



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

***Interação de proteínas do soro de leite com
polissacarídeo: fracionamento e estudo das
propriedades funcionais dos complexos***

Caroline Dário Capitani
Nutricionista

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Orientadora

Campinas, 2004



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

***Interação de proteínas do soro de leite com
polissacarídeo: fracionamento e estudo das
propriedades funcionais dos complexos***

Caroline Dário Capitani
Nutricionista

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Orientadora

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

Campinas, 2004

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

C172i Capitani, Caroline Dário
Interação de proteínas do soro de leite com polissacarídeo:
fracionamento e estudo das propriedades funcionais dos
complexos / Caroline Dário Capitani. – Campinas, SP: [s.n.],
2004.

Orientador: Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Proteínas. 2.Soro de leite. 3.Coacervação.
4.*Propriedades funcionais. 5.*Carboximetilcelulose.
I.Pacheco, Maria Teresa Bertoldo. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Maria Teresa Bertoldo Pacheco

(Orientadora) FZEA/USP

Prof. Dr. Carlos Raimundo F. Grosso

(Membro) FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

(Membro) FEA/UNICAMP

Prof. Dra. Flávia Maria Netto

(Membro) FEA/UNICAMP

*Aos meus pais **Luiz Roberto e Ana Maria**, preciosidades da minha vida,
por todo amor, paciência,
ensinamentos e incentivo hoje e
sempre!*

Dedico

A maravilhosa riqueza da experiência humana perderia algo de uma alegria gratificante se não houvesse limites a serem superados. A hora de estar no topo da colina não teria metade do encanto se não houvesse vales sombrios a serem atravessados.

Hellen Keller

“...descobri como é chegar quando se tem paciência. E para chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada querer.”

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

*À Faculdade de Engenharia de Alimentos / UNICAMP,
especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição
pela oportunidade profissional e pessoal.*

*Ao CYTED (Programa Ibero Americano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) –
Projeto XI-17 “Desarrollo de ingredientes
de funcionalidad específica”, pela
oportunidade de intercâmbio e apoio
financeiro.*

*Ao ITAL,
Ao Centro de Química - Bioquímica, e ao Grupo Especial de Engenharia
pela disposição dos laboratórios e equipamentos,
essenciais para a execução deste trabalho.*

Ao CNPq e aos meus pais, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

*A Denver-Cotia (SP) pela doação da CMC e ao Laticínio Queijo da Fazenda - JB
(Espírito Santo do Pinhal - SP) pelo soro
de leite.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS por me conceder uma vida repleta de bênçãos e realizações.

*Agradeço especialmente a **Profa. Dra. Maria Teresa B. Pacheco** pela carinhosa amizade, confiança, apoio e dedicação na competente orientação do trabalho.*

*A minha **família**, em especial aos meus irmãos **Daniel, Raphael e Ilma**, pelo carinho e pela torcida.*

*Aos amigos do grupo especial de engenharia (Ital), **Alfredo Vitali, Homero, Flávio, Karina e Daniel**, por me ensinarem sempre com atenção e carinho. Vocês foram imprescindíveis!*

*Em especial as **Dras. Profas. Ana Maria Pilosof e Maria Cristina Añon**, pela excelente oportunidade profissional e pessoal, e principalmente pelo carinho e pela amizade com que me receberam (sempre).*

*Aos **professores membros da banca** pelas sugestões e contribuições apresentadas.*

*Ao **Prof Sgarbieri** pelas sugestões, oportunidade e auxílio.*

*Aos amigos e funcionários do Centro de Química do Ital, **Vera Baldini, Luzimara, Sandra, Tati, Cissa, Kátia, Beth Gomes, Beth Lima, Nádia, Helaine, Renatinho e Renato**, pelo auxílio essencial e pelo aprendizado.*

*Às amigas e companheiras de laboratório **Caroline Steel, Leonice, Leonídia, Margareth, Janesca, Saula e Denise**, que me ensinaram muito a cada dia de trabalho e convivência!*

*Aos amigos de todos os momentos - “Figuras especiais”: **Duda, Noemi, Suzi, Fábio, Janai, Fer Ventura, Luciano, Soninha, Larissa e Juliana**. Obrigada por fazerem parte da minha vida!*

Às (novas) amigas **Larissa e Samanta**, pela colaboração na obtenção das amostras! Obrigada
pela sincera amizade!

Aos amigos argentinos **Oscar Perez, Rosa Baeza e Paula (UBA), Sara Molina e Gonzalo**,
(CIDCA), e a todos dos laboratórios que me ajudaram: não tenho palavras para agradecer
todo aprendizado de vida que tive com vocês.... **“muchísimas gracias”!**

Aos funcionários e amigos do DEPAN,
Eliana, Adriana, Elisabete, Carla, Izabela, Ana Sílvia, Verinha, Cidinha, Graça e Chico pela
amizade e apoio em todas as horas.

Às amigas **Fernanda e Kathleen (DTA)**, por me auxiliarem com carinho e paciência no
Planejamento Experimental!

À **Luciana (DEA)**, por me auxiliar com as análises e discussões de Viscosidade.

Ao **Cosme**, pela paciência e dedicação.

Aos amigos da **Biblioteca** e do **Centro de Informática** da FEA, sempre dispostos a ajudar.

Ao **Zeca** e ao **Paulinho (Laquip - Bio)**, pela disposição em me ajudar com as eletroforeses.

Ao **Cotrim**, pelo amor, incentivo e paciência, sempre!

Aos amigos da Residência Universitária Mayor, em especial à **Louise, Gisela, Ernesto e**
Matias pela valiosa amizade e pelo apoio nos momentos de saudade, **“Gracias”!**

Por **todas as amizades que nasceram** nesta etapa, e a **todos os amigos (as) desta vida**, que de
uma maneira ou de outra sempre me incentivaram e contribuíram para tornar possível a
realização deste trabalho:

Meus mais sinceros agradecimentos...

Caroline

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xviii
RESUMO GERAL.....	xxi
GENERAL SUMMARY.....	xxii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1- SORO DE LEITE.....	6
1.1- Proteínas do soro de leite.....	9
1.1.1- β -Lactoglobulina (β -Lg).....	9
1.1.2- α -Lactoalbumina (α -La)	10
1.1.3- Soro Albumina Bovina (BSA).....	11
1.1.4- Imunoglobulinas (Igs)	11
1.1.5- Lactoferrina	11
2- POLISSACARÍDEOS E CARBOXIMETILCELULOSE	12
2.1- Polissacarídeos	12
2.1.1- Celulose e Carboximetilcelulos.....	14
3- INTERAÇÃO PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS	18
3.1- Tipos de interação	18
4- PROPRIEDADES FUNCIONAIS	23
4.1- Propriedades funcionais de proteínas e de complexos com polissacarídeos	24
4.1.1- Solubilidade	24
4.1.2- Viscosidade	24
4.1.3- Formação e estabilidade de espuma	26
4.1.4- Formação e estabilidade de emulsões	27
4.1.5- Geleificação	30

5- RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE COM CARBOXIMETILCELULOSE.....	37
RESUMO	37
1- INTRODUÇÃO	39
2- MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1- Matéria-prima	41
2.2- Métodos	41
2.2.1- Obtenção dos complexos fracionados	41
2.2.2- Estudo da concentração de CMC (%) e do pH para otimização da obtenção dos complexos.....	44
2.2.3- Obtenção dos complexos em escala piloto.....	45
2.2.4- Análises químicas.....	49
2.2.4.1- Nitrogênio total.....	49
2.2.4.2- Lipídeos totais.....	49
2.2.4.3- Umidade, sólidos totais e resíduo mineral (cinzas).....	49
2.2.5- Determinação de carboidratos solúveis.....	49
2.2.6- Eletroforeses	50
2.2.6.1- Estudo eletroforético das frações precipitadas – SDS-PAGE	50
2.2.6.2- Estudo eletroforético das frações protéicas solúveis em diferentes valores de pH – eletroforese NATIVA.....	51
2.2.7- Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	51
-Parâmetros calorimétricos.....	52
2.2.8- Tratamento estatístico.....	53
3- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
3.1- Testes preliminares para definição da concentração de CMC e de pH..	53
3.1.1- Estudo da melhor concentração de CMC (%).....	53
3.1.2- Otimização do pH para obtenção da fração proteínas totais (PT/CMC).....	55
3.2- Caracterização dos complexos, sobrenadantes e soro de leite desnatado.....	57
3.3- Efeito da variação de pH na estabilidade dos complexos.....	61

3.3.1- Determinação do teor de proteínas e de carboidratos (CMC) solúveis	61
3.4- Estudo eletroforético das frações precipitadas e dos complexos solubilizados em distintos valores de pH.....	64
3.4.1- Estudo eletroforético das frações precipitadas – SDS-PAGE.....	64
3.4.2- Estudo eletroforético das frações protéicas solúveis em diferentes valores de pH – eletroforese NATIVA.....	65
3.5- Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	73
4- CONCLUSÕES.....	79
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

CAPÍTULO 3. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SOLUBILIDADE, GELEIFICAÇÃO E VISCOSIDADE APARENTE, DOS COMPLEXOS PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE-CARBOXIMETILCELULOSE.....	82
RESUMO	82
1-INTRODUÇÃO	84
2- MATERIAIS E MÉTODOS	86
2.1- Materiais	86
2.2- Métodos	86
2.2.1- Solubilidade de proteínas em função da força iônica	86
2.2.2- Solubilidade das proteínas e de CMC em função do pH.....	87
2.2.3- Geleificação.....	87
2.2.3.1- Preparo dos géis	87
2.2.3.2- Medidas de oscilações mecânicas (Reometria).....	88
2.2.3.3- Avaliação e Caracterização estrutural dos géis.....	88
2.2.4- Viscosidade aparente	89
2.2.4.1- Modelagem e obtenção dos parâmetros.....	90
3- RESULTADOS E DISCUSSÕES	90
3.1- Solubilidade.....	90
3.2- Solubilidade das proteínas e de CMC em função do pH.....	92
3.3- Geleificação.....	95
3.3.1- Medidas de oscilação mecânica dos géis (Reometria).....	95

3.3.2- Avaliação e Caracterização estrutural dos géis.....	103
3.4- Viscosidade aparente.....	104
3.4.1- Modelagem e obtenção dos parâmetros reológicos.....	104
3.4.1.1- Curvas de escoamento e cálculos dos modelos reológicos	105
3.4.2 – Curvas de viscosidade aparente em função da taxa de deformação.	109
4- CONCLUSÕES	111
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

CAPÍTULO 4. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SUPERFÍCIE: FORMAÇÃO DE ESPUMAS E ESTABILIDADE DE EMULSÕES PREPARADAS COM OS COMPLEXOS β-Lg/CMC, α-La/CMC e PT/CMC	115
RESUMO.....	115
1- INTRODUÇÃO	117
2- MATERIAIS E MÉTODOS	119
2.1- Materiais	119
2.2- Métodos.....	120
2.2.1- Espuma.....	120
2.2.1.1- Planejamento experimental e análise estatística.....	120
2.3- Emulsão.....	121
2.3.1- Preparo das emulsões.....	121
2.3.2- Análise das emulsões utilizando fotos em microscópio óptico.....	122
2.3.3- Estabilidade das emulsões.....	122
2.3.4- Medidas da estabilidade das emulsões.....	122
2.3.4.1- “Back Scattering” inicial (BS ₀).....	122
2.3.4.2- Constante de cremado (K).....	123
2.3.4.3- Porcentagem de coalescência (%C).....	123
2.4- Análise dos resultados.....	123
3- RESULTADOS E DISCUSSÕES	124
3.1- Propriedades Espumantes.....	124
3.1.1- Planejamento experimental e análise estatística.....	126
3.2- Emulsão.....	135

3.2.1- Valores de “Back-Scatering” inicial (BSo).....	135
3.2.2- Constante de cremado (K).....	138
3.2.3- Porcentagem de coalescência (%C).....	140
3.2.4- Análise das emulsões utilizando fotos em microscópio óptico.....	143
4- CONCLUSÕES.....	147
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
CONCLUSÕES GERAIS.....	152

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Algumas propriedades físico-químicas das proteínas do soro.....	7
-----------------	---	---

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composição centesimal do soro de leite desnatado e das amostras de proteínas complexadas com CMC, em base seca.....	59
-----------------	---	----

Tabela 2	Rendimento em peso seco e recuperação protéica nos complexos secos por liofilização a partir de 50L de soro de leite desnatado.....	60
-----------------	---	----

Tabela 3	Valores de T_o e T_p obtidos com as amostras de WPC e complexos fracionados a 25% de concentração, e mescla de WPC:CMC a 20%, todas ajustadas em $pH\ 6,5 \pm 0,5$	73
-----------------	--	----

Tabela 4	Valores de Temperatura de desnaturação (T_p) das proteínas do soro de leite em variados valores de pH	74
-----------------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Parâmetros utilizados para classificação dos modelos obtidos a partir das curvas de escoamento (Herschel-Bulkley, Newtoniano, Lei de Potência -Fluido Pseudoplástico e Dilatante).....	90
-----------------	--	----

Tabela 2	Porcentagem de Solubilidade Protéica (%SP) dos três complexos em pH original das amostras (NaCl 0 M) e em de NaCl com diferentes concentrações.....	91
-----------------	---	----

Tabela 3	Valores obtidos a partir dos cálculos de modelo reológico para a amostra α -La/CMC, a 0,5 e 1,0% de concentração em $pH\ 6,0$	107
-----------------	--	-----

Tabela 4	Valores obtidos a partir dos cálculos de modelo reológico para a amostra β -Lg/CMC a 0,5 e 1,0% de concentração em $pH\ 6,0$	108
-----------------	--	-----

Tabela 5	Valores obtidos a partir dos cálculos de modelo reológico para a amostra PT/CMC a 0,5 e 1,0% de concentração em $pH\ 6,0$	108
-----------------	---	-----

CAPITULO 4

Tabela 1	Níveis codificados e reais das duas variáveis utilizadas no planejamento.....	121
Tabela 2	Valores de Capacidade Espumante e Estabilidade da Espuma ($T_{1/2}$ drenagem e $T_{1/2}$ de colapso) das amostras a 1% de concentração, em pH 2,0; pH original de obtenção dos complexos e pH 6,0.....	125
Tabela 3	Matriz decodificada e resultados de volume de espuma formado.....	127
Tabela 4	Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para formação de espuma para o complexo α -La/CMC.....	128
Tabela 5	Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para formação de espuma para o complexo β -Lg/CMC.....	129
Tabela 6	Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para formação de espuma para o complexo PT/CMC.....	129
Tabela 7	Análise de variância do modelo ajustado para formação de espuma utilizando o complexo α -La/CMC	130
Tabela 8	Análise de variância de modelo ajustado para formação de espuma do complexo β -Lg/CMC	131
Tabela 9	Análise de variância de modelo ajustado para formação de espuma do complexo PT/CMC	132
Tabela 10	Valores de Porcentagem de Coalescência (% C) dos três complexos em concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL, em valores de pH originais de obtenção; sendo pH 4,0 para a β -Lg/CMC; 3,2 para a α -La/CMC e 3,0 para a PT/CMC.....	141

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Estrutura da carboximetilcelulose sódica (CMC)..... 15
- Figura 2** Principais tendências de comportamento da mistura de proteínas com polissacarídeos..... 19

CAPÍTULO 2

- Figura 1** Fluxograma de obtenção das principais frações protéicas do soro complexadas com polissacarídeos - β -Lg/CMC e α -La/CMC (Hidalgo e Hansen, 1971)..... 43
- Figura 2** Fluxograma de obtenção de proteínas totais do soro complexadas com CMC – PT/CMC (Hansen, Hidalgo e Gould, 1971)..... 44
- Figura 3** Sistema planejado para fracionar os complexos proteínas/CMC. As soluções permanecem sob agitação dentro do béquer (A), enquanto a bomba peristáltica (B) alimenta a centrífuga de cesto (C) de maneira contínua..... 47
- Figura 4** Vista superior da centrífuga de cesto (C) com o pescador que recolhe o sobrenadante e o precipitado (D) dentro do cesto..... 47
- Figura 5** Parâmetros calorimétricos avaliados em relação à desnaturação dos complexos coacervados de proteínas de soro de leite com CMC..... 53
- Figura 6** Concentração de proteína bruta nos sobrenadantes 1 e 2, após a complexação e precipitação das frações com diferentes concentrações de CMC (0,1 a 0,9% p/v)..... 55
- Figura 7** Concentração de proteínas no sobrenadante após precipitação com CMC 0,3% (p/v) na relação 3:1 (proteínas: polissacarídeos p/p) em diferentes pHs, e no soro de leite desnatado..... 56
- Figura 8** Soro de leite após o desnatamento (1) e sobrenadantes (2) e (3), após os respectivos fracionamentos, segundo a metodologia descrita na Figura 1 57

Figura 9	Concentração (mg/100mL) de proteínas e CMC solúveis em diferentes valores de pH, a partir de uma concentração de 1 mg/mL de complexo. As letras A, B e C representam, respectivamente, as amostras β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC.....	63
Figura 10	Eletroforese SDS-Page, em gel 12,5% de poliacrilamida. Colunas: 1- Padrão de baixo peso molecular; 2 e 3- fração PT/CMC; 4 e 5- fração β -Lg/CMC; 6 e 7- fração α -La/CMC; 8- Padrão de β -Lg.....	65
Figura 11	Eletroforese Page-Native (gel de poliacrilamida 10%) da amostra de α -La/CMC em diferentes pHs. As duas últimas colunas correspondem aos padrões de β -Lg e α -La, respectivamente.....	67
Figura 12	Eletroforese Page-Native (gel de poliacrilamida 10%) da amostra de β -Lg/CMC em diferentes pHs. A última coluna corresponde ao padrão de β -Lg.....	69
Figura 13	Eletroforese Page-Native (gel de poliacrilamida 10%) da amostra de PT/CMC em diferentes pHs. A última coluna corresponde ao padrão de β -Lg.....	71
Figura 14	Temperatura inicial de desnaturação (T_0) das três amostras, a 25% de concentração, em diferentes valores de pH.....	75
Figura 15	Temperatura máxima de desnaturação (T_p) das três amostras a 25% de concentração, em diferentes valores de pH.....	76
Figura 16	Valores de Entalpia de desnaturação ΔH_T (J/g de proteína), dos três complexos em diferentes faixas de pH.....	77
Figura 17	Valores de entalpia de desnaturação (ΔH_T – J/g) dos três complexos e da amostra WPC em pH 6,5.....	78
CAPÍTULO 3		
Figura 1	Concentração de proteínas solúvel (mg/mL) em sobrenadantes obtidos a partir de soluções a 1mg/mL de amostra (β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC) variando o pH (2,0-6,0).....	93
Figura 2	Concentração de CMC solúvel (mg/mL) em sobrenadantes obtidos a partir de soluções a 1mg/mL de amostra (β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC) variando o pH (2,0-6,0).....	93

Figura 3	Varredura de frequência da amostra α -La/CMC em pH 5,0 a 25°C.	95
Figura 4	Varredura de frequência da amostra α -La/CMC em pH 5,0, depois de aquecida a 90 °C e resfriada até 25°C.....	97
Figura 5	Varredura de frequência da amostra β -Lg/CMC em pH 5,5, a 25°C.....	99
Figura 6	Varredura de frequência da amostra β -Lg/CMC em pH 5,5, depois de aquecida a 90 °C e resfriada até 25°C.....	99
Figura 7	Fotos ilustrativas dos géis formados em pH 5,0 a 20% de concentração com os complexos β -Lg/CMC (A), α -La/CMC (B) e PT/CMC (C), antes e depois do processo de aquecimento (90°C/45 min) e resfriamento ($\pm 4^\circ\text{C}$).....	101
Figura 8	Valores de Dureza (N) dos géis de α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC em função do pH.....	103
Figura 9	Valores de Elasticidade (N) dos géis de α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC em função do pH.....	104
Figura 10	Curva de escoamento (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) das amostras β -Lg/CMC e α -La/CMC a 0,5% e em pH 6,0.....	105
Figura 11	Curva de escoamento (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) da amostra PT/CMC a 0,5% e em pH 6,0.....	106
Figura 12	Curva de escoamento (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) das amostras β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC a 1,0% e em pH 6,0.....	106
Figura 13	Curvas comparativas da viscosidade aparente x taxa de deformação, das soluções dos três complexos a 0,5% de concentração em pH 6,0.	109

Figura 14	Curvas comparativas da viscosidade aparente x taxa de deformação das soluções dos três complexos a 1,0% de concentração em pH 6,0.....	110
CAPITULO 4		
Figura 1	Superfície de resposta e curva de contorno do complexo α -La/CMC para as concentrações de NaCl (M) e valores de pH para a formação de espuma (%), à concentração de 1%.....	133
Figura 2	Superfície de resposta e curva de contorno do complexo β -Lg/CMC para as concentrações de NaCl (M) e valores de pH para a formação de espuma (%), à uma concentração de 1%.....	133
Figura 3	Superfície de resposta e curva de contorno do complexo PT/CMC para as concentrações de NaCl (M) e valores de pH para a formação de espuma (%), à uma concentração de 1%.....	135
Figura 4	Valores de Back-Scatering inicial (BSo) do complexo β -Lg/CMC em diferentes valores de pH, nas concentrações de 1; 2,5 e 5 mg/mL.....	137
Figura 5	Valores de Back-Scatering inicial (BSo) do complexo α -La/CMC em diferentes valores de pH, nas concentrações de 1; 2,5 e 5 mg/mL.....	137
Figura 6	Valores de Back-Scatering inicial (BSo) do complexo PT/CMC em diferentes valores de pH, nas concentrações de 1; 2,5 e 5 mg/mL.....	138
Figura 7	Valores de K dos três complexos em pH 2,0, e concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL.....	139
Figura 8	Valores de K dos três complexos em pH original (4,0 para a β -Lg/CMC; 3,2 para a α -La/CMC e 3,0 para a PT/CMC), em concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL.....	140
Figura 9	Valores de K dos três complexos em pH 6,0 e em concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL.....	141
Figura 10	Fotos das emulsões a 5 mg/mL de concentração, em aumento 20X.....	147

RESUMO GERAL

Na indústria de laticínios, a coacervação entre o soro de leite com hidrocolóides pode ser utilizada no fracionamento e recuperação das suas proteínas e, ainda, contribuir na redução da poluição ambiental. O objetivo do trabalho foi estudar a interação entre proteínas do soro lácteo, obtido a partir da fabricação do queijo “minas”, com o polissacarídeo aniônico carboximetilcelulose (CMC), utilizando a técnica de coacervação complexa em diferentes faixas de pH. As proteínas foram complexadas e fracionadas obtendo três diferentes amostras. Para tal, foi feito ajuste do pH e da concentração do hidrocolóide. Os complexos foram classificados como precipitado 1: β -Lg/CMC, precipitado 2: α -La/CMC e precipitado total: PT/CMC, sendo obtidos em valores de pH 4,0; 3,2 e 3,0, respectivamente. Em seguida foram avaliadas variações nas faixas de pH na desestabilização deste complexo. Foram utilizados parâmetros de pH, força iônica e concentração de amostra no estudo de algumas propriedades funcionais tecnológicas, tais como solubilidade, geleificação, viscosidade, formação de espuma e estabilidade de emulsões. Os resultados de porcentagem de proteínas e CMC solúveis e de eletroforese mostraram que os coacervados são parcialmente descomplexados em valores de pH 2, 5 e 6. As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) permitiram concluir que a presença do hidrocolóide aumentou a estabilidade protéica ao processo de desnaturação térmica. O aumento da concentração de NaCl (0,5M), influenciou positivamente a solubilidade protéica (%SP), contudo, nas faixas de pH correspondentes às de obtenção dos complexos, os resultados foram mínimos para esta propriedade (%SP). Nos testes de geleificação a 20% de concentração, os valores de G' foram maiores que os de G'' , concluindo-se que todos os complexos formaram um sólido-viscoelástico. A viscosidade das soluções (pH 6,0) foi maior para as amostras de α -La/CMC e β -Lg/CMC. Em relação às espumas, a melhor capacidade espumante se deu em pH 2,0 com o complexo α -La/CMC. A interação entre os parâmetros testados (pH e concentração de NaCl) foi significativa ($p < 0,05$) para a porcentagem de formação de espuma (%) com os complexos α -La/CMC e β -Lg/CMC. As análises das emulsões permitiram afirmar que no pH 6,0 e a 5 mg/ml de concentração de complexo houve maior estabilidade das amostras ao processo de formação do cremado e coalescência, sendo a PT/CMC a amostra menos estável em pH de formação (3,0) do coacervado.

