. 2, p. 91-139.
12. CATSIMPOOLAS, N. ; MEYER, E. W. Gelation phenomena of soybean globulins: 1. Protein-protein interactions. **Cereal Chemistry**, Washington, v.47, p.559-570, 1970.
13. CHEFTEL, J. C., LORIENT, D. ; CUQ, J. L. **Proteínas alimentárias – bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas**. Editora Acribia, SA., 1989, cap. 4, p. 196-198.
14. DAMODARAN, S. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In: KINSELLA, J.E. & SOUCIE, W. G. (Eds.), **American Oil Chemists' Society**, Champaign, Ill, v.1, n.1, p. 21-78, 1989.
15. DAMODARAN, S. Structure-function relationship of food proteins. In: HETTIARACHCHY , N. S. and ZIGLIER, G. R. (Eds.), **Protein Functionality in Food Systems**, Marcel Dekker, New York, p. 1-38, 1994.
16. DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: Fennema, O. R. (Ed.), **Food Chemistry**, Marcel Dekker, New York, p. 321-430, 1996.
17. DAVIES, C. G. A.; NETTO, F. M.; GLASSENAP, N.; GALLAHER, C. M.; LABUZA, T. P.; GALLAHER, D. D. Indication of the maillard reaction during storage of protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2485 - 2489, 1988.
18. deMAN, J. M., KAMEL, B. S. Evaluation of gelatin gel texture by penetration tests. **Lebensm. Wiss. Technology**, London, v. 8, p. 123-127, 1975.
19. DRAPER, M; CATINSIMPOOLAS, N. Dissulfide and sulfhydryl groups in glycinin. **Cereal Chemistry**, Washington, v. 55, n.1, p. 16-23, 1978.
20. FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**, third edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996, 1051p.
21. FERRY, J. D. Proteins gels. **Advanced in Protein Chemistry**, Washington, v. 4, n. 1, p. 39 - 50, 1948.
22. FLORY, P. J., Gels and gelling processes: Introductory lectures. **Faraday Discussions of the Royal Chemical Society**, Washington, v. 57, n.1, p. 7, 1974.

23. FRIEDMAN, H. H.; WHITNEY, J. E.; SZCZESNIAK, A. S. The texturometer - a new instrument for objective texture measurement. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 28, n. 3, p. 390-396, 1963.
24. FURUKAWA, T.; OHTA, S. Mechanical and water-holding properties of heat-induced soy protein gels as related to their structural aspects. **Journal of Texture Studies**, Connecticut, v.13, n.1, p. 59-69, 1982.
25. FURUKAWA, T.; OHTA, S. ; YAMAMOTO, A. Texture-structure relationships in heat-induced soy protein gels. **Journal of Texture Studies**, Connecticut, v.10, n.4, p. 333-346, 1980.
26. GARCÍA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L. ; LABORDA, F. Composition and characterization of soyabean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Connecticut, v. 37, n. 4, p. 361-391, 1997.
27. GENOVESE, M. I. ; LAJOLO, F. M. Composition and structural characteristics of isolated soy protein from broken and damaged seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 58, n. 1, p. 148-152, Jan./Feb., 1992.
28. HENN, R. L.; NETTO, F. M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 8, p. 3009-3015, Aug., 1998.
29. HERMANSSON, A. M. Functionality and protein structure. POUR-EL, A. (Ed.), **ACS Symposium Series**. ACS, Washington, D.C, 1979, 311p.
30. HERMANSSON, A. -M. Microstructure of protein gels related to functionality. In: YADA, R. Y.; JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. (Ed.). **Protein Structure-Function Relationships in Foods**, Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1994, p. 22-42.
31. HERMANSSON, A. -M. Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. **Journal Texture Studies**, Connecticut, v.9, n.1/2, p.33-58, s.d., 1978.
32. HERMANSSON, A. M. Soy protein gelation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 63, n. 5, p. 658-666, May, 1986.
33. HERMANSSON, A. -M. ; LANGTON, M. Electron microscopy. In: ROSS-MURPHY, S. B.(Ed.). **Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers**. Glasgow: Blakie Academic & Professional, 1992, p. 277-342.