Palavras-chave: Proteínas do soro, coacervação, solubilidade, espuma, emulsão, carboximetilcelulose

GENERAL SUMMARY

In dairy industries the coacervation between whey with hydrocolloid might be utilized in the fractionation and recovery of the proteins and contribute to reduce in the ambient pollution. The aim of this work was to study whey protein interaction as a result of cheese type "Minas" manufacturing with anionic polysaccharide carboxymethyl-cellulose (CMC) using the complex coacervation technique. The proteins were fractionated and three different complexes. The variables of the conditions optimization of selected fractionation and precipitation were taken out from hydrocolloid concentration and pH. The complexes were classified as: precipitated 1: β -lg/CMC, precipitated 2: α -la;CMC and total precipitated: whey total protein (PT/CMC) and the values of the pH were 4.0; 3.2; and 3.0, respectively. The obtained complexes were studied through the percentage analyses of soluble proteins-CMC and native-PAGE. The results demonstrated that the complexes ones partially free as they move further from pH original values of attainment and complexes precipitation. DSC analyses could conclude that hydrocolloid presence increases protein stability of the thermal denaturation process. It was analyzed some technological functional properties such as solubility, gelling, viscosity, foam properties and emulsion stability in different samples. Extrinsic parameters analysis varied for pH, ionic force and sample concentration. The increase of NaCl (0.5M) influenced in a positive way the solubility protein. However, the solubility (%SP) was minimum compared to the corresponding complexes obtention of pH. G'' values had been always superior to G' for gelling tests and one could conclude that all complexes formed a viscous solid (20% of concentration). In pH 6.0, solutions viscosity was higher for α -lactoalbumin/CMC and β -lactoglobulina/CMC samples. Related to foaming characteristics, the best foaming capacity occurred in a α -lactoalbumin/CMC with pH 2.0. Related to the interaction between pH parameters and NaCl concentration one could notice a significant increase to foam formation (%) with α -lactoalbumin/CMC and β -lactoglobulina/CMC complexes. The results of emulsions stability analyses demonstrated that pH 6.0 and 5mg/mL concentration had samples greater stability to creaming and coalescence, and PT/CMC presented the lowest formation and complexes precipitation in pH 3.0.

Key Words: whey proteins, coacervation, solubility, foam, emulsion, carboxymethyl-cellulose

INTRODUÇÃO GERAL

Durante a fabricação do queijo e da obtenção da caseína comercial, obtém-se um conjunto de subprodutos chamado de soro de leite. Para cada litro de leite utilizado no processamento, produz-se 0,6 a 0,9 L de soro. Este subproduto é valioso, pois possui um teor de proteínas solúveis de composição elevada em amino ácidos essenciais, principalmente os sulfurados, semelhante em composição as do leite materno humano (NEVES, 2001; PACHECO, 2002).

O fracionamento das proteínas soro lácteas, utilizando a técnica de coacervação com carboidratos complexos é um processo alternativo e interessante do ponto de vista econômico, para a indústria laticinista. Esta técnica foi explorada por alguns pesquisadores até o advento dos processos de ultrafiltração em membrana (FONSECA; BRADLEY Jr.; 2001).

A técnica de interação com hidrocolóides comestíveis, além de promover a recuperação das proteínas do soro lácteo, oferece uma opção para o desenvolvimento de novos produtos para aplicação na indústria de alimentos, aumentando oportunidades para o agronegócio. Os ingredientes podem ser utilizados na elaboração de produtos fontes de proteínas de alto valor biológico e nutricional, direcionado para formulação de suplementos imunológicos, alimentos de baixo teor calórico e ainda para praticantes de atividade física (SGARBIERI et al., 2000).

Do ponto de vista macroscópico dos alimentos, a mistura destes dois biopolímeros (proteínas do soro e hidrocolóides comestíveis) possui capacidade de produzir produtos com características diferenciadas de viscosidade, estabilidade, textura e sensação bucal, contribuindo também nas propriedades geleificantes e na formação e estabilização de sistemas espumados e emulsionados (TOLSTOGUZOV, 1998; KRUIF; TURNIER, 2001).

Um dos polissacarídeos mais utilizados como espessante de sistema alimentícios é a carboximetilcelulose (CMC). Sua aplicação na técnica de complexação e fracionamento de proteínas do soro de leite foi citada em trabalhos

pioneiros como o de Hidalgo; Hansen (1971). Neste estudo, as frações β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina foram precipitadas de maneira seletiva em valores de pH 4,0 e 3,2, respectivamente.

Quando se faz a mistura de dois polímeros, alguns fatores são essenciais para classificar o tipo de sistema que será formado e a sua funcionalidade tecnológica. Dentre os parâmetros que interferem na interação, destacam-se o pH, a força iônica, conformação molecular, densidade de cargas e relação estequiométrica entre as duas substâncias (MORR; HA, 1993).

Em geral, a interação forma um sistema classificado como coacervado quando o meio se encontra com valores de pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas (pI) e acima da constante de ionização das gomas (pK). Neste caso, proteínas e hidrocolóides estão unidos por interações do tipo eletrostática e se concentram numa mesma fase (SCHMITT, 1998; TOLSTOGUZOV, 1997).

A complexação contribui na melhora da estabilidade térmica protéica e pode modificar propriedades reológicas da interface de sistemas aerados e emulsionados, contribuindo na sua estabilidade (SCHMITT, 1998). No entanto, alterações nos valores de pH e força iônica podem levar a desestabilização e conseqüentemente a descomplexação do sistema (TOLSTOGUZOV, 1997, 1998; FONSECA; BRADLEY Jr, 2001).

Neste sentido, quando a coacervação é aplicada para a formação de espuma ou emulsões, as proteínas migram e adsorvem na interface formando um filme estável, enquanto os hidrocolóides conferem estabilidade na dispersão através da sua ação interfacial (viscosidade). Desta maneira, observa-se uma melhora na estabilidade de sistemas espumados e emulsionsnados (DICKINSON, 2003).

Quando aplicada no processo de geleificação, a mistura de proteínas e polissacarídeos proporciona melhora da textura e da estabilidade destes alimentos (TOLSTOGUZOV, 1986).

Neste trabalho, foram estudados parâmetros de pH e concentração do biopolímero para otimização do processo de fracionamento das proteínas do soro de leite por coacervação, utilizando como hidrocolóide a carboximetilcelulose sódica (CMC). Foram realizadas análises da estabilidade térmica das proteínas complexadas: α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC (proteínas totais), e em seguida, foram avaliadas quanto ao desempenho nas propriedades funcionais tecnológicas de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, estabilidade de emulsões, geleificação e viscosidade.

Os resultados obtidos, além de poder direcionar a aplicação deste produto na elaboração de novos produtos formulados, também poderão contribuir para o desenvolvimento econômico-social, no sentido de agregar valor comercial ao soro de leite, considerado excedente para a indústria de queijo. Adicionalmente, poderá criar mecanismos de redução da poluição ambiental, preservando o meio ambiente através da recuperação de proteínas residuais e, conseqüentemente, reduzir a demanda biológica de oxigênio (BOD).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 17, p. 25-39, 2003.

FONSECA, L.M.; BRADLEY JR, R. Precipitação de proteínas por meio de coacervação com carboidratos complexos. Revista do Instituto "Cândido Tostes". **Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.341-348, 2001.

HIDALGO, J. E HANSEN, M.T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 9, p. 270-1274, 1971.

KRUIF, C.G.; TURNIER, R. Polysaccharide interactions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, p. 555-563, 2001.

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

NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar**, 2001. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Embrapa, p. 97-108.

PACHECO, M.T.B. **Obtenção e avaliação de hidrolisados a partir de concentrado protéico de soro de leite**. 2002, p.40. Tese (Projeto de pós-doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p.40, 2002.

SCHIMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews un Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SGARBIERI, Valdemiro C.; RANGEL, Humberto A.; PACHECO, Maria Teresa Bertoldo; ZINSLY, Patrícia F.; DIAS, Nádia F.g. Pereira. Novel Nutritional and physiological functions of milk proteins. **In: 4TH International Conference of Food Science and Technology**. China: Light Industry Press, 2000. v. 1, p. 296-209.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional Properties of protein-polysaccharide mixtures. In: MITCHELL, J.R.; LEDWARD, D.A. (Eds.). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, 1986. p. 385-415.

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

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: HILL, S.E.; LEDWARD, D.A.; MITCHELL, J.R. (Eds.). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, 1998. Cap. 6, p. 252- 277.

OBJETIVOS

1- Objetivo geral

Recuperar as proteínas do soro de leite bovino através da técnica de fracionamento por coacervação complexa, utilizando o polissacarídeo aniônico carboximetilcelulose (CMC), e avaliar algumas propriedades funcionais dos complexos obtidos.

2- Objetivos específicos

2.1- Estudar o efeito do pH, concentração e proporção entre proteínas e polissacarídeos para otimização da recuperação e do fracionamento das proteínas do soro de leite bovino;

2.2- Precipitar de maneira seletiva as duas frações protéicas do soro de leite (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) e as proteínas totais (PT);

2.3- Caracterizar as frações quanto à composição química;

2.4- Caracterizar as frações quanto ao perfil eletroforético e à temperatura de desnaturação;

2.5- Avaliar a influência do pH na desestabilização dos complexos;

2.6- Avaliar as propriedades funcionais das diferentes frações, tais como solubilidade, geleificação, viscosidade aparente, formação e estabilidade de espumas e estabilidade de emulsões.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- SORO DE LEITE

O leite constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e humanos de todas as idades. Pode ser considerado um dos alimentos mais completos da natureza e o único que satisfaz às necessidades do recém-nascido nos primeiros seis meses de vida (SGARBIERI et al., 2000).

O soro de leite, um dos subprodutos resultantes da fabricação do queijo e da caseína, contém aproximadamente 20% das proteínas totais do leite de vaca. Dependendo do tipo de processamento utilizado, o soro é classificado como doce ou ácido, sendo o primeiro obtido pela coagulação da caseína através da adição de enzimas proteolíticas (fabricação do queijo tipo “cheddar”, mussarela, prato e minas), e o segundo, por adição de ácido láctico, como utilizado na fabricação do queijo tipo “cottage” (MORR; HA, 1993; NEVES, 2001).

O soro do leite é considerado um subproduto de alto valor nutricional, por apresentar um balanço adequado de aminoácidos essenciais. Em geral, estes aminoácidos apresentam valores que superam as doses recomendadas para crianças de 2 a 5 anos e para adultos (NEVES, 2001; U.S. Dairy Export Council, 1997). As proteínas que o compõe diferem das caseínas por apresentar alto teor de aminoácidos sulfurados e teores reduzidos de aminoácidos de cadeia aromáticas (BORGES et al., 2001).

A composição do soro de leite pode ser mais variável que a do leite de vaca devido às diferenças nas técnicas de manufatura, incluindo os passos da lavagem do coágulo durante a fabricação de queijos. As diferenças nestes fatores podem influenciar no seu conteúdo final de proteínas e gordura. Além disso, a sazonalidade é outro fator de grande influência em sua composição (MODLER, 2000; NEVES, 2001).

Muitos dos produtos lácteos utilizados hoje na indústria de alimentos são derivados do soro doce ou de misturas do soro ácido e doce. Têm sido

desenvolvidos processos tecnológicos que viabilizem a comercialização deste produto, como exemplo temos as técnicas de osmose reversa, ultrafiltração, eletrodialise, troca de íons e microfiltração ou a combinação de algumas delas. A maioria destas permite a separação e a concentração de proteínas sem que ocorra a desnaturação e tem como objetivo produzir produtos protéicos com atributos específicos na composição e funcionalidade para aplicação na nutrição humana (MODLER, 2000; NEVES, 2001).

A produção de concentrado protéico (CPS) ou de isolado protéico de soro (IPS) é destinada a utilização como ingrediente de elevada funcionalidade. O conteúdo de proteínas corresponde a valores entre 34-80% nos concentrados protéicos e concentrações superiores a 90% nos isolados (MODLER, 2000; MORR; HA, 1993; NEVES, 2001; U.S. Dairy Export Council, 1997).

As proteínas de soro de leite de vaca representam cerca de 20% das proteínas totais do leite, sendo as duas principais a β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactoalbumina (α -La). Além destas, são encontradas em menores proporções a soroalbumina bovina (BSA), imunoglobulinas (Igs), peptonas, lactoferrina, transferrina, lisozima e enzimas (SGARBIERI, 1996). A Tabela 1 ilustra algumas das propriedades físico-químicas das proteínas do soro (MODLER, 2000; MORR; HA, 1993).

Tabela 1- Algumas propriedades físico-químicas das proteínas do soro

	β -Lg	α -La	BSA	Igs
Concentração no soro (%)	50-75	10-15	5	0.4-1.0
Ponto isoelétrico	5.14 e 5.41	4.8	4.71 e 4.84	5.5 e 8.3
Peso molecular (Kd)	18,20 -18,36	14,14 - 14,17	66,26	153,0 – 901,0
Número de grupos dissulfídicos	2	4	17	15 ou mais
Temperatura de desnaturação (°C)	74	63	87	79

* **β -Lg:** β -lactoglobulina; **α -La:** α -Lactoalbumina; **BSA:** Soro Albumina Bovina; **Igs:** Imunoglobulinas.

Este subproduto, quando descartado no meio ambiente, é considerado um grande agente poluidor devido à elevada demanda biológica de oxigênio (BOD), em torno de 30 a 60 mg de oxigênio por litro. Comparando o potencial poluidor do soro em relação à poluição causada pelo esgoto doméstico, o autor concluiu que 100.000 L de soro equivalem ao despejo doméstico de 55.000 pessoas (NEVES, 2001).

Do ponto de vista econômico ambiental, a recuperação das proteínas dos efluentes da indústria de laticínios permite não só recuperar a proteína de alto valor nutricional como também reduzir sua demanda biológica de oxigênio (BOD) (BORGES et al., 2001).

As proteínas do soro do leite têm sido consideradas de valiosa contribuição como ingrediente em alimentos formulados por apresentarem tanto propriedades funcionais tecnológicas como também importantes propriedades funcionais fisiológicas, atuando na modulação da resposta metabólica e, principalmente, nos mecanismos de defesa do corpo humano (SGARBIERI et al., 2000). Os responsáveis por esta ação imunológica são as imunoglobulinas e os peptídeos imunomoduladores, resultantes da digestão gastrintestinal, que fazem parte da sua composição (PACHECO, SGARBIERI; FARFÁN, 2002).

Desta maneira, as proteínas do soro do leite podem ser usadas em aplicações nutricionais, como fórmulas enterais e infantis (Peptamem da Nestlé), na forma de proteínas íntegras ou pré-digeridas, visando ganho de peso e recuperação do estado nutricional, para pacientes pós-cirúrgicos, geriátricos e imobilizados. Em alimentos de baixo conteúdo calórico, elas podem ser usadas como substituto de gordura, ou para formulações de alimentos e bebidas saudáveis, sendo aplicadas como proteínas hidrolisadas e incorporadas como substratos pré-bióticos para manutenção da vida dos pró-bióticos (de WIT, 1998; LEE, 1996; SGARBIERI et al., 2000).

1.1- Proteínas do soro de leite

As duas frações mais abundantes das proteínas de soro de leite são a β -Lactoglobulina (β -Lg) e a α -Lactoalbumina (α -La), que correspondem, respectivamente, a 75% e a 15% do total de proteínas presentes nos soro (PACHECO; SAGARBIERI, FARFAN, 2002).

1.1.1- β -Lactoglobulina (β -Lg)

A β -Lg é a proteína mais abundante e é constituída de 162 resíduos de amino ácidos, com peso molecular (PM) de 18,3 Kd. Sua estrutura é dependente do pH. Existe como um dímero de PM de 36,7 Kd numa solução acima de seu ponto isoelétrico (5,2). Abaixo do pH 3,5 e acima de 7,5, o dímero se dissocia em monômeros, e entre pH 3,5 e 5,2, o dímero se polimeriza em octâmero com PM de 147 Kd. Contém cinco resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfídicas, entre os resíduos 66 e 160, e entre os 106 e 119 ou 121. Este conteúdo de resíduos de aminoácidos sulfurados facilita a polimerização da proteína pela formação de pontes dissulfeto intermolecular covalentes durante processamentos a altas temperaturas e estocagem (MORR; HA, 1993, SGARBIERI, 1996).

Entre as sete variantes existentes de β -Lg, as A e B são as mais abundantes. Seu monômero possui a forma de um cálice hidrofóbico capaz de ligar vitamina A (retinol), substâncias hidrofóbicas e anticorpos (CAYOTS; LORIENT, 1997).

Contém aproximadamente 15% de sua estrutura em α -hélice, 43% em “ β -folha” (“ β -sheet”) e 47% como estrutura desorganizada, a qual é sensível ao pH e a altas temperaturas. Acima de 65°C, esta proteína sofre desnaturação térmica acompanhada de transição conformacional que expõe seus grupamentos altamente reativos SH e ϵ -NH₂ (MODLER, 2000).

Devido à sua estrutura globular, a β -Lg é estável à ação de enzimas proteolíticas presentes no estômago. Sua função biológica parece ser menos importante para bebês, o que também explica sua ausência na composição do leite materno (de WIT, 1998; MORR; HA, 1993). Por ser termolábil, o

processamento térmico pode alterar sua digestibilidade e torná-la biologicamente disponível (MORR; HA, 1993). A destruição da estrutura nativa e conformacional pela quebra das pontes de hidrogênio e/ou pelo aquecimento resulta em um aumento significativo da suscetibilidade à digestão pela pepsina e pela quimiotripsina (REDDY; KELLA; KINSELA, 1988).

A fração β -Lg é totalmente solúvel, comportando-se como uma solução límpida e estável na faixa de pH entre 3,0 a 8,0, podendo ser aplicada na fortificação de bebidas lácteas e sucos de frutas (PEARCE; KINSELLA, 1987).

1.1.2- α -Lactoalbumina (α -La)

A fração α -La possui aproximadamente 14 Kd e é encontrada na forma de monômero. Sua estrutura é composta de 132 resíduos de amino ácidos, sendo que todos os resíduos sulfurados estão na forma de pontes dissulfeto intramolecular, ligando os resíduos de amino ácidos 6 e 120, 28 e 111, 61 e 77, e 73 e 91. Portanto, apresenta uma estrutura esférica globular e altamente compacta, com quatro pontes dissulfeto (MODLER, 2000; MORR; HA, 1993).

Esta proteína é capaz de ligar cálcio, zinco e outros íons metálicos. Por se ligar fortemente ao Ca^{++} em três resíduos de ácido aspártico (Asp), quando está abaixo de seu valor de constante de ionização (pK), sua conformação é estabilizada numa estrutura complexa (de WIT, 1998; MORR; HA, 1993).

A α -La é a única proteína do leite de vaca muito semelhante à do leite humano, sendo que, no leite materno, representa a maior porcentagem protéica de sua composição. Hipóteses indicam que não é alergênica e por isso pode ser usada em fórmulas infantis (PEARCE; KINSELLA, 1987). Sua função biológica, como parte da enzima galactosil transferase, consiste em participar da biossíntese de lactose, a qual é uma importante fonte de energia para os recém-nascidos. Em valores de pH abaixo de 4,0, ela se desdobra e se torna suscetível à digestão pela pepsina no estômago (CAYOT; LORIENT, 1997; de WIT, 1998; MORR; HA, 1993).