34. HERMANSSON, A. -M., ; BUCHHEIM, W. Characterization of protein gels by scanning and transmission electron microscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, Connecticut, v. 81, n. 2, p.519-530, june, 1981.
35. HSU, K. ; FENNEMA, O. Changes in the functionality of dry whey protein during storage. **Journal of Dairy Science**, Chicago, Connecticut, v. 72, n. 4, p. 829-837, April, 1989.
36. JAUREGUI, C. A., REGENSTEIN, J.M. ; BAKER, R. C. A simulated method for measuring expressible moisture, a water-binding property of muscle foods. **Journal Food Science**, Chicago, Connecticut, v.46, p. 1271-1273, 1981.
37. JOHNSON, D. W. ; KIKUCHI, S. Processing for producing soy protein isolates. In Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in: Human Foods and Animal Feedstuffs, T. H. Applewhite (Ed.). **American Oil Chemists Society**, Champaign, IL. p. 66-77, 1988.
38. JU, Z. ; KILARA, A. Aggregation induced by calcium chloride and subsequent thermal gelation of whey protein isolate. **Journal Dairy Science**, Chicago, Connecticut, v. 81, p.925-930, 1998.
39. KANG, J.; MATSUMURA, Y. ; MORI, T. Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gels. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 68, n.5, p. 339-345. may, 1991.
40. KATSUTA, K.; RECTOR, D.; KINSELLA, J. E. Viscoelastic properties of whey protein gels: mechanical model and effects of protein concentration on creep. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 55, n. 4, p. 516 - 520, 1990.
41. KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 56, n. 3, p. 242-258, Mar., 1979.
42. KINSELLA, J. E.; FOX, P. F. Water sorption by proteins: milk and whey proteins. In: ROCKLAND, L. B. (Ed.). **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. New York: Academic Press, 1986, v. 5, cap. 2, p. 91-139.
43. KOSHIYAMA, I. Some aspects of subunit structure of 7S protein in soybean globulins. **Agricultural Biologic Chemistry**, Chicago, Connecticut, v. 35, n. 3, p. 385 - 392, 1971.
44. KRAMER, A. Food texture - definition, measurement and relation to other food quality attributes. In: KRAMER, A.; SZCZESNIAK, A. S. (Ed). **Texture measurements of foods**. Amsterdam: D. Reidel, 1973, chap. 1, p. 1-9.

45. LABUZA, T. P. Properties of water as related to the keeping quality of foods. **Food Science and Technology**, Chicago, Connecticut, v. 50, n.4, p. 618 - 623, 1970.
46. LABUZA, T. P. ; KAAANANE, A.; CHEN, J. Y. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods. **Journal Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 50, n. 2, p. 385 - 391, 1985.
47. LANGTON, M.; HERMANSSON, A. Influence of the microstructure on the sensory quality of whey protein gels. **Food Hidrocolloids**, New York, v. 10, n. 1, p. 179 - 191, 1996.
48. LI-CHAN, E. Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 48, n. 1, p. 47-51, 1983.
49. LÓPEZ DE OGARA, M. C. L.; LAYÑO, M. D.; PILOSOF, A. M.; MACCHI, R. A. Functional properties of soy isolates as affected by heat treatment during isoelectric precipitation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 184-187, 1992.
50. LUSAS, E. W. ; RIAZ, M. N. Soy protein products: processing and use. **Journal Nutritional**, Chicago, Connecticut, v. 125, p. 573-580, 1995.
51. MANGINO, M. E. Gelation of whey protein concentrates. **Food Technology**, Chicago, v.1, n.1, p.114-117, jan, 1992.
52. MANGINO, M. E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal Dairy Science**, Chicago, Connecticut, v. 67, p. 2711-2722, 1984.
53. MATSUDOMI, N., RECTOR, D. G. ; KINSELLA, J. E. **Food Chemistry**, New York, Connecticut, v. 55, n. 1, p. 69 - 73, 1991.
54. MORR, C. V. Current status of soy protein functionality in food systems. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 67, p.265-271, 1990.
55. MORR, C. V.; GERMAN, B. KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. P.; VAN BUREN, J. P. KILARA, A., LEWIS, B., MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 51, p. 1715, 1985.
56. MORR, C. V.; HA, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews In Food Science and Nutrition**, Boca Raton, FL, v. 33, n. 6, p. 431 - 476, 1993.

57. MULVIHILL, D. M. ; KINSELLA, J. E. Gelation of  $\beta$ -Lactoglobulin: effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. **Journal Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 53, n. 1, p. 231-235, 1988.
58. NAISMITH, W. E. F. Ultracentrifuge studies on soya bea protein. **Biochim. Biophys. Acta** 16, p. 203-210. 1955.
59. NAKAI, S.; LI-CHAN, E. Effects of heating on protein functionality. In: PHILLIPS, R. D. AND FINLEY, J. W. (Eds.). **Protein Quality and the Effects of Processing**, New York: Marcel Dekker, 1989, p. 125-130.
60. OKAMOTO, N.; WADA, T.; TAKAGI, S.; YASUMATSU, K. Texture of S-S cross-linked gelatin gels. **Agricultural Biologic Chemistry**, Chicago, Connecticut, v. 37, n. 9, p. 2501-2504, 1973.
61. PAULSSON, M, HEGG, P. O. ; CASTBERG, H. B. Heat-induced gelation of individual whey proteins. A dynamic rheological study. **Journal Food Science**, Chicago, Connecticut, v.51, p. 87, 1986.
62. PELEG, M. Physical characteristics of food powders. In: PELEG, M & BAGLEY, E. B. **Physical properties of foods**, Westport: AVI Publishing Co., 1983, p. 293-323.
63. PENG, I. C.; QUASS, D. W.; DAYTON, W. R. ; ALLEN, C. E. The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin. **Cereal Chemistry**, Washington, v. 61, p. 480-490, 1984.
64. PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M. C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy isolates. 1. Structural and hydratation properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, n.10, p. 2161-2169, 1994.
65. PHILLIPS, L. G., WHITEHEAD, D. M. ; KINSELLA, J. E. Structure-Function properties of food proteins. **Food Science and Technology**, Chicago, Connecticut, 179-204, 1994.
66. PUPPO, M. C.; LUPANO, C. E. ; AÑÓN, M. C. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, v. 43, p. 2356-2361, 1995.
67. PUPPO, M. C. ; AÑÓN, M. C. Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strength and pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3583 - 3589, 1998.