1.1.3- Soro Albumina Bovina (BSA)

A BSA está presente no soro de leite bovino em aproximadamente 0,5 g/L, e é idêntica à isolada do soro sanguíneo. Possui PM de 69 Kd e consiste de 582 resíduos de amino ácidos. No total, apresenta 17 pontes intramoleculares dissulfeto e 1 grupo sulfidril livre no resíduo 34. Apresenta 35% de solubilidade a 3°C, mas precipita a 40-45°C. Esta redução da solubilidade em altas temperaturas se deve ao desdobramento parcial que é observado a 42-50°C, havendo exposição dos resíduos hidrofóbicos e promoção das interações intermoleculares (MODLER, 2000; MORR; HA, 1993).

A BSA é conhecida como uma proteína transportadora de ácidos graxos insolúveis no sistema circulatório sanguíneo, os quais, por sua vez, a estabilizam contra a desnaturação térmica. Provavelmente é uma importante fonte para a produção de glutathione no fígado, um peptídeo que também possui atividade imunológica (de WIT, 1998).

1.1.4- Imunoglobulinas (Igs)

As Igs apresentam 15 a 1000 Kd e exercem função de anticorpos no organismo. Consistem de cinco classes: IgA, IgM, IgE e IgG₁ e IgG₂, que foram identificadas no soro sanguíneo e no leite, sendo 80% IgG. Estas proteínas são monômeros de duas cadeias de polipeptídeos de 20 Kd e duas de 50-70 Kd, que são interligadas por pontes dissulfeto. Exibem maior temperatura de desnaturação térmica que a α -La e a β -Lg, mas, na presença de outras proteínas do soro, são extremamente termolábeis. As imunoglobulinas são capazes de aglutinar bactérias, neutralizar toxinas e inativar vírus (MODLER, 2000; MORR; HA, 1993; PEARCE, 1987).

1.1.5- Lactoferrina

A lactoferrina é uma metaloproteína que contém 703 resíduos de amino ácidos, 16 pontes dissulfeto e um mol de ferro (Fe⁺³) ligado. Devido a ligação ao metal, possui alta resistência à desnaturação térmica e propriedades bactericidas

similares a lisozima e a lactoperoxidase. Possui alto valor de ponto isoelétrico (pI) e forma complexo com a BSA e a β -Lg (CAYOT; LORIENT, 1997).

2- POLISSACARÍDEOS E CARBOXIMETILCELULOSE

2.1- Polissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas encontradas naturalmente na maioria dos organismos vivos (ASPINAL, 1970), como plantas e animais (GLICKSMAN, 1982). Dependendo de sua origem, possuem funções distintas, o que os caracteriza como polímeros extremamente versáteis. No caso do amido e do glicogênio, bem como as gomas (goma locusta e goma guar), servem de material de reserva. Nas plantas terrestres, a pectina tem função de manter a integridade estrutural e a força mecânica, assim como a carragena, o ágar e o alginato nas espécies marinhas. Já a celulose, as mananas e as xilanas, formam uma estrutura sólida de sustentação na parede celular das plantas. Similarmente à quitina dos crustáceos, atua como suporte para aqueles organismos (GLICKSMAN, 1982; LAPASIN; PRICL, 1999).

O termo polissacarídeo geralmente é atribuído aos materiais que contêm mais de dez resíduos de glicose, que se unem através de ligações glicosídicas entre um grupo do carbono hemiacetal hidroxil de uma unidade e um grupo hidroxil disponível da outra, liberando uma molécula de água. A sua classificação vai depender da estrutura química e da fonte na natureza (ASPINAL, 1970; LAPASIN; PRICL, 1999).

Existem diversas designações para este material que, em geral, tem a habilidade de espessar ou geleificar sistemas aquosos, podendo ser chamado de gomas, colóides hidrofílicos, hidrocolóides, mucilagens e polímeros solúveis em água (GLICKSMAN, 1982).

Em termos práticos, gomas são definidas como moléculas hidrofóbicas ou hidrofílicas de alto peso molecular, que geralmente possuem propriedades

coloidais, e, portanto, em solventes apropriados ou em agentes de expansão, produzem uma suspensão viscosa ou até mesmo um gel (WHISTLER, 1993).

Dentre as propriedades tecnológicas mais importantes dos polissacarídeos, a formação de textura é a mais utilizada no desenvolvimento de produtos alimentícios, agindo como substância espessante e geleificante (SAMANT et al., 1993). Por apresentarem fácil capacidade de hidratação, são produtos largamente utilizados na indústria inclusive como material não calórico que pode reduzir o conteúdo energético de determinados alimentos (WHISTLER, 1993).

Aproximadamente três quartos do peso seco das plantas são constituídos de polissacarídeos. Os tecidos vegetais contêm misturas destes polímeros, dos quais componentes individuais podem ser separados por processos químicos ou mecânicos. Desta forma, os polissacarídeos são obtidos a partir de exsudados de plantas, algas marinhas, sementes (amidos), microorganismos, a partir do amido e de modificações da celulose (WHISTLER, 1993).

As modificações químicas são usadas para alterar as propriedades químicas e físicas, conferindo novas propriedades e aplicações ao polímero. As moléculas de alguns polissacarídeos são lineares e outras, ramificadas. Conforme o grau de ramificação, ocorrem mudanças nas propriedades físicas de solubilidade, viscosidade e comportamento geleificante (STEPHEN; CHURMS, 1995).

Os grupos hidroxilas (predominante em toda estrutura de polissacarídeos) são, em alguns casos, parcialmente derivados por estereificação na presença de acetato, sulfato ou fosfato. Sendo assim, o número de substituições ou a adição de algum grupo químico ao polissacarídeo original é chamado grau de substituição (GS) (STEPHEN; CHURMS, 1995; WHISTLER, 1993).

O polímero pode sofrer introdução de: (a) grupos neutros (hidroxietil por grupos hidrofóbicos como etil e propil) em polissacarídeos lineares, que melhoram sua solubilidade, viscosidade e estabilidade, devido à manutenção da extensão da molécula, (b) grupos ácidos, que são introduzidos em polissacarídeos neutros por oxidação, ou ainda a sulfatação e fosforilação, formando uma molécula que,

quando dissolvida, forma uma “mucilagem”, (c) grupos básicos, que são introduzidos diretamente no anel de açúcar do polissacarídeo (éster de polissacarídeo carboxilado com amônia, formando amida), (d) polímeros enxertados, ou seja, transformação polímeros lineares ou ramificados em outros polissacarídeos e, (e) outras modificações químicas, tais como, dextrinização, hidrólise enzimática e oxidação parcial (STEPHEN; CHURMS, 1995; TOWLE; WHISTLER, 1993; WHISTLER, 1993).

O polissacarídeo de maior importância econômica e mais abundante na natureza é a celulose. Sua utilização na indústria de alimentos iniciou-se entre os anos de 1950-1952, quando foi aplicada na sua forma modificada, ou seja, como carboximetilcelulose sódica, na fabricação de sorvete (GLICKSMAN, 1982, 1983).

2.1.1- Celulose e Carboximetilcelulose

A celulose é encontrada na parede celular da plantas terrestres, sendo responsável por sua estrutura. Constitui em um agregado de polímeros lineares de resíduos de D-glucopiranosil, formando a molécula através de ligações glicosídicas β -1,4. Embora seja altamente polar e hidrofílico, é insolúvel em água. O seu tamanho molecular é descrito em termos de grau de polimerização (GP), que é a proporção do número de unidades monoméricas (ASPINAL, 1970; COFFEY; BELL; HENDERSON, 1995; GLICKSMAN, 1982, 1986; GANZ, 1977).

Para lhe conferir solubilidade, faz-se a introdução de grupos carboximetil sódico, através da reação com hidróxido de sódio aquoso ($\text{Na}^+ \text{COO} - \text{CH}_2$), que hidrata e distende as fibras (Figura 1). Essa adição controlada, ou a substituição de hidroxilas por unidade de anidroglicose, vai conferir à molécula o grau de solubilidade, que é melhorado quando o grau de substituição (GS) encontra-se entre 0,4 e 0,8 (GLICKSMAN, 1986; GANZ, 1977; LAPASIN; PRICL, 1999).

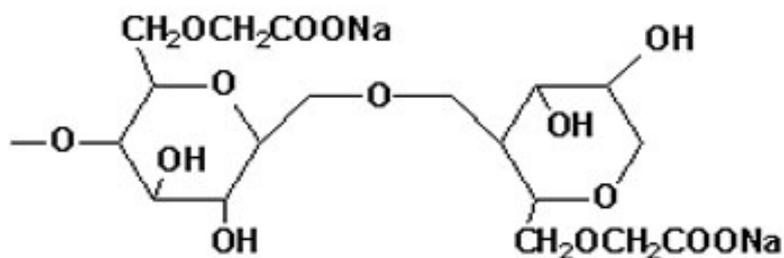


Figura 1- Estrutura da carboximetilcelulose sódica (CMC)

A carboximetilcelulose é comumente chamada de “CMC” e possui versatilidade na habilidade de controlar a propriedade reológica e a viscosidade de sistemas aquosos, formando um filme forte e de consistência viscosa. Derivados de celulose são usados na indústria de papéis, processamentos têxteis, detergentes e membranas de proteção. Para ser utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica ou cosmética, este polissacarídeo deve ser obtido no maior grau de pureza (FEDDERSEN; THORP, 1993).

A CMC foi desenvolvida na Alemanha após a I Guerra Mundial como substituto da gelatina. A descoberta, em 1935, de que o polímero melhorava o desempenho de detergentes sintéticos, promoveu a expansão da sua manufatura em grande escala (ASPINAL, 1970).

Reduzidas quantidades de CMC melhoram a viscosidade de soluções. Ela exibe um comportamento pseudoplástico devido à longa cadeia da molécula, a qual tende a se orientar na direção do fluido quando a aplicação da força aumenta (taxa de deformação). A resistência do fluido (viscosidade), por sua vez, é reduzida, conforme o aumento gradual da força aplicada. Quando se coloca num gráfico a taxa de deformação (“Shear rate”) *versus* taxa de cisalhamento (“Shear stress”), a solução de CMC resulta numa linha curva. Porém, quando a CMC é de baixa viscosidade, a solução é menos pseudoplástica que as soluções de CMC de alta viscosidade (alto PM, com GS 0,9-1,2) (FEDDERSEN; THORP, 1993).

Uma solução de CMC pode apresentar comportamento tixotrópico quando a goma é de média ou alta viscosidade (GS 0,4-0,7). Neste caso, a viscosidade da solução é aumentada quando a solução é deixada em repouso num intervalo de

tempo extenso, podendo apresentar característica de gel. Isto deve ocorrer devido à não uniformidade da substituição e é diretamente dependente da concentração (FEDDERSEN; THORP, 1993).

A geleificação da solução de CMC pode ser produzida pela adição de sais de íons de metais trivalentes, como alumínio. A elasticidade e a opacidade do gel pode ser modificada pela adição de hidrocolóides não iônicos, proteínas, sais e açúcares (FEDDERSEN; THORP, 1993; GLICKSMAN, 1983).

Segundo alguns autores citados por Feddersen; Thorp (1993), a estabilidade de soluções de CMC pode sofrer influência da temperatura, do pH, da concentração e de alguns agentes biológicos, como descrito a seguir:

- Efeito da temperatura: longos períodos de aquecimento a altas temperaturas despolimerizam e degradam a CMC. Porém, em condições normais, este efeito é reversível.

- Efeito do pH: em geral, as soluções apresentam máxima viscosidade e melhor estabilidade em pH na faixa de 7,0-9,0. Acima de 10,0 e abaixo de 4,0, torna-se menos solúvel, com predominância de ácidos livres de carboximetilcelulose, e a viscosidade diminui. O ideal é preparar a solução em água neutra, para depois alterar seu pH.

- Efeito da concentração: ao aumentar a concentração, a viscosidade aumenta proporcionalmente numa função exponencial. Em soluções concentradas, há uma pequena tendência dos íons migrarem para fora do núcleo por influência das cargas na molécula do polímero.

- Efeito de Agentes Biológicos: apesar de ser mais resistente contra ataques microbiológicos que as outras gomas, não é totalmente imune. As soluções podem ser estocadas à temperatura ambiente por períodos indefinidos sem haver perda na viscosidade. O aquecimento à 80°C / 30 min, geralmente é suficiente para proteção contra perdas na viscosidade.

Em geral, uma solução diluída de CMC apresenta um pH neutro (aproximadamente 7,0), e a maioria de seus grupos carboxílicos-ácidos encontra-

se na forma de sal e, uma pequena quantidade, na forma de ácidos livres. Seu pK encontra-se na faixa de 4,2 a 4,4 (GLICKSMAN, 1983).

A CMC é uma goma compatível com vários ingredientes alimentícios, com outros tipos de hidrocolóides, açúcares e também proteínas (GLICKSMAN, 1983). A interação com proteínas pode auxiliar na solubilidade protéica e estabilizar a solução dependendo das condições de pH, força iônica e relação estequiométrica (FEDDERSEN; THORP, 1993). Este processo é utilizado para conferir ao sistema uma alteração favorável das propriedades funcionais das proteínas. Quando o polieletrólito CMC é adicionado a um sistema contendo proteínas, a interação pode ser observada através do aumento da viscosidade do sistema e também de outras medidas físicas. A interação com polissacarídeos aniônicos é primariamente de natureza iônica, podendo ocorrer também pontes de hidrogênio e interação do tipo Van der Waals (GLICKSMAN, 1982, 1983; GANZ, 1977; TOLSTOGUZOV, 1998).

A formação do complexo pode ocorrer próximo ou abaixo do pI das proteínas, onde grupos carboxílicos da CMC reagem com os resíduos protéicos carregados positivamente, como ϵ -amino, α -amino, guanidínico e imidiazólico, por meio de interação eletrostática, formando um complexo insolúvel que pode ser precipitado. Com a adição de álcali, os amino grupos tornam-se neutros e a combinação iônica é inibida ou rompida (FONSECA; BRADLEY Jr, 2001; GANZ, 1977; LEDWARD, 1994; SAMANT et al., 1993; TOLSTOGUZOV, 1998).

A reatividade das proteínas com CMC, nestas condições pode ser utilizada para isolar, purificar e/ou recuperar caseínas e proteínas do soro de leite para fontes comerciais (HANSEN; HIDALGO; GOULD, 1971; HIDALGO; HANSEN, 1971; HILL; ZADOW, 1978).

Por não apresentar odor e formar soluções incolores, sem opacidade, a CMC é amplamente utilizada na indústria alimentícia; também devido à sua habilidade em absorver água, agindo como ligante da umidade, dissolvendo-se rapidamente em sistemas quentes ou frios, texturizando vários tipos de produtos.

Como é fisiologicamente inerte e não calórico tem sido utilizada na

formulação de alimentos dietéticos. No caso de sorvetes é um ingrediente que impede a formação de cristais de gelo e a separação de fases (FEDDERSEN; THORP, 1993).

3- INTERAÇÃO PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS

3.1- Tipos de interação

Dentre os ingredientes utilizados na indústria de alimentos destacam-se as proteínas, os polissacarídeos, lipídeos, açúcares, emulsificantes, minerais e água (KILARA, 1995). Destes, as proteínas e os polissacarídeos são os dois principais biopolímeros utilizados para formação de estrutura e estabilização de alimentos formulados (DICKINSON, 2003), sendo responsáveis pelas suas propriedades estruturais, mecânicas e físico-químicas (GLICKSMAN, 1982; TOLSTOGUZOV, 1991).

Quando há uma interação apropriada com proteínas, as propriedades de textura, espessante e geleificante dos polissacarídeos podem ser melhoradas (SAMANT et al., 1993).

Ao misturar soluções aquosas de proteínas e polissacarídeos, podem ser obtidos sistemas de natureza segregativa (polímeros se repelem e são classificados como incompatíveis) ou associativa na qual os polímeros se atraem (KRUIF; TURNIER, 2001). Desta forma, pode ocorrer formação de três tipos de sistemas, que são classificados e interpretados da seguinte maneira (SAMANT et al. 1993; TOLSTOGUZOV, 1986; 1991; 1997 e 1998):

1- Sistema líquido de duas fases (emulsão água em água), no qual as duas macromoléculas ficam em fases diferentes. Isso se deve à compatibilidade termodinâmica limitada das proteínas e polissacarídeos num sistema aquoso;

2- Solução homogênea estável, em que os dois componentes macromoleculares são co-solúveis, podendo ocorrer ou não a interação entre eles, ou seja, não interagem na solução ou existem como um complexo solúvel. Nesta fase estão envolvidas interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio;

3- Sistema de duas fases, no qual os dois componentes se encontram concentrados em uma mesma fase. Esse fenômeno é atribuído à formação de um complexo eletrostático insolúvel de proteínas e polissacarídeos aniônicos, que geralmente é obtido em $\text{pH} < \text{pI}$ e pode ser separado por centrifugação, da qual se obtém o complexo precipitado (coacervação complexa).

À medida que se eleva a concentração de algum dos polímeros em solução, dependendo do tipo de interação que irá ocorrer, o sistema pode se tornar instável (KRUIF; TURNIER, 2001).

O comportamento dos sistemas multicomponentes entre proteínas e polissacarídeos pode ser visualizado na Figura 2 (TOLSTOGUZOV; 1991, 1997; KRUIF; TURNIER, 2001). A incompatibilidade e a complexação, ilustradas na Figura 2, estão relacionadas aos fenômenos de repulsão e atração entre os biopolímeros (SAMANT et al., 1993; TOLSTOGUZOV, 1986; 1991; 1997).

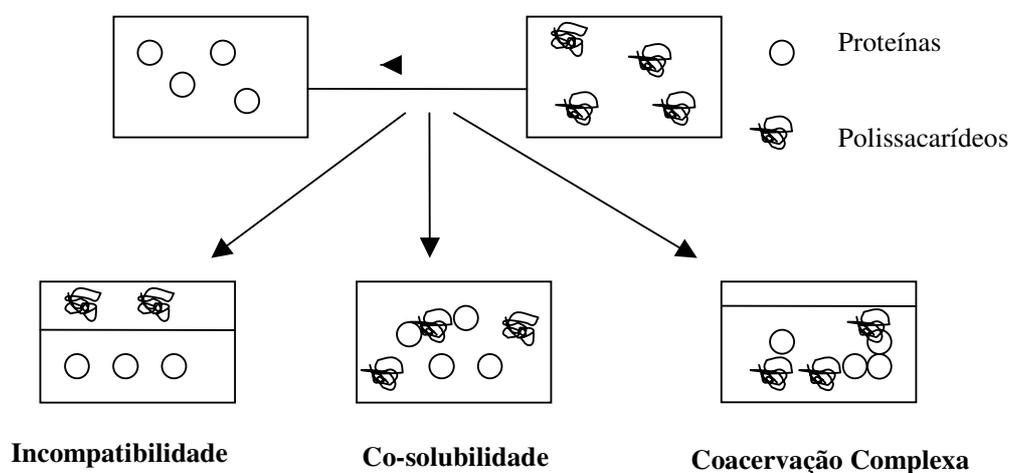


Figura 2- Principais tendências de comportamento da mistura de proteínas com polissacarídeos.

A maior força responsável pela interação entre proteínas e polissacarídeos é de natureza eletrostática, na qual a formação do complexo se dá quando os dois

polímeros carregados com cargas opostas, no caso de polissacarídeos aniônicos em valores acima do seu pK e proteínas abaixo de seu ponto isoelétrico (pI), resulta numa mistura com entalpia exotérmica e a interação entre as cargas proporciona a formação do complexo (LEDWARD, 1994; SAMMANT et al., 1993).

O tipo de interação e de complexo que será formado depende da natureza dos polissacarídeos, como peso molecular; grau de substituição (GS); acidez ou neutralidade, proporção entre polissacarídeos e proteína, e temperatura do sistema (GLICKSMAN, 1982, 1983; SAMMANT et al, 1993; TOLSTOGUZOV, 1986).

Dependendo do tipo de aplicação no produto final, não se deve considerar apenas os biopolímeros individualmente, mas todas as propriedades de inter-relação dependentes entre os colóides, como a natureza e a força de interação que existe na mistura dos dois (GALAZKA et al., 1999; TOLSTOGUZOV, 1991, 1997, 1998).

Muitas das propriedades funcionais podem ser controladas com a formação do complexo, como a solubilidade, a gelatinização, a formação e estabilidade de espumas e emulsões. Nestes casos, a conformação estrutural e a carga molecular dos componentes serão responsáveis pelas propriedades do complexo formado (SAMANT et al., 1993; TOLSTOGUZOV, 1998).

A compatibilidade do sistema proteína-polissacarídeo, em geral, decresce na seguinte ordem: pectina > CMC > alginato > goma arábica > sulfato de dextrana (FONSECA; BRADLEY Jr., 2001; TOLSTOGUZOV, 1986).

O complexo proteína-polissacarídeo é solúvel quando o hidrocolóide é adicionado em excesso ao meio de reação, sendo que a concentração elevada de sal pode interferir negativamente na sua formação ou precipitar a proteína. Esta particularidade tem possibilitado a adição de proteínas lácteas em sucos de frutas, onde o pH se encontra na faixa de 4,0 a 5,0 (LEDWARD, 1994).

Os complexos são menos solúveis ou insolúveis quando a mistura entre os componentes é realizada na mesma proporção de cargas, ou seja, faz-se um

controle dos grupos aniônicos adicionados equivalentes à carga catiônica da proteína, de maneira que ocorra a formação de agregados isoelétricos (TOLSTOGUZOV, 1991).

Em geral, diversos trabalhos têm sido realizados com o complexo insolúvel formado pelas proteínas-polissacarídeos, tornando possível o controle da habilidade de geleificação e produção de produtos multitexturizados (LEDWARD, 1994; TOLSTOGUZOV, 1986, 1991, 1998).

As proteínas de soro de leite podem formar complexos insolúveis com polissacarídeos aniônicos através do controle das variáveis físico-químicas da mistura de reação. Observações de que a solubilidade da α -lactoalbumina e da β -lactoglobulina, quando complexada com a carboximetilcelulose (CMC) possui regiões de menor solubilidade em distintas faixas de pH, permite a utilização desta estratégia para recuperação das proteínas (MORR; HA, 1993).

No entanto, após a obtenção de um complexo coacervado insolúvel, a interação atrativa entre o hidrocolóides carboxilados e proteínas adsorvidas pode ser reduzida quando o pH do meio for maior que o pI das proteínas (DICKINSON, 2003).

Segundo Hidalgo e Hansen (1971), a precipitação seletiva das proteínas do soro complexadas com o polissacarídeo CMC poderia ser um processo utilizado para recuperação em larga escala das proteínas específicas, podendo posteriormente ser utilizadas como ingrediente em diversos produtos, tanto com a finalidade nutricional como para manufatura industrial.

O uso de hidroximetilcelulose (HMC) e carboximetilcelulose (CMC) resultou num efeito similar quanto à recuperação das proteínas do soro de leite, sendo o HMC mais eficiente na precipitação da beta-lactoglobulina do que a CMC (EL-SAYED et al., 1998). Estudos realizados com animais alimentados com o complexo proteína-polissacarídeo revelaram que os complexos não causam alterações do valor nutritivo da proteína, dos índices glicêmicos e da função hepática ou renal (ZECHER; GERRISH, 1997).

Pelo seu caráter aniônico, a CMC pode ser utilizada para precipitar proteínas do soro, como a α -lactoalbumina, em pH 3,2, e pode ser usada na preparação de queijos, para melhorar a textura e corpo, bem como aumentar o rendimento de sua produção (ABDEL-BAKY, 1981 apud ZECHER; GERRISH, 1997; HANSEN; HIDALGO, GOULD, 1971). A combinação de CMC com amido e carragena melhora a textura e impede a sinerese das preparações como cremes e leites geleificados (ZECHER; GERRISH, 1997).

A carragena, um hidrocolóide extraído de algas, possui capacidade de interagir e causar reação de geleificação com a caseína. Na indústria alimentícia é exclusivamente usada para produzir géis, filmes e na estabilização de sistemas alimentares (THOMAS, 1997).

Outro fator importante da interação entre proteínas globulares e gomas é a inibição da agregação térmica das proteínas devido à limitação de sítios acessíveis, o que leva a um aumento da estabilidade térmica (SCHMITT et al., 1998).

A importância da interação entre proteína-polissacarídeo se faz não só do ponto de vista funcional, mas também na recuperação de proteínas em resíduos industriais (BRYANT; Mc CLEMENTS, 2000; DALEV; SIMEONOVA, 1995). Portanto, uma área com grande potencial de aplicação das propriedades de interação proteínas-polissacarídeos tem sido o desenvolvimento de produtos a partir da recuperação ou inibição da precipitação de proteínas após a desnaturação térmica.

Alguns autores têm estudado as propriedades funcionais do complexo proteínas de soro de leite com polissacarídeos como um todo (MANN; MALICK, 1996). Sabe-se que a complexação das proteínas do soro com CMC modificam em grande extensão suas propriedades funcionais. Contudo pouco estudo tem sido direcionado para as frações protéicas isoladas, com o qual se pode esperar um comportamento funcional diferenciado.

4- PROPRIEDADES FUNCIONAIS

As propriedades funcionais mais exploradas estão relacionadas ao desempenho das proteínas e podem ser definidas como propriedades físicas e químicas que afetam o comportamento das proteínas em sistemas alimentícios durante processamento, estocagem, preparação e consumo, podendo ser classificadas da seguinte maneira (KINSELLA, 1982):

1- Hidrofílicas: dependem da afinidade da proteína com a água → solubilidade, capacidade de retenção e de absorção de água – CRA e CAA;

2- Interfásicas: dependem da capacidade das moléculas de proteínas em se unirem e formarem uma película entre duas fases imiscíveis → formação de espumas e emulsões;

3- Intermoleculares: dependem da capacidade da proteína em formar ligações cruzadas entre suas próprias moléculas ou com outros componentes do sistema → formação de fibras de proteínas, geleificação, massas viscoelásticas;

4- Reológicas: dependem das características aerodinâmicas e estruturais da proteína → viscosidade;

5- Organolépticas: são propriedades que se manifestam através dos órgãos dos sentidos, sendo, portanto, também chamadas de sensoriais → textura, cor, gosto, (aroma);

6- Formação de filmes ou coberturas comestíveis: dependem da coacervação das moléculas para formar um sistema homogêneo.

Segundo Kinsella (1982), as propriedades funcionais podem ser influenciadas por fatores intrínsecos ou individuais das proteínas, sendo estes a conformação, processos de tratamento (adição de álcalis, ácidos ou sais), mudanças no pH, tratamentos enzimáticos, processos de secagem, condições iônicas (pH), temperatura, características do solvente, tempo de exposição, forças mecânicas (centrifugação) e concentração (HALL, 1996).

4.1- Propriedades funcionais de proteínas e de complexos com polissacarídeos

4.1.1- Solubilidade

Dentre as propriedades funcionais existentes, a solubilidade é a mais importante, pois exerce grande influência nas demais propriedades (SGARBIERI, 1996).

Proteínas, assim como outras macromoléculas, possuem propriedades de solubilidade e hidrodinâmica que afetam várias outras propriedades funcionais. A solubilidade é responsável por algumas propriedades de superfície, tais como formação de espumas e emulsões. Já as propriedades hidrodinâmicas, influenciam na viscosidade e na geleificação (VOJDANI, 1996).

Os fatores que influenciam a solubilidade são pH, temperatura, força iônica, presença de outros componentes, concentração de proteínas e parâmetros físicos (SGARBIERI, 1996; VOJDANI, 1996). O pH e a força iônica alteram a solubilidade por efeitos nas forças eletrostáticas (DAMONDARAM, 1996).

Ao preparar uma solução contendo proteínas e polissacarídeos, as propriedades de hidratação podem, ou não, estar melhoradas, dependendo do tipo de interação realizada. Esta interação, por sua vez, depende principalmente da razão entre proteínas e polissacarídeos. Os complexos insolúveis ou coacervados geralmente apresentam solubilidade quando a solução sofre mudanças de pH e força iônica (SCHMITT et al., 1998; TOLSTOGUZOV, 1986). Este efeito foi observado por Mann; Malick (1996), no qual as proteínas do soro de leite, quando complexadas com polissacarídeos apresentaram a solubilidade dependente do pH, sendo mais solúvel na faixa de pH ácido.

4.1.2- Viscosidade

A viscosidade é importante por contribuir com a estabilidade de emulsões e de outras partículas em suspensões alimentares, como também para contribuição da sensação tátil na boca. A viscosidade de uma solução contendo proteínas é

afetada pela concentração e por propriedades físico-químicas inerentes, como, por exemplo, peso molecular, polidispersibilidade, hidrofobicidade e conformação da molécula (SCHENZ; MORR, 1996).

O parâmetro de viscosidade é definido como a resistência de um fluido ao deslizamento de uma camada em relação à outra. Ou, ainda, como uma propriedade física de um fluido que implica uma relação entre tensões e velocidades de deformações. O conjunto de fenômenos que ocorre sob ação de um esforço (fluência e relaxação de tensão) é chamado de visco-elasticidade (STEFFE, 1996; SCHMITT et al., 1998).

As medidas de viscosidade, em geral, são tomadas em um viscosímetro. Existem diversos tipos e modelos, como o rotacional, o de tensão controlada, de taxa de deformação controlada (Brookfield), viscosímetro capilar, e ainda, o viscosímetro de superfície (SCHENZ; MORR, 1996).

A maior parte dos alimentos possui uma tensão residual que precisa ser vencida para que comece a escoar. Para vencer esta resistência é necessário que se aplique uma tensão maior que este valor, de modo a conseguir uma certa taxa de deformação ("Shear rate"). Com o auxílio de um reômetro, por exemplo, aplicam-se movimentos rotacionais na geometria, que em contato com a amostra, resulta em uma tensão definida. Ao longo do tempo, esta tensão pode quebrar (ensaios estacionários) ou deformar (ensaios oscilatórios) a estrutura original e modificar, portanto, a sua viscosidade.

A viscosidade de uma mistura de proteínas e hidrocolóides depende primordialmente da concentração dos biopolímeros, da extensão de interação entre eles e o solvente e da sua conformação estrutural (tamanho, flexibilidade molecular e da configuração). Soluções altamente viscosas são obtidas quando há um elevado peso molecular, alta flexibilidade e hidrofiliabilidade dos polímeros, como é o caso de alguns polissacarídeos como xantana e quitosana, e de proteínas, como a caseína (SCHMITT et al., 1998).

4.1.3- Formação e Estabilidade de Espuma

A capacidade da proteína em formar espuma deve-se à expansão do volume da dispersão protéica, com incorporação de ar através das técnicas de batimento, agitação ou aeração. Na indústria alimentícia, a formação de espuma é aplicada em produtos como merengues, mousses e cervejas (SGARBIERI, 1996; WILDE; CLARK, 1996).

O caráter anfipático das proteínas confere a capacidade de adsorver na interface ar/água. Para que tenha capacidade de espumar ("Foamability"), a proteína deve migrar e adsorver rapidamente na interface durante o estágio de transição da formação de espuma. Este processo pode ser descrito em três passos: 1- transporte da proteína do centro da solução para a interface, 2- penetração na camada superficial e 3- reorganização da estrutura (desnaturação na superfície) da proteína na camada de adsorvida (HILL, 1998; WILDE; CLARK, 1996). A boa solubilidade do sistema é essencial para que a proteína se distribua uniformemente e se adsorva na interface (MOHANTY; MULVIHILL; FOX, 1988).

Após a formação da espuma, o sistema pode ser classificado como estável ou instável. Ou seja, o volume espumado terá um tempo médio de vida, que vai depender da manutenção da viscoelasticidade da camada de adsorção. A presença de coágulos insolúveis rompe a interface e desestabiliza as bolhas de ar (WILDE; CLARK, 1996).

Muitas vezes, as proteínas são mais estáveis num sistema espumado em valores iguais ao seu pI , onde a carga líquida é zero e a repulsão é aumentada (DAMONDARAM, 1996; WILDE; CLARK, 1996). Mudanças no pH, na força iônica ou na viscosidade podem ser favoráveis para a capacidade espumante.

No caso de polissacarídeos, por serem polímeros carregados, adsorvem a interface e formam ligação cruzada com a proteína também adsorvida, aumentando a viscosidade da superfície. Como possuem um peso molecular (PM) relativamente alto, eles aumentam a viscosidade do local e reduzem a drenagem do filme, conseqüentemente auxiliando na estabilidade do sistema espumado

(AHMED; DICKINSON, 1991; WILDE; CLARK, 1996; MOHANTY; MULVIHILL; FOX, 1988).

A drenagem do líquido lamelar é influenciada pela viscosidade da fase líquida, viscosidade da superfície, resistência ao fluxo e pela repulsão eletrostática entre as duas interfaces próximas. A associação, ou formação de complexos entre proteínas e hidrocolóides, pode ser vista como uma alternativa para aumentar a estabilidade de um sistema espumado (HILL, 1998; WILDE; CLARK, 1996).

As propriedades espumantes de complexos covalentes de diferentes proteínas com o polissacarídeo dextrana revelaram que as características finais do complexo variam em função da proteína utilizada. Para lisozima, a complexação com dextrana ocasionou um substancial aumento nas propriedades espumantes, enquanto a complexação com soroalbumina bovina resultou num aumento insignificante, tendo efeito negativo com a β -caseína (DICKINSON; IZGI, 1996).

Resultados positivos na formação de espuma também foram alcançados por Mishra, Mann; Joshi (2001), ao complexar CPS e pectina. Neste caso, a presença de 1,0 M de força iônica melhorou a estabilidade e a porcentagem de “overrun”, em torno de 25%, das espumas preparadas a 10 e 30°C e em valores de pH neutro (4,6 e 7,0). Segundo o autor, o aumento da viscosidade do sistema foi o responsável por este comportamento.

4.1.4- Formação e estabilidade de emulsões

Emulsões são definidas como uma dispersão ou uma solução de dois líquidos imiscíveis (DICKINSON; STAINSBY, 1982), que resulta numa fase contínua e numa fase dispersa em forma de gotas ou glóbulos (WAGNER, 2000). Nos alimentos, as duas fases não miscíveis são geralmente aquosa (solução ou dispersão) e lipídica (óleo ou gordura) sendo esta última, em geral, a fase dispersa. Emulsões alimentícias podem ser definidas como emulsões água em óleo (A/O), como é o caso das margarinas, ou óleo em água (O/A), como o leite (HILL, 1996; WAGNER, 2000).

Para favorecer a formação de uma emulsão, é necessária a presença de um agente emulsificante. Estes devem ter a capacidade de estabilizar a interface óleo-água, diminuindo a tensão interfacial (tensoatividade) e formar uma película na interface. As proteínas, que também são usadas na formação de espumas por serem polímeros anfipáticos e possuírem ação tensoativa, formam um filme interfásico entre as duas fases e estabilizam a emulsão (DICKINSON, 2003; DICKINSON; STAINSBY, 1982; KLEMASZEWSKI et al., 1992; WAGNER, 2000).

A diferença entre um agente emulsificante e um estabilizante é que o primeiro tem a capacidade de promover a formação de uma emulsão e estabilizá-la, através da diminuição da energia livre e da tensão interfacial. O segundo confere estabilidade do sistema por longo prazo, ao retardar a colisão freqüente das gotas emulsionadas. As proteínas podem, portanto, agir como emulsificante e/ou estabilizante, e os polissacarídeos, melhorando a estabilidade (DICKINSON, 1982; HILL, 1996).

Alguns estudos citam a melhora das propriedades interfásicas das proteínas quando ocorre sua complexação com polissacarídeos. A estabilidade de sistemas dispersos pode ser aumentada através das alterações nas propriedades reológicas do filme interfacial (TOLSTOGUZOV et al., 1981 apud TOLSTOGUZOV, 1998).

Caseínas conjugadas com maltodextrina apresentaram as propriedades de emulsificação e solubilidade melhoradas na faixa de pH ácido, sendo direcionada sua aplicação em bebidas para esportistas e suplementos nutricionais (SHEPHRED et al., 2000).

A habilidade de formar emulsão da β -lactoglobulina conjugada com carboximetildextrana foi aproximadamente dez vezes superior a da proteína isoladamente, em pH neutro (NAGASAWA et al., 1996). No entanto, a dissociação da β -lactoglobulina com polissacarídeos tem sido descrita como favorável no aumento da estabilidade de emulsões frente ao processo de coalescência (DICKINSON; GALAZKA, 1991).

Durante o processo de desestabilização de uma emulsão, podem ocorrer os seguintes eventos (DICKINSON; STAINSBY, 1982; HILL, 1996; WAGNER, 2000):

1- Cremeificação e drenagem: onde o cremado, ou a fase creme, é descrito como a movimentação da fase dispersa através da diferença de densidade entre as duas fases. Como a fase oleosa é menos densa que a água, ao formar pouco volume de fase dispersa é chamado de cremado. Se o volume cremado for muito elevado, será chamado de drenagem. A adição de gomas, como amido, pode aumentar a viscosidade da fase dispersa e reduzir o tempo de formação do cremado.

2- Floculação: descrita como a agregação reversível das gotas que se unem através de interações fracas. As gotas emulsionadas são prevenidas do processo de floculação por estabilização eletrostática e/ou estérica. Quando a quantidade de proteína não é suficiente para aderir à interface, as gotas se aproximam e floculam. Através de forças de depleção, a mistura de biopolímeros tende a flocular e separar as fases.

3- Coalescência: as gotas de uma emulsão coalescem se as forças de atração entre elas é suficiente para atraí-las. Há uma aproximação das gotas, que rompe o filme interfásico e drena o líquido para fora. Se as gotas se aproximam e permanecem assim por longo período formam o cremado ou o floco. A presença de partículas sólidas como agregados protéicos aceleram a coalescência por romper o filme e formar uma ponte de líquido.

4- Inversão de fases: é um fenômeno mais complexo e ocorre quando uma emulsão O/A passa a A/O, ou vice-versa. Provavelmente envolve os fenômenos de cremeficação, floculação e coalescência.

Na faixa de pH neutro, observou-se que a coacervação de uma proteína com polissacarídeos ácidos resultou em valores mais elevados de propriedades emulsificantes do que a proteína sozinha (KATO et al., 1989).

Outros parâmetros que podem ser usados para classificar as propriedades de uma emulsão são a hidrofobicidade superficial e a viscosidade aparente (HILL, 1996).

4.1.5- Geleificação

Gel pode ser definido como um material formado por uma rede sólida tridimensional contínua (“network”) que embebe o solvente e o imobiliza, havendo um equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas (CLARK, ROSS; MURPHY, 1991). Se as forças atrativas são predominantes, a água será expulsa da matriz do gel. Por outro lado, se há predominância de forças repulsivas, a rede não será formada (MATSMURA; MORI, 1996).

As características típicas de muitos alimentos estão determinadas pela propriedade de geleificar proteínas durante o aquecimento e/ou resfriamento do material. Podendo ser feita sua aplicação em iogurtes, queijos, pudins, geléias, tofu, entre outros (PILOSOF, 2000).

A geleificação consiste de dois passos: (a) mudanças conformacionais ou desnaturação parcial das moléculas de proteínas e (b) associação ou agregação gradual das proteínas desnaturadas individualmente. O segundo passo deve ser mais lento que o primeiro para permitir a melhor organização para formação da rede. Quando as moléculas estão completamente desdobradas, forma-se um gel coeso (MATSMURA; MORI, 1996).

As proteínas globulares, como é o caso das proteínas do soro de leite, são capazes de formar dois tipos de estrutura de gel. Uma é chamada de “corrente de bolsas” (“stirring of beads”) e é altamente organizada. Este gel fica com aparência translúcida, como é o caso de géis de albumina, insulina, lisozima e de hidrocolóides. Já a outra, é conhecida como “agregação ao acaso” (“random aggregation”), possuindo aparência mais opaca, como nos géis de proteínas de soro de leite, β -Lg e miosina. Porém, estes processos são dependentes do pH, presença de íons e força iônica, temperatura e tempo de aquecimento, concentração de proteínas, dentre outros fatores (MATSMURA; MORI, 1996; SGARBIERI, 1996).

As forças de interação envolvidas na formação do gel são as interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e pontes dissulfeto (PUPPO; AÑON, 1998).

Testes de deformações mecânicas são utilizados para monitorar a transição sol-gel e para caracterizar a sua viscoelasticidade (MATSMURA; MORI, 1996). O módulo elástico (G') ou o módulo viscoso (G'') avaliam o ponto de gel. Este ponto é observado quando ocorre a interpolação entre os dois módulos. A partir deste resultado, calcula-se a razão G''/G' , chamada de tangente de delta (Tang δ). Seu valor deve ser menor que um (1,0), no ponto em que ocorre a formação de gel; ou seja, quando G'' atinge valores maiores que G' (da SILVA; RAO, 1992; HSIEH; REGENSTEIN; RAO, 1993). A medida de ponto de gel e de temperatura de geleificação pode ser feita em reômetro, e as propriedades mecânicas de textura e elasticidade em um texturômetro.

A mistura de proteínas e polissacarídeos na formação de sistemas geleificados é, na maioria das vezes, usada sob condições de incompatibilidade termodinâmica. Em alguns casos, sistemas coacervados podem ser usados, pois permitem a agregação térmica sob condições específicas de pH e força iônica, em que os biopolímeros não formam géis sozinhos (SCHMITT et al., 1998).

Em estudo realizado por Baeza et al. (2002), observou-se que os polissacarídeos influenciaram o comportamento térmico da β -Lg envolvendo o desdobraimento da proteína em subsequente agregação, enquanto a taxa de agregação e o diâmetro dos agregados, estudados por varredura dinâmica de luz ("Dynamic light-scattering"), foi maior quando a proteína estava associada com Propileno glicol alginato (PGA).

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M.; DICKINSON, E. Foaming of aqueous solutions of protein + propylene glycol alginate. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 4, n. 5, p. 395-402, 1991.

ASPINAL, G.O. In: ASPINAL, G.O. **Polysaccharides**. Oxford: Pergamon Press, 1970. 1.ed., 228 p.

BAEZA, R.; CARP, D.J.; BATHOLOMAI, G.B.; PILOSOF, A.M.R. The application of thermodynamic incompatibility between proteins and polysaccharides to design of food gels.

Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 36, n. 2, p. 128- 136, 2002.

BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, p. 1-8, 2001.

BRYANT, C.M.; Mc CLEMENTS, D.J. Influence of xantan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, n.4, p.383-390, 2000.

CAYOT, P.; LORIENT, D. Structure-function relationships of whey proteins. In: DAMONDARAM, S.; PARAF, A. **Food Proteins and their Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. Cap. 8, p. 225-256.

CLARK, A.H.; ROSS-MURPHY, S.B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In: DICKINSON, E. (Ed.). **Food Polymers, Gels and Colloids**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991. p. 322-338.

COFFEY, D.G.; BELL, D.A.; HENDERSON, A. In: STEPHEN, A.M.(Ed.). **Food Polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. Cap.5, p. 123-154.

da SILVA, J.A.L.; E RAO, M.A. Viscoelastic properties of food hydrocolloid dispersions. In: da SILVA, J.A.L.; E RAO, M.A. (Eds.). **Viscoelastic Properties of Food**, 1992. London: Elsevier Applied Science, p. 285-315.

DALEV, P.G.; SIMEONOVA, L.S. Emulsifying properties of protein-pectin complexes and their use in oil-containing foodstuffs. **Journal Science Food Agriculture**, New York, v. 68, n.2, p.203-206, 1995.

DAMONDARAM, S. Functional properties. In: NAKAI, S.; MODLER, H.W. (Eds.). **Food Proteins**: properties and characterization. Toronto: Wiley-VCH, 1996. Cap.4, p. 167- 234.