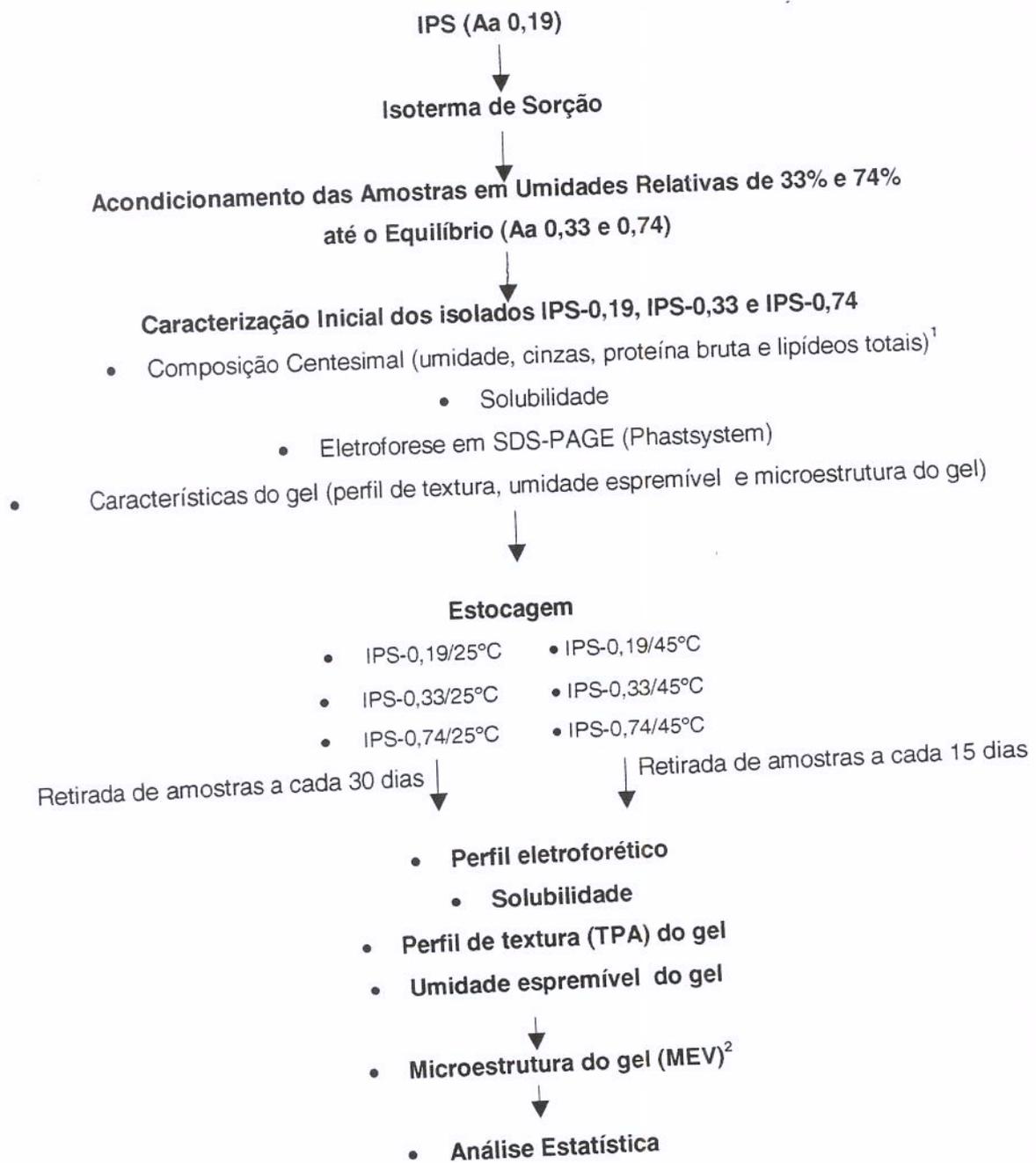
68. RECTOR, D.; KELLA, N. K. D. ; KINSELLA, J. E. **Journal Texture Studies**, Connecticut, v. 20, n. 3, p. 457. 1989.
69. RECTOR, D.; MATSUDOMI, N. ; KINSELLA, J. E. Changes in gelling behavior of whey protein isolate and  $\beta$ -lactoglobulin during storage: Possible mechanism(s). **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 56, n. 3, p. 782-788, 1991.
70. RHEE, K. C. **Functionality in Food Systems**. Hettiarachchy, N. S. and Ziegler, G. R. p. 311-324. 1994.
71. RICHARDSON, S. J.; STEINBERG, M. P. Applications of nuclear magnetic resonance. In: L. B. ROCKLAND and L. R. BEUCHAT (Ed.). **Water activity: theory and applications to food**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1987, 235p.
72. ROCKLAND, L. B.; STEWART, G., In: ROCKLAND, L. B.; STEWART, G. A. (Ed.). **Water Activity: Influence On Food Quality**, New York, 1981, 281p.
73. SAIO, K. ; WATANABE, T. Differences in functional properties of 7s and 11s soybean proteins. **Journal Texture Studies**, Connecticut, v. 9, n.1, p. 135-157, 1978.
74. SATHE, S. K.; LILLEY, G. G.; MASON, A. C.; WEAVER, C. M. High-resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (Glycine max L.) seed proteins. **Cereal Chemistry**, Washington, v.64, n.6, p. 380-384, 1987.
75. SCHMIDT, R. H., ILLINGWORTH, B. L., DENG, J. C. ; CARNELL, 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, p. 529-532, 1979.
76. SCOTT BLAIR, G. W. Rheology in food research. **Advances in Food Research**, New York, v. 8, p. 1-56, 1958. Apud: **Food texture and viscosity**, New York: Academic Press, 1982, 325p.
77. SHEN, J. L. Solubility profile, intrinsic viscosity, and optical rotation studies of acid precipitated soy protein and of commercial soy isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 24, n. 6, p. 784-787, 1976.
78. SHIMADA, K. ; MATSUSHITA, S., Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, p. 413-417, 1980.

79. SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl group/dissulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, n.1, p. 161 - 166, 1989.
80. SHIMIZU, M., SAITO, M. ; YAMAUCHI, Y. Hydrophobicity and emulsifying activity of milky proteins. **Agricultural Biology Chemistry**, v.49, p. 189-193,1985.
81. SIRTORI, C.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; MONETTI, M.; PAZZUCCONI, F. ; GATTI, E. Soy and Cholesterol reduction: clinical experience. **Journal Nutritional**, v. 125, p. 598-605. 1995. *Apud: Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v . 37, n. 4, p. 361-391, 1997.
82. SMITH, A. K. ; CIRCLE, S. J. **Soybeans: Chemistry and Technology**. Connecticut: The Avi Publishing Company. INC, 1972. 470p.
83. SNYDER, H. E. ; KWON, T. W. (Ed.). Functional properties of soy proteins. **Soybean Utilization**, New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1987, p. 163-186.
84. STANLEY, D. W. ; TUNG, M. A. Microstructure of food and its relation to texture. In: DEMAN, J. M.; VOISEY, P. W.; RASPER, V. F.; STANLEY, D. W. (Eds.). **Rheology and Texture in Food Quality**, Westport-Connecticut: AVI Publishing Company, INC., 1976, p.161-192.
85. SZCZESNIAK, A. Classification of textural characteristics. **Journal Food Science**, Chicago, Connecticut, v.28, p. 385, 1963.
86. SZCZESNIAK, A. Instrumental methods of texture measurements. In: KRAMER, A.; SZCZESNIAK, A. S. (Eds.). **Texture Measurements of Foods**, Amsterdam: D. Reidel, , 1973, chap. 6, p. 71-108.
87. TANTEERATARM, K.; WEI, L. S.; STEINBERG, M. P. and YAMASHITA, N. Bound water associated with 7S and 11S soy proteins determined by vapor sorption isotherms and pulsed NMR. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut., v. 55, n. 1, p. 130-132, 1990.
88. TAOUKIS, P. ; LABUZA, T. P. Summary: Integrative Concepts. In: OWEN R.; FENNEMA (Eds.). **Food Chemistry**, New York: Marcel Dekker, INC. , 1996, Chap. 17, p. 1013-1041.
89. TEIXEIRA NETO, R. O. Atividade de água e transformações dos alimentos. JARDIM, D. C. P. (coord.). **Atividade em alimentos..** ITAL, Campinas, cap.2, p. 2-1/9, 1997.

90. THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds—straightforward fractionation and their characterization. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 24, n. 6, p. 1117-1121, Nov./dec., 1976.
91. TOLEDO, R. T. ; KER, Y. C. Influence of shear treatments on consistency and gelling properties of whey protein isolate suspension. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, 57: 82-85, 1992.
92. TROLLER, J. A.; CHRISTIAN, J. H. B. **Water activity and foods**. **Academic Press**, Inc., New York, San Francisco and London, 1978.
93. UTSUMI, S. ; KINSELLA, J. E. Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, p. 297-303, 1985.
94. UTSUMI, S.; DMODARAN, S., KINSELLA, J. E. Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and  $\beta$ -subunits of 7S. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.32, p. 1406-1412. 1984.
95. van den BERG, C.; LENIGER, H. A. The water activity of foods. **Miscellaneous Papers**, Landbouwhogeschool Wageningen, The Netherlands, v. 15, n. 2, p. 231-242, 1978.
96. VAN VLIET, T. Terminology to be used in cheese rheology. **International Dairy Federation Bulletin**, Bruxelles, n. 268, p. 5-15, 1991.
97. VOISEY, P. W. Instrumental measurement of food texture. In: deMAN, J. M.; VOISEY, P. W.; RASPER, V. F.; STANLEY, D. W. (Ed). **Rheology and Texture in Food Quality**, Westport-Connecticut :AVI Publishing Company, INC, 1976, chap. 4, p. 79-141.
98. WAGNER, J. R. ; AÑON, M. C. Influence of denaturation hydrophobicity and sulphhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, Connecticut, v. 55, n. 3, p. 765-770, May/June, 1990.
99. WOLF, W. J. ; BRIGGS, D. R. Ultracentrifugal investigation of the effect of neutral salts on the extraction of soybean proteins. **Arch. Biochemistry Biophysical**. v. 63, p. 40-49, 1956.
100. WOLF, W. J. Purification and properties of the proteins. Chapter 4 In: SMITH, A. K. ; CIRCLE, S. J. (Eds.). **Soybeans: Chemistry and technology**, Westport, Conn: Avi Publishing Co., 1972, 341p.

101. WOLF, W. J., ; COWAN, J. C. Soybeans as a Food Source. **CRC Press**, Boca Raton, FL, 1975.
102. YAO, J.J., TANTEERATARM K. ; WEI, L. S. Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 67, n. 12, p. 974-979, december, 1990.
103. ZIRBEL, F. ; KINSELLA, J. E., 1988. Factors affecting the rheological properties of gels made from whey protein isolate. **Milchwissenschaft**, v. 43, p. 691-693.

## 8. ANEXO



**Anexo 1.** Fluxograma do experimento de estocagem dos isolados protéicos de soja.

<sup>1</sup> Os teores de proteína, cinzas e lipídeos dos IPS-0,33 e IPS-0,74 foram determinados a partir dos valores obtidos para o IPS-0,19. <sup>2</sup> Apenas alguns pontos foram avaliados por MEV.