DAMONDARAM, S. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins, In: KINSELLA, J.E., SOUCIE, W.G. (Eds.). **Food Proteins**, 1989. Champaign, IL: The American Oil Chemists Society, p. 21-51.

de WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal Dairy Science**, Barking, v. 81, p. 597-608, 1998.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 17, p. 25-39, 2003.

DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.9, p.347-354, 1998.

DICKINSON, E.; GALAZKA, V.B. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -Lactoglobulin with polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 5, p. 281-296, 1991.

DICKINSON, E; IZGI, E. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v.113, p.191-201, 1996.

DICKINSON, E; STAINSBY, G. **Colloids in Food**. London: Applied Science Publishers, 1982.

EL-SAYED, M.M.; ABDEL HAMID, F.F.; AHMED, Y.M.; ALI, S.H.; MANSOUR, O.Y.; ABDALLAH, N.M. Biochemical studies on protein from cheese whey and blood plasma products. **Nahrung / Food**, New York, v.42, n.1, p.12-15, 1998.

FEDDERSEN, R.L.; THORP, S.N. Sodium Carboxymethylcellulose. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N., (Eds.). **Industrial Gums**. San Diego: Academic Press, 1993, 3 ed., cap. 20, p.537-578.

FONSECA, L.M.; BRADLEY JR, R. Precipitação de proteínas por meio de coacervação com carboidratos complexos. Revista do Instituto "Cândido Tostes". **Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.341-348, 2001.

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

GANZ, A.J. Cellulose Hydrocolloids. In: HORACE, D.G. **Food Colloids**. Connecticut: The Avi Publishing Company, 1977. Cap. 9, p. 382-437.

GLICKSMAN, M. In: GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**, 1982. Boca Raton: RC Press, v. 1, 219 p.

GLICKSMAN, M. In: GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**, 1983. Boca Raton: RC Press, v. 2, 199 p.

HALL, G.M. Basic Concepts. In: HALL, G.M. (Ed), **Methods of Testing Protein Functionality**, 1996. London: Chapman e Hall,. Cap. 1, p.1-10.

HANSEN, P.M.; HIDALDO, J. E GOULD, I.A. Reclamation of whey protein with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 6, p. 830-834, 1971.

HIDALGO, J. E HANSEN, M.T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 9, p. 270-274, 1971.

HILL, R.D.; ZADOW, J.G. Recovery of whey proteins from complexes of carboxymethyl cellulose and protein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 45, p. 77-83, 1978.

HILL, S.E. Emulsions and foams. In: J.R. MITCHELL; D.A. LEDWARD (Eds.). **Functional Properties of Food Macromolecules**, 1998. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers Inc., 2. ed., p. 302- 333,

HILL, S.E. Emulsions. In: Hall, G.M. (Ed). **Methods of Testing Protein Functionality**, 1996. London: Chapman e Hall. Cap. 6, p. 153-185.

HSIEH, Y.L., Regeinstein, J.M.; Rao, M.A. Gel point of whey proteins using dynamic rheological data. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 1, p. 116-119,1993

KATO, A.; SASAKI, Y.; FURUTA, R.; KOBAYASHI, K. Functional protein-polysaccharide conjugate by controlled dry-heating of ovoalbumin-dextran mixtures. **Agriculture Biological Chemistry**, 54: 107-112, 1990.

KILLARA, A. Interactions of ingredients in food systems: an introduction. In: GAONKAR, A.G. (Ed.). **Ingredient Interactions: Effects on Food Quality**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1995. Cap.1, p. 1-12.

KINSELLA, J.E. Relationship between structure and functional properties of food proteins. In: FOX, P.F; CONDON, J.J. (EGS.). **Food proteins**. New York: Applied Science Publishers, 1982. p.51.

KLEMASZEWSKI, J.L.; DAS, K.P.; KINSELLA, J.E. Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 2., p. 366- 371, 1992.

KRUIF, C.G.; TURNIER, R. Polysaccharide interactions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, p. 555-563, 2001.

LAPASIN, R.; PRICL, S. In: LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of Industrial polysaccharides: Theory and Applications**, 1999. New York: Aspen Publishers p.620.

LEDWARD, D.A. Protein-polysaccharide Interactions. In: N.S. HETTIARACHCHY E G.R. ZIEGLER (EGS.). **Protein Functionality in Food Systems**. New York: Marcel Dekker Inc., 1994, p. 225-259.

LEE, M.H. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, p. 49-52, 1996.

MANN, B., MALIK, R.C. Studies on some functional characteristics of whey protein-polysaccharide complex. **J. Food Science and Technology**, India, v.33, n.3, p.202-206, 1996.

MATSMURA, Y.; MORI, T. GELATION. In: HALL, G.M. (Ed), **Methods of Testing Protein Functionality**, 1996. London: Chapman e Hall, Cap. 4, p.76- 109.

MISHRA, S., MANN, B., JOSHI, V.K. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. **Food Hydrocolloids**, New York, v.15, n.1, p.9-15, 2001.

MODLER, H.W. Milk Processing. In: Nakai, S.; Modler, H.W. (EGS.), **Food Proteins – Processing Applications**, 2000. Canada: Wiley-VCH, Inc., Cap 1, p.1-88.

MOHANTY, B.; MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Emulsifying and foaming of acidic caseins and sodium caseinate. **Food Chemistry**, Oxford, v. 28, p. 17-30, 1988.

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

NAGASAWA, K.; TAKASHI, K., HATTORI, M. Improved emulsifying of β -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran. **Food Hydrocolloids**, New York, v.10, n.1, p.63-67, 1996.

NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar**, 2001. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Embrapa, p. 97-108.

PACHECO, Maria Teresa Bertoldo; AMAYA-FARFAN, Jaime; SGARBIERI, Valdemiro C. Obtenção de hidrolisados de concentrados protéicos de soro de leite por diferentes enzimas. In: PILOSO, A.M.R; AÑON, M.C. (EGS.). **Proteínas y Polisacáridos como Ingredientes Funcionales**. 1a. ed. La Plata, 2002, v. 1, p. 121-127.

PEARCE, N.K.; KINSELLA, J.E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimétrica technique. **Journal Agriculture and Food Chemical**, Washington, v. 26, p. 716-723, 1978.

PILOSOF, A.M.R. Geleificación. In: PILOSOF, A.M.R; BATHOLOMAI, G.B. (EGS.). **Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas**. Buenos Aires: EUDEBA, 2000. Cap. 4, p.75-96.

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

REDDY, I.M.; KELLA, N.K.D.; E KINSELLA, J.E. Structural and conformational basis of resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 36, p. 737, 1988.

SAMANT, S.K.; SINGHAL, P.R.; KULKARNI, P.R.; REGE, D.V. Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. **International Journal of Food Science and Technology**, Avenil, v. 28, n. 6, p. 547-562, 1993.

SCHENZ, T.W.; MORR, C.V. Viscosity. In: HALL, G.M. (Ed.). **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Chapman e Hall, 1996. Cap. 3, p. 61-75.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and techno functional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews un Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

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

SGARBIERI, Valdemiro C.; RANGEL, Humberto A.; PACHECO, Maria Teresa Bertoldo; ZINSLY, Patrícia F.; DIAS, Nádia F.g. Pereira. Novel Nutritional and physiological functions of milk proteins. In: **4TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF FOOD SCIENCE AND TECNOLOGY**. Proceedings of 4th International Conference of Food Science and Technology. China: Light Industry Press, 2000. v. 1, p. 296-209.

SHEPHERD, R., ROBERTSON, A., OFMAN, D. Dairy conjugate emulsifiers: casein-maltodextrins. **Food Hydrocolloids**, New York, v.14, n.4, p.281-286, 2000.

STEPHEN, A.M.; CHURMS, S.C. In: STEPHEN, A.M.(Ed.). **Food Polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. Cap.1, p.1-18.

STEFFE, J.F. In: STEFFE, J.F (Ed.). **Rheological Methods in Food Processing Engineering**. East Lansing: Freeman Press, 1996, 428p.

THOMAS, W.R. Carrageenan. In: IMESON A. (Ed.). **Thickening and gelling agents of food**. Gaithersburg, Maryland: Chapman & Hall, 1997. Cap.3 , 2.ed., p. 45-59.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional Properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 4, n. 6, p. 429-468, 1991.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional Properties of protein-polysaccharide mixtures. In: MITCHELL, J.R.; LEDWARD, D.A. (EGS.). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, 1986. p. 385-415.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: HILL, S.E.; LEDWARD, D.A.; MITCHELL, J.R. (EGS). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, 1998. Cap. 6, p. 252- 277.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein polysaccharide interactions. In: Damodaran, S.; Paraf, A (EGS.). **Food proteins and Their Applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997. Cap. , p. 171-198.

TOWLE, G.A.; WHISTLER, R.L. Chemical Modification of Gums. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. (EGS.). **Industrial Gums**, San Diego: Academic Press, 1993. 3 ed., cap.3, p. 53-67.

U.S. Dairy Export Council. **Manual de referências para produtos do soro dos E.U.A**, 1997.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G.M. (Ed.). **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Chapman e Hall, 1996. Cap. 2, p.11-60.

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

WHISTLER, R.L. Introduction to Industrial Gums. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. (EGS.). **Industrial Gums**, San Diego: Academic Press, 1993. 3 ed., cap. 1, p. 1-19.

WILDE, P.J.; CLARK, D.C. Foam formation and stability. In: HALL, G.M. (Ed), **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Chapman e Hall, 1996. Cap. 5, p.110-152.

ZECHER, D.; GERRISH, T. Cellulose Derivates. In: IMESON, A. (Ed.). **Thickening and gelling agents of food**. London: Chapmann & Hall, 1997. Cap. 4, p.60-86.

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE COM CARBOXIMETILCELULOSE

RESUMO

Em plantas industriais, onde há perda de proteínas na água de descarte residual do processamento, a técnica de interação com hidrocolóides comestíveis permite a obtenção de subprodutos que podem ser direcionados para a aplicação como ingredientes funcionais. O objetivo deste estudo foi fracionar as proteínas do soro de leite por utilizando a técnica de complexação com polissacarídeo, e para isso foi utilizada a carboximetilcelulose (CMC). Foram estudados a proporção dos polímeros (0,1 a 0,9% CMC p/v) e o controle do pH para obter uma precipitação seletiva das proteínas do soro de leite, otimizando as condições para escala de produção em planta piloto. Fazendo um ajuste gradual do pH, foi possível obter no pH 3,0 uma precipitação das proteínas totais (PT/CMC), no pH 4,0 da β -lactoglobulina (β -Lg/CMC) e no pH 3,2 a maior proporção de α -lactoalbumina (α -La/CMC). O maior rendimento foi obtido no fracionamento da β -lactoglobulina com 86% de recuperação. As frações foram avaliadas em relação ao perfil eletroforético e quanto à estabilidade térmica, medida através da técnica de DSC. Os resultados apontaram que a presença de hidocolóide no meio aumenta estabilidade térmica das proteínas. Para estudar o mecanismo de descomplexação em função de alterações do pH do meio (pH 2,0-6,0), foram realizadas análises nos sobrenadantes das amostras dispersas em diferentes pHs após a centrifugação. A quantidade de CMC e de proteína solúvel foi dosada nos sobrenadantes, e realizou-se eletroforese nativa em gel de poliacrilamida. A descomplexação ocorreu em pH 2,0; 5,0 e 6,0. Nestas condições observou-se maior porcentagem de proteínas e CMC solúveis e ainda a presença de bandas protéicas na eletroforese nativa, nas colunas correspondentes a estes pHs. No entanto, em pH 3,0 e 4,0, o complexo permaneceu co-solúvel e a proteína não se dissociou.

Palavras-chave: Polissacarídeo, carboximetilcelulose, coacervação, proteínas do soro de leite, estabilidade térmica.

OBTAINMENT AND CHARACTERIZATION OF THE COMPLEXES CARBOXYMETHILCELLULOSE WITH MILK WHEY PROTEINS

SUMMARY

In industrial plants with protein losses in residual discarding water of process, the interaction technique with food hydrocolloids can result in by-products that can be directed to its application as functional ingredients. This study aimed to achieve the precipitation and fractionization of milk whey proteins through polysaccharide interaction technique. It was used carboxymethylcellulose (CMC). It was studied the effect of variables such polymer concentration (0,1-0,9% CMC w/v) and pH control to obtain a selective precipitation of whey proteins. It was optimized the conditions to obtain a pilot scale production. It was made a pH gradual adjustment in order to obtain a ratio for pH 3,0 a precipitation of total proteins (PT/CMC); for pH 4,0 of beta-lactoglobulin (β -Lg/CMC); and for pH 3,2 the greatest proportion of alfa-lactoalbumin (α -La/CMC). The biggest field was obtained for β -Lg/CMC at 86% of recuperation. Differential scanning calorimetry (DSC) was evaluated in order to relate the thermal behavior of complexes and electrophoretic profile for known proteins fractions composition which was evaluated for different values of pH (2,0-6,0) after the centrifugation of dispersions for interaction stability analysis, such as Native-PAGE. DSC measurements could indicate that carboxymethylcellulose was very effective to establish the whey protein and to reduce its thermal denaturation temperature. The results showed that in the presence of hydrocolloids the proteins thermal stability increased and the acidify or increased of the pH promote partial descomplexation which is more significant for α -La/CMC for pH 2,0.

Key-words: Hydrocolloids, carboxymethylcellulose, cocervation, whey milk proteins, thermal stability.

1- INTRODUÇÃO

O soro de leite, proveniente da indústria de laticínios, vêm sendo cada vez mais utilizado na composição de bebidas lácteas e de alimentos formulados, como fonte protéica adicional para a nutrição humana. As proteínas que o compõem possuem diversidade de propriedades funcionais e, por isso, elevado potencial de aplicação na indústria de alimentos (CAYOT; LORIENT, 1997).

Recentemente, diversas técnicas têm sido desenvolvidas visando a recuperação das proteínas do soro, porém, o alto custo e o baixo rendimento no processo de secagem, são fatores limitantes para seu uso, principalmente quando se tratam de pequenos e médios produtores (FONSECA; BRADLEY Jr, 2001). A técnica de precipitação através de métodos como uso de sais, solventes orgânicos, polímeros não iônicos e polieletrólitos vêm sendo aplicados para a concentração e recuperação de proteínas (LALI et al., 2000). A interação entre biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos pode ser considerada uma tecnologia limpa e uma opção interessante para o fracionamento protéico.

Hidalgo; Hansen (1969); Hansen; Hidalgo; Gould (1971) e Hidalgo; Hansen (1971) foram pioneiros na utilização da técnica de complexação de proteínas do soro de leite com o polissacarídeo aniônico carboximetilcelulose, recuperando de maneira seletiva as proteínas do soro lácteo. Contudo, os autores não avaliaram propriedades nutritivas ou tecnológicas dos produtos obtidos.

Diferentes tipos de sistemas podem ser formados quando se promove a interação entre biopolímeros, sendo eles de fase única ou de duas fases. Nos sistemas de fase única ocorrem dois tipos de formação, um no qual os polímeros podem se apresentar simplesmente co-existentes na solução, e outra onde interagem entre si através de interações atrativas (TOLSTOGUZOV, 1997). Neste último caso, a interação refere-se a coacervação complexa, que é resultado de atrações principalmente do tipo eletrostática. Outras forças de atração que se envolvem na complexação são do tipo Van der Waals, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (SCHMITT et al., 1998; TOSTOGUZOV, 1997 e 1998).

A formação de complexo eletrostático entre proteínas e polissacarídeos aniônicos geralmente ocorre em uma faixa de pH que se encontra acima do valor da sua constante de ionização (pK) dos grupos aniônicos (grupos carboxílicos) dos polissacarídeos e abaixo do ponto isoelétrico (pI) das proteínas (TOSTOGUZOV, 1997). Esta condição de pH afeta o balanço de cargas e promove a interação entre as cargas opostas. A concentração de sal e a relação estequiométrica entre os polímeros também devem ser consideradas. Sendo assim, para que ocorra um equilíbrio na formação do complexo (Pr-Po), o processo de coacervação deve ser tratado a nível molecular, em termos de ligação dos macroíons protéicos catiônicos (ligantes) e dos macroíons do polissacarídeo aniônico, atuando como núcleo do complexo (TOSTOGUZOV, 1998).

Em estudo realizado por Weinbreck; Kruif (2003), utilizando CMC e isolado de soro de leite, através de técnicas turbidimétricas, buscou-se encontrar as melhores condições de pH e de concentração de NaCl para recuperar proteínas. Resultados mostraram que a menor absorvância ocorreu em faixas de pH abaixo do pI das proteínas, o que corresponde à maior recuperação protéica.

Esta técnica de formação de complexos insolúveis pode ser aplicada na recuperação de proteínas, na microencapsulação, na obtenção de ingredientes alimentares entre outros (TOSTOGUZOV, 1998; WEINBRECK; KRUIF, 2003).

Quando se forma um complexo coacervado entre proteínas e polissacarídeos, o comportamento térmico, a estabilidade conformacional e a funcionalidade protéica são modificados (TOLSTOGUZOV, 1991, 1994, 1997). Dependendo do tipo de proteína e das condições aplicadas do processo a desnaturação pode envolver apenas um segmento ou a molécula protéica toda (LILLFORD, 1978 apud MULVIHILL; DONAVAN, 1987).

A desnaturação das proteínas do soro de leite vem sendo pesquisada no leite integral, no soro e em suas frações purificadas (MULVIHILL; DONAVAN, 1987). A capacidade de resistência destas proteínas ao aquecimento varia dependendo de seu estado inicial nativo ou desnaturado (RELKIN, 1996).

O objetivo deste trabalho foi recuperar as proteínas do soro de leite de maneira seletiva, utilizando a técnica de coacervação complexa com o polissacarídeo carboximetilcelulose (CMC).

Avaliou-se a influência do pH na desestabilização do complexo e, utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC), avaliou-se a influência do hidrocolóide na estabilidade térmica das proteínas coacervadas.

A otimização da metodologia de obtenção das frações protéicas complexadas foi realizada em escala piloto para verificar a viabilidade da técnica e sua utilização em pequenos laticínios.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Matéria-prima

O soro de leite comercial “in natura” foi obtido numa indústria de queijos (tipo “minas frescal”) situada na região de Espírito Santo do Pinhal, estado de São Paulo.

Para os processamentos de complexação, utilizou-se a carboximetilcelulose sódica (CMC INDUSKOL FG-3000), gentilmente doada pela Denver-Cotia Indústria e Comércio Ltda. (SP), com Grau de Substituição (DS) de 0,65-0,85, de alta viscosidade e grau de pureza de 99,88%.

2.2- Métodos

2.2.1- Obtenção dos complexos fracionados

Devido ao elevado teor de lipídeos no soro, este foi conduzido ao desnatamento antes do processo de complexação. O soro foi aquecido a 40 ° C e centrifugado em uma centrífuga de pratos (JK Inka Laborthechnic RW 20 D2 Mn) com velocidade máxima de 8000 rpm.

Para solubilização da goma foi utilizado um homogeinizador de hélice (RW20 DZM.n, JK Ika Labortechnik) a velocidade de 2000 rpm. O polissacarídeo foi

disperso lentamente em água destilada a temperatura ambiente sob agitação até completa solubilização do material.

A solução de polissacarídeo foi adicionada ao soro líquido desnatado ($22\pm 1^\circ\text{C}$) com o objetivo de obter três complexos diferentes. O primeiro e o segundo complexos compostos das duas principais frações protéicas do soro, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, complexadas seletivamente, segundo a metodologia descrita por Hidalgo; Hansen (1971) com algumas modificações (Figura 1). O terceiro complexo de proteínas totais foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Hansen; Hidalgo; Gould (1971) ilustrada na Figura 2.

Para precipitar as frações β -Lg/CMC e α -La/CMC, foram utilizados valores de pH 4,0 e 3,2, respectivamente, seguindo a metodologia descrita por Hidalgo; Hansen (1971), ajustando os valores de pH com soluções de HCl 1,0 N.

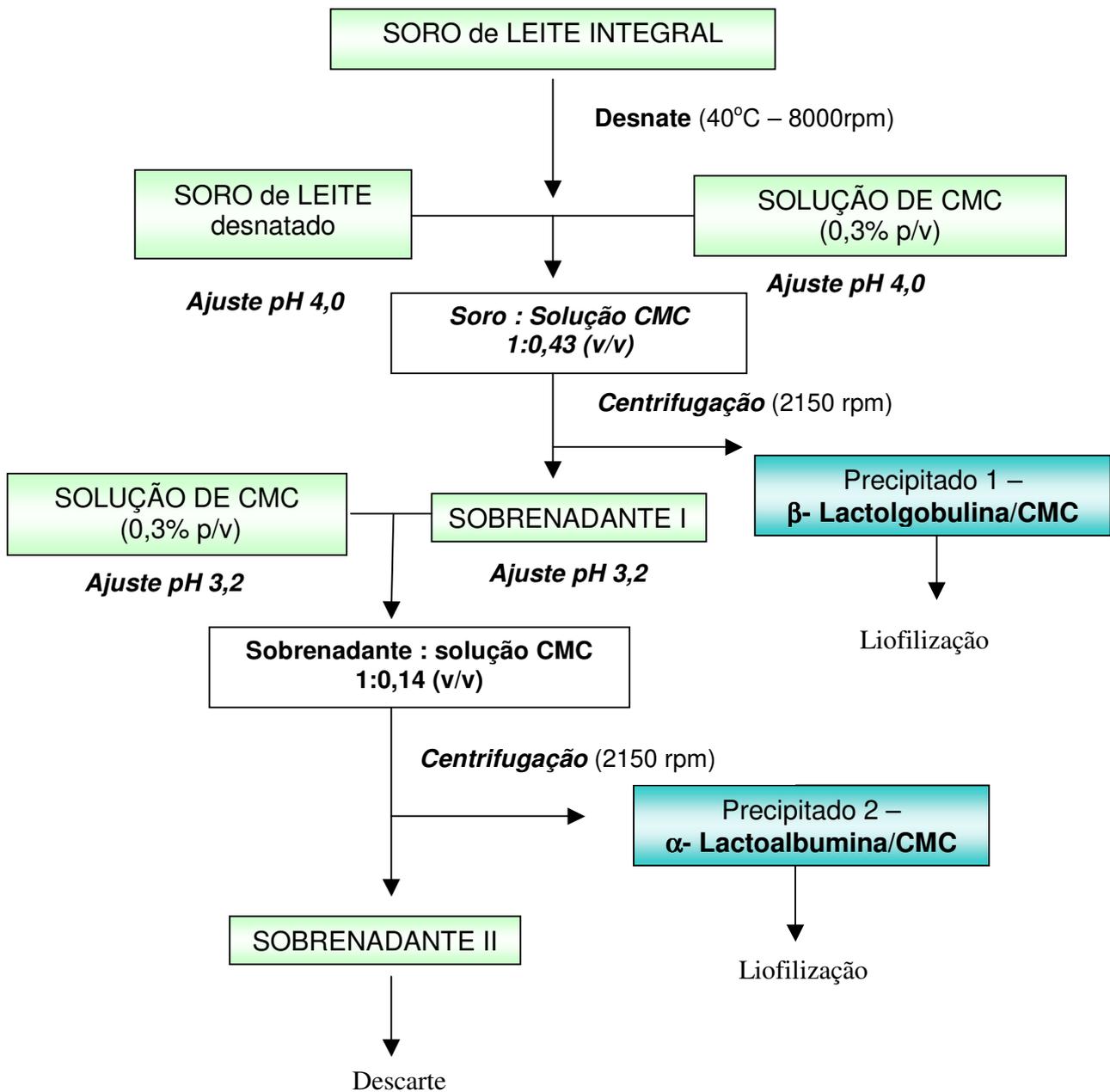


Figura 1- Fluxograma de obtenção das principais frações protéicas do soro complexadas com polissacarídeos - β -Lg/CMC e α -La/CMC (Hidalgo e Hansen, 1971).

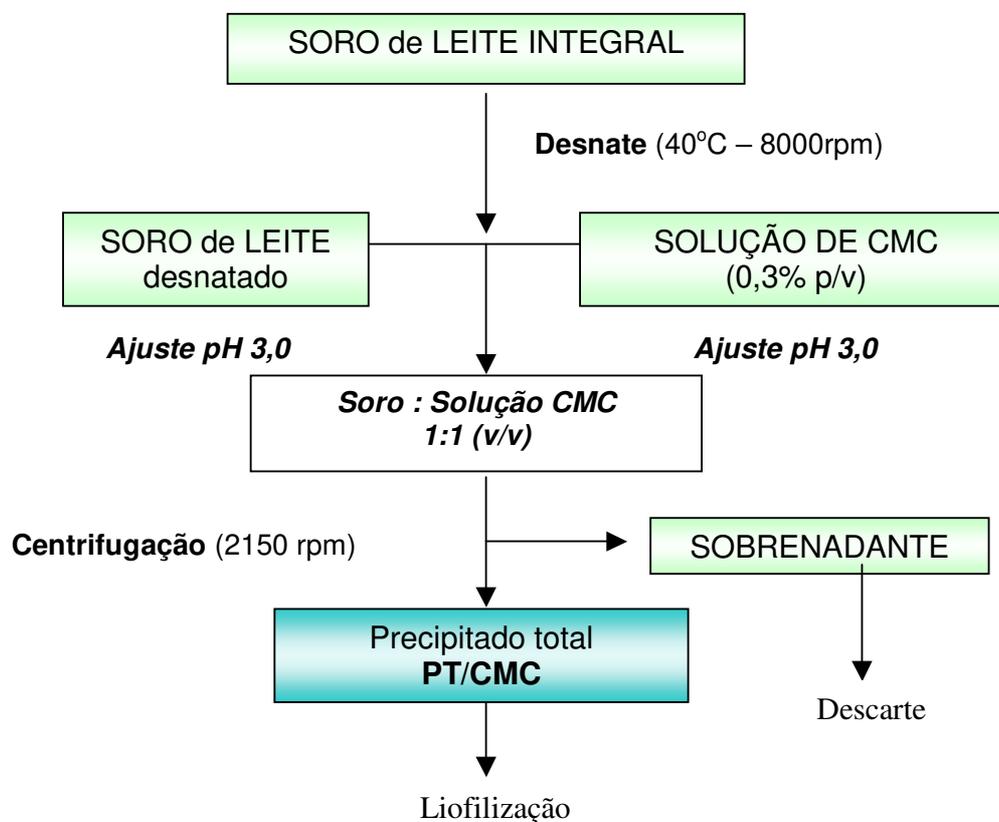


Figura 2- Fluxograma de obtenção de proteínas totais do soro complexadas com CMC – PT/CMC (Hansen, Hidalgo e Gould, 1971).

2.2.2- Estudo da concentração de CMC (%) e do pH para otimização da obtenção dos complexos

Foram realizados testes preliminares, em escala de laboratório, para determinar a concentração ideal entre os dois biopolímeros, de modo a obter uma maior precipitação fracionada das proteínas do soro.

Para estes testes utilizou-se a solução de CMC numa faixa de concentração variando de 0,1 a 0,9 % (p/v). Para selecionar a melhor concentração avaliou-se o teor de proteínas nos sobrenadantes após centrifugação, seguindo as etapas de complexação fracionada, de acordo com a metodologia descrita na Figura 1.

Em relação ao pH, para maior recuperação das proteínas do soro na fração PT/CMC (Figura 2), o estudo foi realizado na faixa de 2,0 - 4,5, sendo determinada a porcentagem de proteína no sobrenadante como critério de seleção.

2.2.3- Obtenção dos complexos em escala piloto

Para o trabalho em escala piloto, utilizou-se um volume de até 50 L de soro de leite desnatado. O soro e a solução de CMC (0,3% p/v), a temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, tiveram os valores de pH ajustados separadamente, com HCl 1,0 N, para os valores desejados (4,0; 3,2 e 3,0) de acordo com o precipitado a ser obtido. Em seguida, adicionou-se a solução de CMC ao soro, sob agitação. Após a fazer a mistura nas devidas proporções (Figuras 1 e 2), os complexos foram centrifugados para separação dos precipitados em centrífuga de cesto GEDR-Heinel (modelo 2250, n.º. de série 48586) a velocidade de 2150 rpm (Figuras 3 e 4).

Para controle e otimização do fluxo de alimentação da matéria-prima na centrífuga de cesto, utilizou-se uma bomba peristáltica de fluxo contínuo (Masterflex L/S, modelo 77250-62 – Cole-Parmer Instrument Company) nas vazões de 352 ml/min para obtenção do primeiro precipitado (β -Lg/CMC) e 176 ml/min, para o segundo (α -La/CMC).

O precipitado obtido foi armazenado a -15°C , para posterior liofilização. Todo processamento foi realizado na planta piloto do Grupo Especial de Engenharia do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL (Campinas - SP).

A Figura 3 ilustra o sistema de equipamentos que foram utilizados na obtenção dos complexos. Após o fracionamento o complexo era retirado da centrífuga, conforme foto da Figura 4.

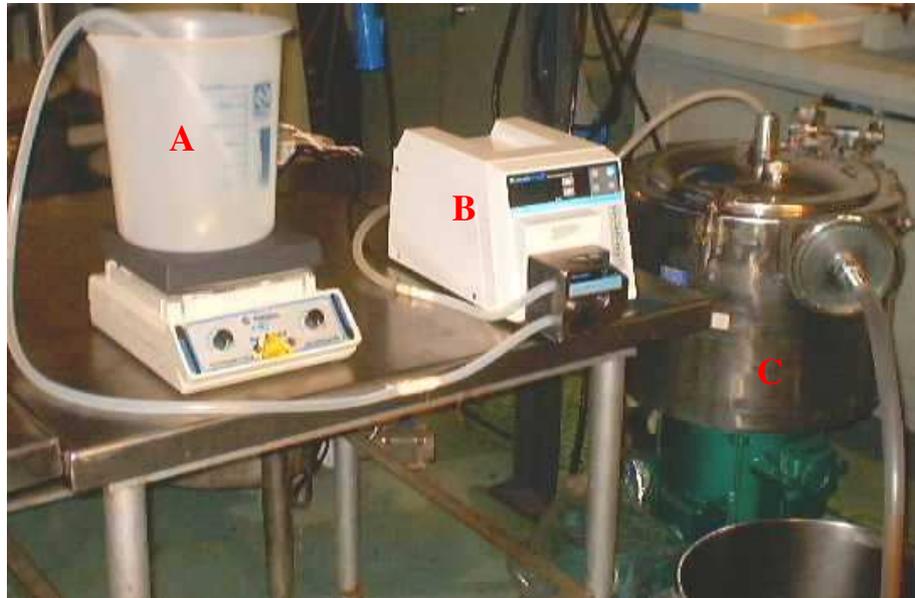


Figura 3– Sistema planejado para fracionar os complexos proteínas/CMC. As soluções permanecem sob agitação dentro do béquer (A), enquanto a bomba peristáltica (B) alimenta a centrífuga de cesto (C) de maneira contínua.

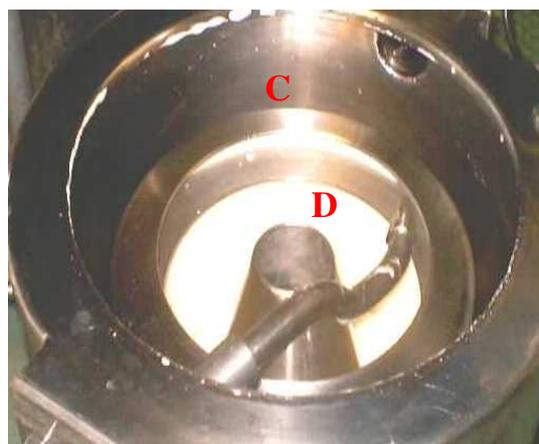


Figura 4- Vista superior da centrífuga de cesto (C) com o pescador que recolhe o sobrenadante e o precipitado (D) dentro do cesto.

2.2.4- Análises químicas

2.2.4.1- Nitrogênio total

Para acompanhamento da eficiência do processo, assim como para determinar a quantidade de proteínas nas frações complexadas, foi realizada a dosagem de nitrogênio no soro, nos sobrenadantes e nos complexos precipitados, utilizando a metodologia de micro-Kjeldahl segundo o método descrito pela AOAC (1990). O teor de proteína bruta foi calculado multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38.

A mesma metodologia foi utilizada para dosar a porcentagem de proteínas solúveis em diferentes condições de pH (2,0-6,0).

2.2.4.2- Lipídeos totais

A dosagem do teor lipídico nas frações complexadas foi realizada segundo o método descrito pela AOAC (1990), após hidrólise ácida, com ácido clorídrico concentrado.

2.2.4.3- Umidade, sólidos totais e resíduo mineral (cinzas)

Foram determinados de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1990).

2.2.5- Determinação de carboidratos solúveis

Para quantificar a porcentagem de carboidratos solúveis – CMC, utilizou-se a metodologia descrita por Hodge; Hofreiter (1962), que utiliza o método colorimétrico para determinar os carboidratos presentes solúveis presentes na solução.

Para obter a curva padrão da CMC foram feitas diluições (0,01 a 0,05 mg/mL) partindo de uma “solução mãe” de CMC a 0,1mg/mL, no pH original da amostra ($7,5 \pm 0,3$) e a leitura de absorção foi realizada no comprimento de onda de 480 nm.

Os três complexos foram diluídos a uma concentração inicial de 1 mg/mL. Após ajuste de pH nos valores de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0, as soluções permaneceram sob agitação por 30 minutos e em seguida foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 30 minutos (Centífuga.RC5C da marca Sorvall Instruments – DuPont) para obter somente os carboidratos solúveis. Tomou-se 0,5 mL do sobrenadante diluído (0,2 a 0,6 mL de sobrenadantes num volume total de 2 mL), acrescentou-se 0,5 mL de fenol a 5%, e por último 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos, foram feitas leituras a 480 nm em espectrofotômetro (Spectrophotometer Beckman, Du-70).

A partir das leituras de absorvância calculou-se a concentração (mg/100mL) de CMC solúvel nas diferentes amostras, em distintos valores de pH, em relação a quantidade inicial de CMC nas soluções.

2.2.6- Eletroforeses

2.2.6.1- Estudo eletroforético das frações precipitadas – SDS-PAGE

Para determinar a massa molecular das frações protéicas existentes nos complexos as amostras foram dissolvidas em tampão redutor contendo 62,5 mM Tris-HCl, 20% de glicerol, 2% SDS (10%), 5% de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol a pH 6,8, segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970) e Svasti; Paninjan (1977). A solubilização foi feita de modo a conseguir aproximadamente 0,5 mg/mL de concentração protéica final. No gel separador foi utilizada uma concentração de 12,5% de poliacrilamida. Como padrão de determinação das massas moleculares dos distintos polipeptídios foram usados padrões de β -Lactoglobulina – Sigma L4756, e um conjunto de marcadores de baixo peso molecular – Sigma M3913. As corridas foram realizadas no equipamento Bio-Rad.

2.2.6.2- Estudo eletroforético das frações protéicas solúveis em diferentes valores de pH – eletroforese NATIVA

Para determinar a fração protéica solúvel nos diferentes valores de pH, foram realizadas corridas em géis de poliacrilamida utilizando eletroforese nativa (NATIVE-PAGE), com 10% de concentração no gel de separação. Assim, 20 mg de complexo foram solubilizados em 1000 μ L de Tampão de pH, sendo estes os seguintes:

- Tampão Glicina 0,05M: pH 2,0
- Tampão Acetato de Sódio 0,05M: pH 3,0; 4,0 e 5,0
- Tampão Fosfato Potássio Monobásico 0,05M: pH 6,0

Essas amostras foram agitadas em agitador de tubos por aproximadamente 1 minuto. Em seguida foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Tomou-se 50 μ L do sobrenadante que foi novamente diluído em 100 μ L de tampão amostra (Nativo) contendo Tris-HCl 0,5 M, a pH 6,8 e 20% de glicerol. Agitou-se novamente em agitador de tubos e 10 μ L desta solução foram injetados em cada poço. Após a corrida, os géis foram corados em Corante Coomassie Blue.

2.2.7- Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi utilizada para determinar o comportamento térmico das amostras, medindo os seguintes parâmetros: temperatura inicial de desnaturação (T_0), temperatura de pico (T_p) (máxima de desnaturação) e a entalpia (ΔH) (calor necessário no processo de desnaturação das proteínas).

Para as corridas foram preparadas soluções dos complexos β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC numa concentração final de 25% de sólidos, após o ajuste de pH. As soluções tiveram o pH ajustados entre 2,0 e 8,0, sendo que as variações visaram verificar a influência do pH na estabilidade térmica do complexo.

Para comparar o comportamento térmico dos complexos foram utilizadas como referências amostras de concentrado protéico de soro de leite (CPS ou WPC) e dos biopolímeros simplesmente misturados, sem coacervação. Utilizou-se como um dos padrões de referência o WPC – 83% de proteínas, a 25% em pH 6,5 e também uma mistura de soluções de WPC com CMC na proporção 4:1 (prot:pol (v/v)), em pH 6,5.

Realizaram-se corridas em cápsulas de alumínio de 160 μ L, contendo no mínimo 50 mg de solução. Para estudar a transição térmica dos complexos foi utilizado o calorímetro diferencial de varredura (Mettler-Toledo DSC 822). A análise dos termogramas foi realizada com o Software Stare. Como referência utilizou-se uma cápsula de alumínio vazia padrão. As soluções foram aquecidas a uma velocidade de 10^oC/min, numa faixa de temperatura entre 5 a 100^oC.

- Parâmetros calorimétricos

Foram avaliadas as temperaturas de início e de pico de desnaturação, assim como as alterações de entalpia aparente (ΔH) envolvidas no processo.

A temperatura de início de desnaturação (T_o) é dada pela temperatura na qual se inicia a desnaturação, a temperatura de pico (T_p) ocorre quando a maior parte ou a totalidade da proteína existente se desnatura e a temperatura final (T_f) é calculada após a desnaturação de toda a amostra. Como a desnaturação é um processo endotérmico, calcula-se a entalpia de desnaturação (ΔH) partir da integração da área endotérmica entre os valores de T_p e T_f (temperatura final), utilizando uma linha de base ajustada entre os valores de início e de fim de desnaturação (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Os parâmetros calorimétricos avaliados mencionados acima estão representados na Figura 5.

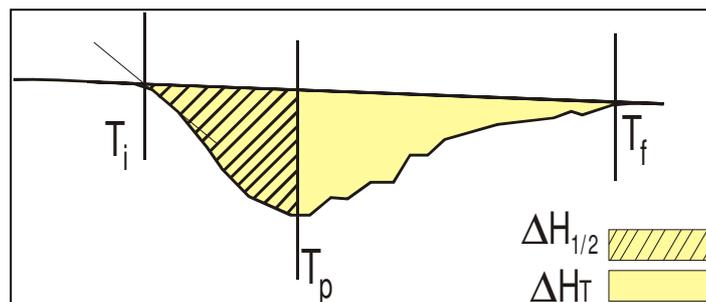


Figura 5- Parâmetros calorimétricos avaliados em relação à desnaturação dos complexos coacervados de proteínas de soro de leite com CMC.

2.2.8- Tratamento estatístico

Os resultados de otimização da concentração de CMC (%) e do pH foram submetidos à análise estatística utilizando o Programa SAS através da análise de variância (ANOVA) e análise das diferenças entre as médias segundo o teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como critério de significância.

3- RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1- Testes preliminares para definição da concentração de CMC e de pH.

3.1.1- Estudo da melhor concentração de CMC (%)

Para escolher a melhor concentração de CMC visando máxima recuperação protéica das frações β -Lg/CMC (pH 4,0) e α -La/CMC (pH 3,2), variou-se a concentração da solução de CMC de 0,1 a 0,9% (p/v), seguindo as etapas de complexação fracionada, de acordo com a metodologia descrita no Fluxograma da Figura 1.

Embora pela análise estatística os valores para as concentrações de 0,1 e 0,3% (p/v) não sejam significativamente diferentes ($p < 0,05$), optou-se pela concentração 0,3% (p/v) de solução de CMC pela melhor facilidade do manuseio do precipitado após centrifugação (melhor consistência). Neste valor ocorreu menor concentração, em valores absolutos, de proteínas tanto no sobrenadante 1 como no 2 (Figura 6). HANSEN, HIDALGO e GOULD (1971), mostraram que numa

concentração crescente de CMC de 0,15 até 0,3% (p/v) fixando a proporção de 1:1 ((v/v) soro : CMC), conseguiu-se recuperar mais de 90% das proteínas com a solução do hidrocolóide a 0,25% (p/v).

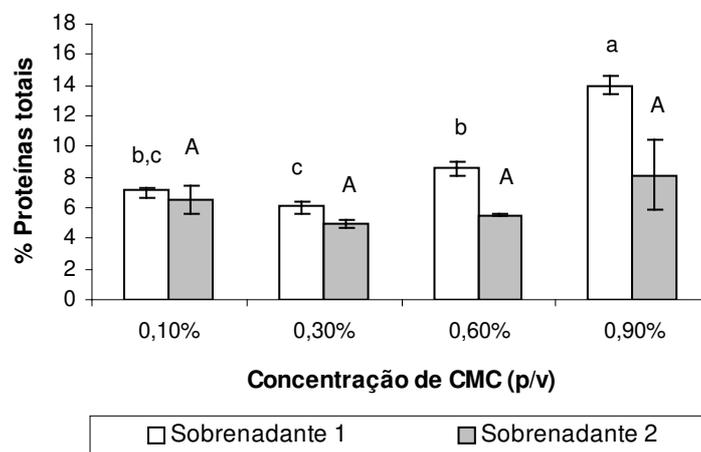


Figura 6- Concentração de proteína bruta nos sobrenadantes 1 e 2, após a complexação e precipitação das frações com diferentes concentrações de CMC (0,1 a 0,9% p/v).

* as letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas (A) indicam tratamento estatístico dos resultados do sobrenadante 2, e as minúsculas (a, b, c), do sobrenadante 1, isoladamente.

Em estudos realizados por Fonseca; Bradley Jr. (2001), a CMC de alta viscosidade resultou na precipitação máxima de proteínas na proporção estequiométrica 8:1 (proteína:carboidrato), enquanto a CMC de baixa viscosidade não precipitou proteínas,

3.1.2- Otimização do pH para obtenção da fração proteínas totais (PT/CMC)

Definida a melhor concentração da solução de CMC para precipitação das proteínas (Figura 6), variou-se o pH para verificar a influência deste parâmetro e obter máxima precipitação protéica na fração proteínas totais (PT/CMC). Neste caso, a proporção entre os volumes das soluções de CMC 0,3% (p/v) e soro de

leite foi de 1:1 (v/v), sendo a relação estequiométrica de biopolímeros de 3:1 (p/p) de proteínas: CMC.

Na Figura 7 observa-se que em pH 3,0 houve uma diferença significativa entre as médias obtidas de concentração de proteínas nos sobrenadantes ($p < 0,05$), portanto, optou-se pelo pH 3,0 para precipitar a fração PT/CMC.

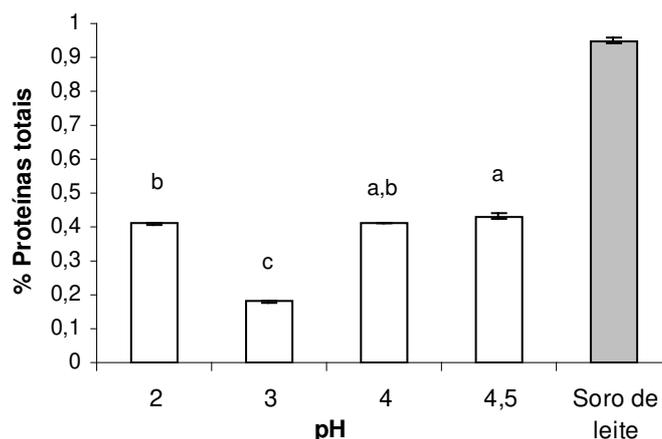


Figura 7 – Concentração de proteínas no sobrenadante após precipitação com CMC 0,3% (p/v) na relação 3:1 (proteínas: polissacarídeos p/p) em diferentes pHs, e no soro de leite desnatado.

* as letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Como a maior parte das interações que ocorrem no processo são do tipo eletrostática, faz-se necessário que os valores de pH estejam abaixo do pI das proteínas do soro, garantindo que estejam suficientemente desprotonadas para que ocorra a reação de complexação. Sabe-se que o pI da β -lactoglobulina encontra-se na faixa de 5,2, e da α -lactoalbumina entre 4,2 e 4,5 (SCHMITT et al., 1998).

Na faixa de pH 3,0 (Figura 7), onde ocorreu a máxima precipitação de proteínas, provavelmente ocorre maior balanço entre as cargas negativas no carboidrato e cargas positivas nas proteínas. Neste pH, os sítios de ligação das proteínas carregados positivamente são grupos amino, que realizam ligação com

os grupos carboxílicos desprotonados da goma (FONSECA; BRADLEY Jr., 2001; TOLSTOGUZOV, 1997 e 1998).

Mudança na intensidade de coloração do soro de leite desnatado, comparado aos sobrenadantes 1 e 2 após a obtenção dos complexos de β -Lg/CMC (pH 4,0) e α -La/CMC (pH 3,2), é mostrada na Figura 8. Verifica-se que a intensidade de cor diminui à medida que as proteínas vão sendo precipitadas, refletindo a menor concentração de sólidos solúveis.

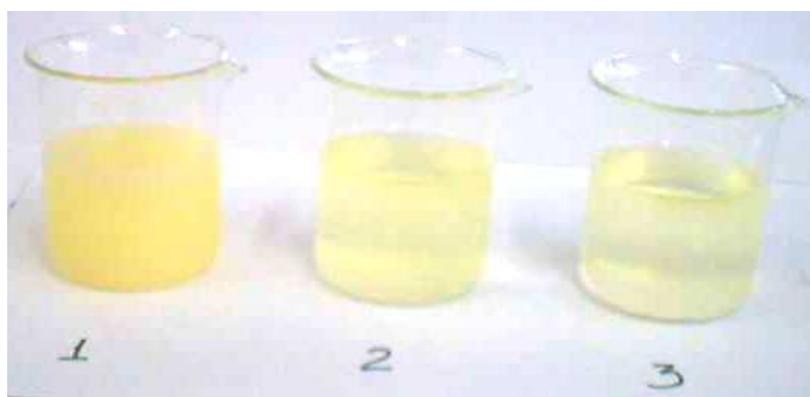


Figura 8- Soro de leite após o desnatamento (1) e sobrenadantes (2) e (3), após os respectivos fracionamentos, segundo a metodologia descrita na Figura 1.

3.2- Caracterização dos complexos, sobrenadantes e soro de leite desnatado

As amostras de soro de leite e dos complexos (liofilizado) foram caracterizados quanto à sua composição química parcial: teor de proteínas, lipídeos, carboidratos e resíduo mineral (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição centesimal do soro de leite desnatado e das amostras de proteínas complexadas com CMC, em base seca.

AMOSTRAS				
Determinações	Soro de Leite desnatado	β -Lg/CMC	α -La/CMC	PT/CMC
Proteínas Totais (%)	13,05 \pm 0,43	57,23 \pm 0,32	35,96 \pm 1,73	48,33 \pm 0,53
Lipídeos Totais (%)	0,89 \pm 0,05	9,42 \pm 0,01	3,21 \pm 0,002	7,37 \pm 0,13
Resíduo Mineral (%)	9,31 \pm 0,05	1,98 \pm 0,96	4,14 \pm 1,81	1,76 \pm 0,04
Carboidratos (%)*	76,73	31,37	56,69	42,54
Cloretos (mg/100g)	2481 \pm 35	**	**	**

* Calculado por diferença: 100 - (Proteínas + Lipídeos + Cinzas) = % carboidratos

**Não determinado.

A concentração inicial de proteínas no soro de leite integral foi de aproximadamente 12% (em base seca). Devido ao elevado teor de lipídeos nesta amostra, em torno de 10%, foi feito seu desnate antes da complexação, o que acabou elevando o teor de proteínas e de outros componentes.

A concentração de cloretos presente na amostra inicial de soro de leite desnatado pareceu não interferir no processo de formação e precipitação dos complexos, nas condições estabelecidas.

A fração β -Lg/CMC arrastou maior quantidade de lipídeos aumentando cerca de dez vezes sua concentração em relação ao soro de leite desnatado. Comportamento similar foi observado para o complexo PT/CMC.

Observa-se que a fração β -Lg/CMC contém maior teor de proteínas que as demais, comprovando maior rendimento na etapa de complexação e de fracionamento (Tabela 2).

O máximo rendimento alcançado com o Precipitado 1, em relação à porcentagem de proteínas recuperada, observado pela menor quantidade de proteínas no sobrenadante após a primeira precipitação, pode ser justificado pelo

fato da β -Lactoglobulina ser a fração protéica mais abundante no soro e por apresentar quase 50% de sua estrutura na forma desorganizada, tornando-a sensível e reativa as variações de pH e a outras alterações do meio (MODLER, 2000).

Ao analisarmos a matéria seca total, obtida a partir de 50 L de soro desnatado, observou-se que a maior quantidade de complexo seco foi obtida com a fração PT/CMC (Tabela 2), porque provavelmente ele arrastou quantidades equivalentes de proteína e CMC devido à relação estequiométrica de 1: 0,9 (proteínas : CMC) .

Tabela 2 – Rendimento em peso seco e recuperação protéica nos complexos secos por liofilização a partir de 50L de soro de leite desnatado.

Amostras	Peso seco (g)	Rendimento de proteína (%)
β-Lg/CMC	300	86
α-La/CMC	50	31
PT/CMC	400	53

O melhor rendimento de coacervação é obtido quando há uma proporção ideal de mistura das moléculas por peso, cujo valor de pH proporcionará uma razão equivalente de cargas opostas entre os polímeros ionizados. Este valor de pH é chamado de pH de equivalência (SCHMITT et al., 1998).

A amostra α -La/CMC, embora tenha resultado em menor teor de lipídeos e proteínas, apresenta maior conteúdo de carboidratos proveniente da CMC, na proporção de 1:1,5 (Proteína:CMC). Provavelmente, parte desta proteína permaneceu solúvel após precipitação desta fração, como pode ser observado na Figura 6.

3.3- Efeito da variação de pH na estabilidade dos complexos

3.3.1- Determinação do teor de proteínas e de carboidratos (CMC) solúveis

A determinação de quantidade de CMC livre numa solução como citada em alguns trabalhos, pode ser utilizada para verificar o grau de complexação ou perda de complexação da goma com a proteína (HIDALGO HANSEN, 1969; HANSEN; HIDALGO; GOULD, 1971; GIRARD, TURGEON; PAQUIN, 2002). Neste caso, analisou-se a quantidade de CMC e também de proteínas presentes nos sobrenadantes de soluções preparadas na faixa de pH 2,0 a 6,0, a fim de verificar a influência do pH na desestabilização do complexo e justificar alterações na viscosidade do sistema em relação ao pH.

A concentração, em porcentagem (%), de proteínas e de carboidratos solúveis, em relação à variação de pH, foi determinada em sobrenadantes obtidos após centrifugação, partindo-se de soluções de 1 mg/mL de complexo. A concentração protéica inicial das amostras de β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC foi de respectivamente 0,5723 mg; 0,3596 mg e 0,4833 mg. Já a quantidade de CMC inicial nas amostras foi de 0,3137 mg para a β -Lg/CMC, 0,5669 mg para a α -La/CMC e de 0,4254 para a PT/CMC, sendo os cálculos da solubilidade (mg/mL) realizados a partir destas concentrações. O objetivo destas análises foi verificar se o pH ocasiona descomplexação total ou parcial dos coacervados.

Para todas as amostras a porcentagem mínima de proteínas e CMC solúveis ocorreram nos valores de pH iguais ou próximos ao de obtenção dos complexos (3,0 a 4,0) (Figura 9 A, B e C). Nestas condições, a solubilidade da proteína foi de 18,3% para a β -Lg/CMC (Figura 9A) e 23,01% para a α -La/CMC (Figura 9B). No caso do complexo PT/CMC em pH 3,0 (original) e 4,0, os resultados foram menores que 2% (Figura 9C). Todavia, os resultados, expressos em mg/100mL, mostraram que em pH ácido e em pH na faixa próxima a neutralidade (6,0) a concentração de proteínas que solubiliza foi maior para todas as amostras, sendo menos expressiva para a PT/CMC.

Em relação à quantidade de proteínas solúveis, observou-se que a amostra β -Lg/CMC obteve maior solubilidade em pH 2,0 e 6,0 (97,36 e 95,62%) representando o complexo que apresentou maior dissociação protéica (Figura 9A). A mesma tendência em relação ao pH foi observada com a α -La/CMC, ou seja, 87,53% e 74,08% de solubilidade protéica em pHs 2,0 e 6,0, respectivamente (Figura 9B). No entanto, esta amostra apresentou maior solubilidade de CMC que proteínas, assim como a PT/CMC, o que justifica pela maior proporção proteína:carboidrato existentes nestes complexos quando comparada à β -Lg/CMC.

Em relação à quantidade de CMC solúvel, os complexos apresentaram porcentagem de solubilidade distintas entre si em relação à amostra inicial. A Figura 9 (A, B e C) abaixo, representa a concentração em porcentagem (mg/100mL) de proteínas e de CMC solúveis dos três complexos em valores diferentes de pH.

O complexo β -Lg/CMC (Figura 9A) apresentou mínima quantidade de CMC solúvel em pH 4,0 (original – 13,4%) e máxima nos valores de pH entre 5,0 e 6,0 (aproximadamente 45% de CMC solúvel), sendo que na faixa de pH entre 2 e 3 a CMC foi de aproximadamente 30%.

Observa-se que para a amostra α -La/CMC (Figura 9B) a solubilidade do carboidrato foi maior em pH 2,0 (56,52%). A mínima concentração de CMC solúvel foi observada na faixa de pH 3,0 (45,11%), sendo que os valores permaneceram praticamente constantes com a elevação do pH, variando de 46 para 49,5%. Contudo, pode-se afirmar que para a amostra em questão, mesmo no valor de pH de obtenção do complexo (pH 3,0), existe uma parte da CMC que se encontra co-solúvel no meio e se precipita sem estar coacervado com a proteína (Figura 9).

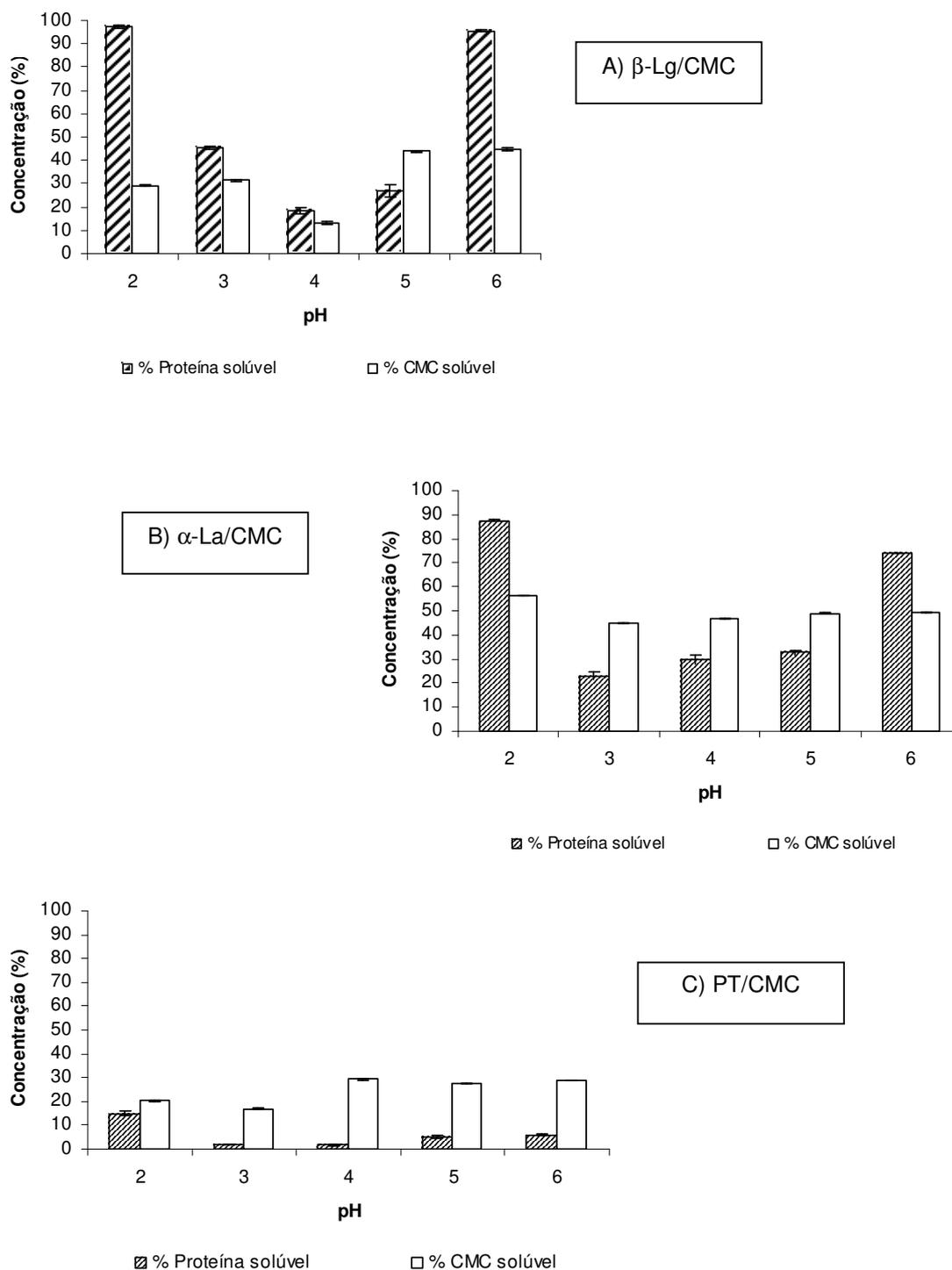


Figura 9- Concentração (mg/100mL) de proteínas e CMC solúveis em diferentes valores de pH, a partir de uma concentração de 1 mg/mL de complexo. As letras A, B e C representam, respectivamente, as amostras β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC.

O complexo PT/CMC (Figura 9C) apresentou um comportamento distinto, no qual a maior parte de CMC presente solubilizou-se em pH 4,0 (29,2%), permanecendo constante com a elevação do pH até 6,0 (28,9%). No pH de formação do complexo (3,0) e no pH 2,0, a solubilidade da CMC foi reduzida em torno de 20%.

Durante a formação do coacervado, a carga líquida do polissacarídeo diminui a partir do agrupamento gradual aos macroíons protéicos. Essa redução da carga líquida conseqüentemente acarreta a redução da solubilidade do complexo obtido. Isto também leva à redução do *pI* do precipitado em relação ao *pI* protéico inicial, e, portanto, a redução de energia livre do sistema (TOLSTOGUZOV, 1986).

Esses fatores justificam a menor quantidade de CMC e proteínas solúveis nas faixas de pH de obtenção dos complexos. Entretanto, como a coacervação ocorre através de interações do tipo eletrostática, essas ligações podem se dissociar com as mudanças das condições do meio (TOLSTOGUZOV, 1998; KRUIF; TURNIER, 2001). Conseqüentemente, os resultados obtidos comprovam a maior concentração de proteínas e carboidratos no sobrenadante à medida que se afasta do pH de obtenção, sendo este mais visível na fração β -Lg/CMC em pHs 2,0 e 6,0.

3.4- Estudo eletroforético das frações precipitadas e dos complexos solubilizados em distintos valores de pH.

3.4.1- Estudo eletroforético das frações precipitadas – SDS-PAGE.

Os perfis eletroforéticos dos complexos β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC, obtidos por coacervação em pH ácido, estão apresentados na Figura 10. Observa-se, que as proteínas foram precipitadas de maneira seletiva, ou seja, apesar de haver frações protéicas contaminantes foi possível obter amostras ricas em β -Lg e em α -La, sendo as mesmas classificadas como β -Lg/CMC e α -La/CMC, respectivamente. Como se esperava, a amostra de PT/CMC contém as duas frações protéicas principais em sua composição, além da BSA.

No trabalho de Hidalgo; Hansen (1971), citado como referência na metodologia de obtenção dos complexos, foram observadas bandas de β -Lg, quando complexada em pH 4,0, ficando visível no sobrenadante a presença da fração α -La, o que indica que neste pH esta proteína não precipita. Porém em pH 3,2, utilizando uma solução de CMC 0,37%, a fração α -La apresentou maior proporção no complexo.

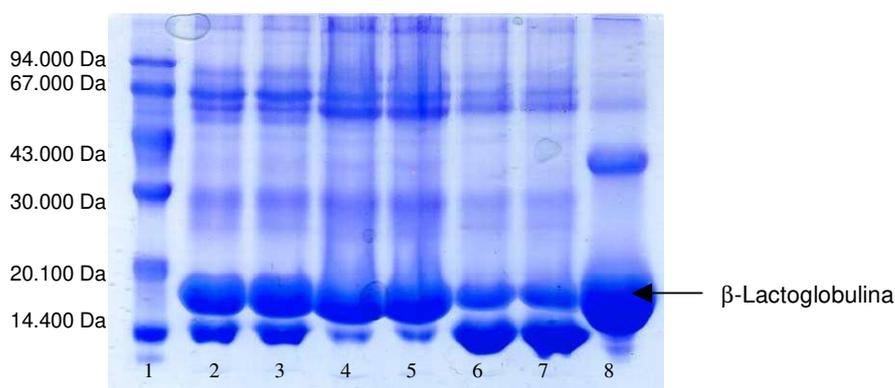


Figura 10 – Eletroforese SDS-Page, em gel 12,5% de poliacrilamida. Colunas: 1- Padrão de baixo peso molecular; 2 e 3- fração PT/CMC; 4 e 5- fração β -Lg/CMC; 6 e 7- fração α -La/CMC; 8- Padrão de β -Lg.

3.4.2- Estudo eletroforético das frações protéicas solúveis em diferentes valores de pH – eletroforese NATIVA.

Neste estudo foi avaliada a presença de proteínas solúveis nos sobrenadantes das amostras em diferentes valores de pH, utilizando variados tampões. Desta forma, pode-se correlacionar a presença de bandas protéicas com a descomplexação do coacervado.

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam os resultados das proteínas solubilizadas em diferentes pHs (2,0 a 6,0) em eletroforese nativa realizadas em géis de poliacrilamida.

Na Figura 11 observa-se o gel com as amostras de α -La/CMC em diferentes pHs. Pode-se dizer que em pHs 2,0; 5,0 e 6,0, ocorre uma

descomplexação que pode ser visualizada pela presença de bandas protéicas no gel. Apesar de haver outras frações protéicas contaminantes, as faixas correspondentes às bandas de α -La se apresentam com maior intensidade.

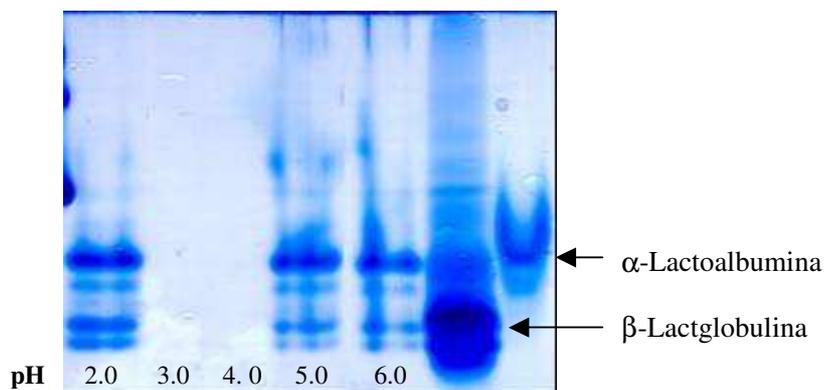


Figura 11- Eletroforese Page-Native (gel de poliacrilamida 10%) da amostra de α -La/CMC em diferentes pHs. As duas últimas colunas correspondem aos padrões de β -Lg e α -La, respectivamente.

Comparando os resultados da eletroforese (Figura 11) com a Figura 9B, nota-se que a amostra α -La/CMC apresentou valores de polissacarídeos e proteínas solúveis para todas as faixas de pH estudadas (56% em pH 2,0 a 50% em pH 6,0). Porém, em pH 3,0 e 4,0 as colunas pH correspondentes na eletroforese não mostraram presença de proteínas. Nestes valores a quantidade de proteínas solúveis determinada anteriormente foi de 23 e 29,5%, respectivamente, o que indica que aproximadamente 77 a 70% das proteínas existentes na amostra inicial estão unidas e insolúveis e o restante solúvel com o coacervado. Em relação à concentração de CMC, a solubilidade foi de 45%.

Analisando os resultados obtidos pode-se dizer que é provável que a fração protéica encontre-se unida e solúvel nestas faixas de pH (3,0 e 4,0), sendo o peso molecular do complexo muito elevado, este não penetra no gel. Por outro lado, nas faixas de pH 2, 5 e 6 o coacervado se descomplexa e a proteína é capaz de penetrar livremente no gel, conforme observado na Figura 11.

As amostras de β -Lg/CMC (Figura 12) tiveram o mesmo comportamento descrito anteriormente, ou seja, no mais baixo e nos mais altos valores de pH aparecem bandas de proteínas no gel, correspondentes à proteína livre.

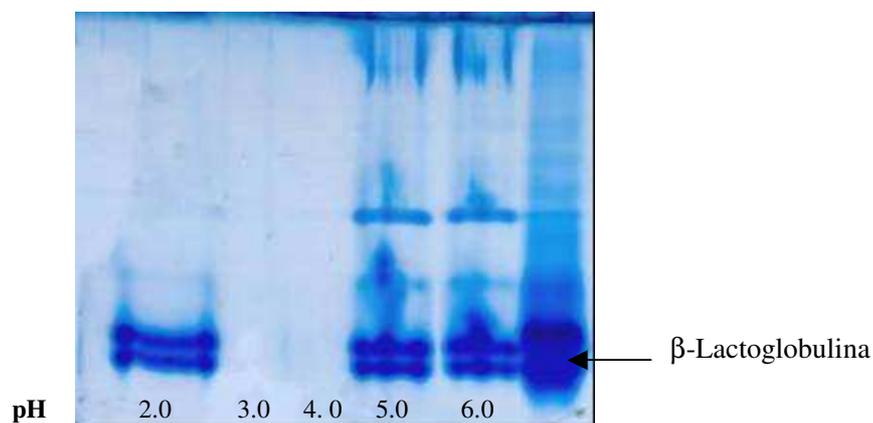


Figura 12- Eletroforese Page-Native (gel de poliacrilamida 10%) da amostra de β -Lg/CMC em diferentes pHs. A última coluna corresponde ao padrão de β -Lg.

Comparando a coluna da eletroforese correspondente ao pH 4,0 (Figura 12) com os dados obtidos de solubilidade protéica e de CMC (Figura 9A), pode-se dizer que nestas condições o complexo se apresenta insolúvel. Já em pH 3,0, 31,4% da CMC e 45,3% das proteínas encontram-se solúveis. Contudo, a proteína não se faz presente no gel. Pode-se sugerir que nestes valores de pH (3,0 e 4,0) o complexo apresentou-se parcialmente solúvel, indicando que aproximadamente 55 e 80%, respectivamente, das proteínas coacervadas estão unidas ao polissacarídeo, no estado de co-solubilidade e não penetram no gel.

Em relação aos valores de pH 5,0; 6,0 e 2,0, ao comparar a Figura 10 com a Figura 9A, pode-se afirmar que ocorre uma descomplexação parcial da CMC. Em pH 2,0 estimou-se que 30% dos carboidratos encontraram-se descomplexados, enquanto 70% estavam unidos às proteínas e insolúveis. Nos valores de pH 5,0 e 6,0 detectou-se 45% de solubilidade da CMC, sendo que 55% permaneceram unidos e insolúveis.

Ao correlacionar valores de proteínas solúveis e bandas protéicas presentes no gel, nota-se que em pH 2,0 e 6,0 estes resultados foram de, respectivamente, 97,4 e 95,6% de solubilidade de proteínas. Sendo que 80% das proteínas permaneceram unidas e insolúveis em pH 4,0,

A Figura 13 apresenta o resultado da eletroforese nativa das amostras de PT/CMC. Pode-se verificar que este complexo também foi insolúvel nos pHs 3,0 e 4,0, sendo que em pH 5,0, 6,0 ou 2,0 as bandas de proteínas de soro de leite puderam ser visualizadas.

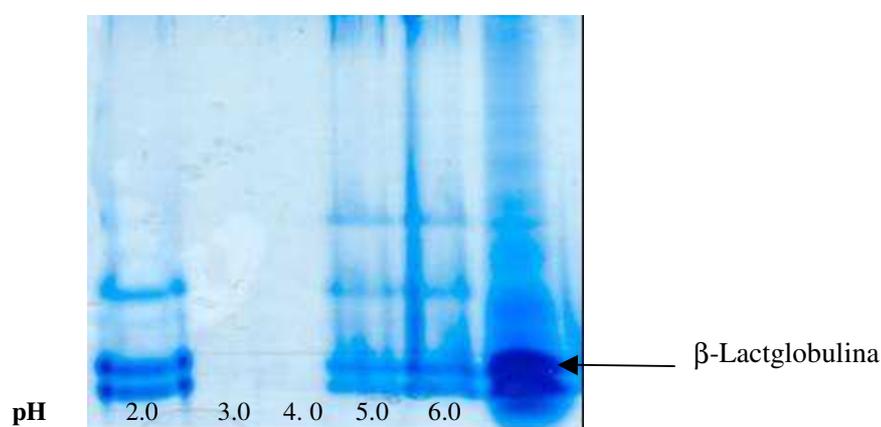


Figura 13- Eletroforese Page-Native (gel de poliacrilamida 10%) da amostra de PT/CMC em diferentes pHs. A última coluna corresponde ao padrão de β -Lg.

Nesta amostra (PT/CMC) a quantidade de proteínas solúveis em pH 3,0 e 4,0 foi menor que 2%, indicando que aproximadamente 98% das proteínas continuam unidas e insolúveis (Figura 9C). A quantidade de CMC insolúvel em pH de obtenção (3,0), também foi máxima (83%).

Resultados similares não foram encontrados na literatura, pois os trabalhos sobre interação de proteínas com polissacarídeos utilizando a técnica de coacervação complexa não têm utilizado a técnica de eletroforese para caracterizar o perfil de solubilidade das proteínas em função do pH.

3.5- Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Ao relacionar as temperaturas de início (T_o) e de pico de desnaturação térmica (T_p), dentro de uma mesma faixa de pH (6,5) pode-se afirmar, através dos resultados da Tabela 3, que todos os complexos, inclusive a mistura (sem interação de coacervação) de WPC:CMC, tiveram aumento da estabilidade térmica em relação ao WPC puro. Isto indica que tanto a complexação com CMC como simplesmente a sua presença ocasiona um aumento na estabilidade da proteína em relação à temperatura.

Tabela 3 – Valores de T_o e T_p obtidos com as amostras de WPC e complexos fracionados a 25% de concentração, e mescla de WPC:CMC a 20%, todas ajustadas em pH $6,5 \pm 0,5$.

Amostra	T_o (°C)	T_p (°C)
α-La/CMC	81	88.3
β-Lg/CMC	79	83
PT/CMC	80.7	85
WPC:CMC	77.7	77.8
WPC	70	75.3

Diversos trabalhos, utilizando a técnica de DSC, citam resultados de temperatura de início e temperatura de pico de desnaturação para as frações protéicas do soro de leite β -Lg, α -La e BSA (Tabela 4). Ao comparar estes dados com os resultados expressos na Tabela 3, é possível dizer que nas faixas de pH 6,0 a 7,5 os autores encontraram menores valores de T_p para as todas as proteínas estudadas, incluindo o WPC quando comparados aos valores dos complexos. Ou seja, as proteínas do soro quando complexadas com CMC, e em pH 6,0, resultaram em aumento da estabilidade térmica.

Tabela 4- Valores de Temperatura de desnaturação (Tp) das proteínas do soro de leite em variados valores de pH.

Proteína	pH	Temperatura máxima de	Referências *
β-Lg	6.7	72.8	1
	6.4	79.9 ± 0.5	1
	7.4	74.4 ± 0.4	1
	3.0-4.0	82.0	2
	3.0	82	4
	6.0	78	4
	7.5	71	4
α-La	6.7	65.2	1
	4.0-5.0	62.0	2
	6.5	64.9	3
	6.0	63	4
	7.5	62	4
BSA	6.7	62.2	1
	6.7-7.0	64.0	3
	4.0-5.0	74.0	2
	6.0	68-74	4
	7.5	66-68	4
Ig	3.0	53	4
	6.0	78	4
	7.5	77	4
WPC	6.5	88.0	2
	3.0	83	4
	6.0	74	4
	7.5	70	4

* 1- Ruegg et al. (1977); 2- Bernal; Jelen (1985); 3-Relkin (1996); 4- de Wit; Klarenbeek (1984).

De acordo com alguns trabalhos, a adição de hidrocolóides ou sais (Na⁺ ou Ca⁺⁺) pode aumentar a temperatura de desnaturação de algumas proteínas. O aumento da estabilidade térmica de proteínas associadas a carboidratos também foi observado por Baeza; Pilosof (2002), utilizando a técnica de DSC. Este trabalho relatou valores de Tp para a β-Lg pura nos pHs 6 e 7,0, de 79,9 e 76,8 °C, respectivamente. No entanto, ao adicionar o hidrocolóide κ-Carragena, em pH 6,0, houve um aumento de 1,3°C na Tp. Outros autores ao complexarem as proteínas mioglobina e BSA com alginato, pectina e CMC, também obtiveram resultados

satisfatórios em relação ao aumento da estabilidade térmica (IMENSON; LEDWARD; MITCHELL, 1977).

Observa-se na Figura 14 que a temperatura de início de desnaturação térmica (T_0) é máxima na faixa de pH 3,5 - 4,0 para todos os complexos. Ao acidificar ou alcalinizar o meio, a T_0 diminui sendo mais expressiva para a α -La/CMC. Comportamento similar foi obtido para a temperatura máxima de desnaturação (T_p) (Fig. 15).

Menores valores de T_0 e T_p (Fig. 14 e 15) foram obtidos ao abaixar o pH das amostras. Este fato pode ser atribuído à dissociação dos complexos. Complexos coavervados são formados e mantidos, principalmente, por interações do tipo eletrostáticas e em pH maiores que o pK das gomas e menores que o pI das proteínas (TOLSTOGUZOV, 1986, 1991, 1994, 1997, 1998; SCHMITT et al., 1998; DINCKINSON, 2003). Porém, dependendo de algumas variáveis como pH e força iônica, este processo pode ser reversível. Geralmente isso ocorre em pH acima do pI das proteínas. Pode haver adicionalmente interações eletrostáticas entre grupos carboxílicos dos polissacarídeos e subunidades oligoméricas carregadas positivamente das proteínas (TOLSTOGUZOV, 1997). Em valores alcalinos, os dois polímeros estão carregados negativamente, favorecendo a repulsão entre eles (BAEZA; PILOSOF, 2002).

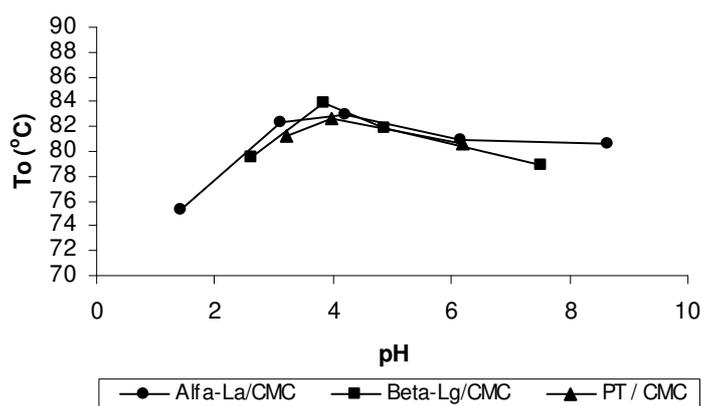


Figura 14- Temperatura inicial de desnaturação (T_0) das três amostras, a 25% de concentração, em diferentes valores de pH.

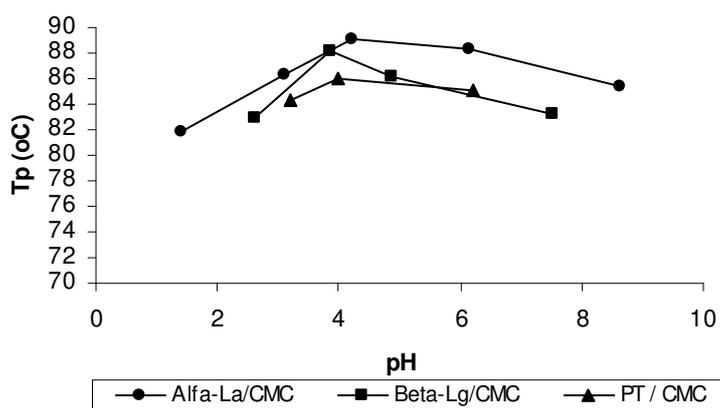


Figura 15 – Temperatura máxima de desnaturação (T_p) das três amostras a 25% de concentração, em diferentes valores de pH.

Estudos do comportamento térmico da β -Lg indicaram que esta proteína apresenta máxima estabilidade térmica em pH igual ou menor que seu pI que é próximo a 5,0 (RELKIN, 1994). O grupo tiol livre desta fração protéica é capaz de reagir e formar novas pontes dissulfeto. Esta reação aumenta quando o pH está próximo ou maior que pH 6,8. O desdobramento de proteínas globulares é acompanhado de um efeito térmico exotérmico, que diminui, desta forma, a T_p (de WIT; KLARENBECK, 1984).

A técnica de DSC relata alterações conformacionais da proteína dentro do complexo (SCHMITT et al., 1998). Comparando de uma maneira geral as três amostras, a tendência da curva mostra que a α -La/CMC foi a que apresentou maiores valores de T_o e T_p dentro da faixa de pH estudados para todas as amostras. Este fato pode estar associado a maior quantidade de CMC presente nesta amostra que provavelmente favorece a estabilidade da proteína (TOLSTOGUZOV, 1997).

Comparando todos resultados de temperatura de desnaturação (T_p) das proteínas coacevadas e em diversas faixas de pH com os dados da Tabela 4, é possível dizer que a presença do polissacarídeo, tanto no complexo unido como no solúvel, promoveu um aumento da estabilidade térmica para todas as

proteínas. Todos os valores indicaram maior T_p quando as proteínas estavam unidas a CMC. De acordo com a Tabela 4, a máxima estabilidade térmica (T_p) da fração α -La foi obtida em pH 6,7, sendo de 65,2 °C. Esta mesma proteína coacervada com o hidrocolóide CMC e em pH 6,5 obteve valores de T_p de 85,4 °C (Figura 14).

Quando se aplica uma quantidade de calor, a proteína se desnatura e o polissacarídeo altera sua conformação, favorecendo, desta maneira, as interações entre outros grupos laterais funcionais dos biopolímeros (SCHMITT et al.; 1998). Por isso, apesar de ser esperado ocorrer uma tendência em diminuir a estabilidade térmica ao variar o pH do meio, principalmente ao acidificá-lo, as temperaturas de desnaturação das proteínas do soro continuam superiores às das proteínas originais, ou seja, 74, 63 e 83°C, para a α -La, β -Lg e BSA, respectivamente (MODLER, 2000).

Valores de entalpia de desnaturação em diferentes valores de pH estão ilustrados na Figura 16. A partir deste gráfico é possível dizer que existe uma relação inversa da T_p e da T_o em relação à entalpia de desnaturação. Ou seja, menores valores de ΔH_T foram obtidos com a α -La/CMC, sendo maior em máximo valor de pH.

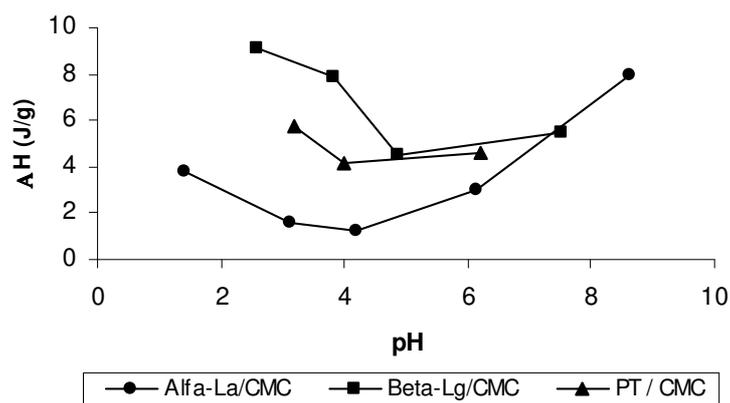


Figura 16- Valores de Entalpia de desnaturação ΔH_T (J/g de proteína), dos três complexos em diferentes faixas de pH.

Resultados de entalpia de desnaturação foram diferentes para amostras de β -Lg complexada com diversos polissacarídeos em pH 6,0 e 7,0. Em pH 6,0 (próximo ao pl), as alterações entálpicas foram maiores para a proteína pura (9.94 J/g) do que quando associada à gomas, com exceção da goma xantana que apresentou pequena redução no ΔH (8.34 J/g) (BAEZA; PILOSOF, 2002). Neste pH ocorre a agregação física da proteína, a qual envolve evento exotérmico e leva a um aumento aparente da entalpia. Provavelmente nesta faixa de pH pode ocorrer incompatibilidade entre a proteína e o polissacarídeo e por isso a agregação da molécula é mais importante que a adição do hidrocolóide (BAEZA; PILOSOF, 2002).

A Figura 17 mostra os valores de entalpia nas amostras em pH 6,5. Observe-se que os resultados mais baixos foram obtidos com a amostra α -La e que todos os valores foram menores que os de WPC. Maiores valores de T_p e menores de ΔH podem indicar uma interação mais forte desta fração protéica com a goma.

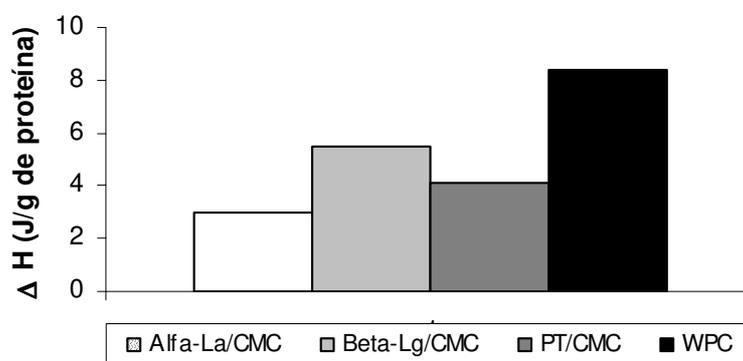


Figura 17- Valores de entalpia de desnaturação (ΔH_T – J/g) dos três complexos e da amostra WPC em pH 6,5.

A complexação de sulfato de dextrana, pectato de sódio e pectina com inibidor de tripsina mostraram que a entalpia de desnaturação da proteína no complexo é sempre menor que a da proteína pura na ausência de hidrocolóides (TOLSTOGUZOV, 1998).

4- CONCLUSÕES

A partir das condições de pH e concentração de CMC utilizados neste trabalho foi possível obter dois complexos coacervados ricos em β -Lg, α -La e um terceiro composto das principais frações protéicas do soro lácteo (PT/CMC), como observado nas análises de eletroforese.

Os complexos sofreram descomplexação à medida que se variou o pH do meio; sendo este resultado maior em pH 2,0; 5,0 e 6,0. Dentre todos os complexos, a maior solubilidade de CMC foi obtida pela α -La/CMC em pH 2,0, e a máxima solubilidade protéica pela β -Lg/CMC em pH 2,0 e 6,0.

Através dos resultados das eletroforeses nativas em gel de poliacrilamida, concluiu-se que os coacervados são insolúveis no pH original do processo de obtenção, e parcialmente descomplexados ou solúveis de acordo com a variação de pH.

A presença de CMC, mesmo quando não complexada à proteína promoveu uma proteção à desnaturação térmica protéica. Maiores valores de temperatura de desnaturação foram obtidos na faixa de pH de obtenção dos complexos, sendo os melhores resultados expressos pela α -La/CMC em todos os pHs testados.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. – Association of Official Analytical Chemists. In: HORWITZ, W. (Ed.), **Official Methods of Analysis**. Washington, 1990. 15TH. ed.

BAEZA, R.I.; PILOSOF, A.M.R.. Calorimetric studies of thermal denaturation of β -Lactoglobulina in the presence of polysaccharides. **Lebensmittel- Wissenschaft und – Technologie**, Oxford, v. 35, p. 393-399, 2002.

BERNAL, V.; JELEN, P. Thermal stability of whey proteins – a calorimetric study. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p. 2847, 1985.

CAYOT, P.; LORIENT, D. Structure-function relationships of whey proteins. In: DAMONDARAM, S.; PARAF, A. **Food Proteins and their Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. Cap. 8, p. 225-256.

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

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 17, p. 25-39, 2003.

FONSECA, L.M., E BRADLEY JR, R. Precipitação de proteínas por meio de coacervação com carboidratos complexos. **Revista do Instituto "Cândido Tostes"**. Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora, v.56, n.321, p.341-348, 2001 (a).

GIRARD, M.; TURGEON, S.L.; PAQUIN, P.. Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n.1, p. 113-119, 2002.

HANSEN, P.M.; HIDALGO, J.; GOULD, I.A. Reclamation of whey protein with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 6, p. 830-834, 1971.

HIDALGO, J.; HANSEN, P.M.T. Interactions between stabilizers and β -lactoglobulin. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 17, n. 5, p. 1089- 1092, 1969.

HIDALGO, J. E HANSEN, M.T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 9, p. 270-1274, 1971.

HODGE, J.E.; HOFREITER, B.T. Determination of reducing sugars end carbohydrates, Analyses - Phenol - H_2SO_4 test. In: WISTLER, R.L.; WOLFMON, M.L. (Eds.), **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press Inc., 1962. Cap. 115, sessão 4, p. 377- 469.

IMENSON, A.P., LEDWARD, D.A. e MITCHELL, J.R.. On the nature of interaccions between some anionic polysaccharides and protein. **Journal of Science Food Agriculture**, Washington, v. 28, p. 669-672, 1977.

KRUIF, C.G.; TURNIER, R. Polysaccharide interactions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, p. 555-563, 2001.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, London, v.227, p. 680-6855, 1970.

LALLI A.; ARUNA, N.; JOHN, R.; THAKRAR, D. Reversible precipitation of proteins on carboxymethyl cellulose. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 777-785, 2000.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Fundamentos básicos de análise térmica. In: LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. (Eds.), **Caracterização de Polímeros, Determinação de Peso molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: c_propes Serviços Editoriais, 2001. Cap. 8, p. 213-285.

MODLER, H.W. Milk Processing. In: NAKAI, S.; MODLER, H.W. (Eds.), **Food Proteins – Processing Applications**, 2000. Canada: Wiley-VCH, Inc., Cap. 1, p.1-88.

MULVIHILL, D.M.; DONAVAN, M. Whey proteins and their thermal denaturation – a review. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v. 11, p. 43-75, 1987.

RELKIN, P. Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and Bovine serum albumin. A thermodynamic approach. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 36, n. 6, p. 565601, 1996.

RUEGG, M.; MOOR, V.; BLANC, B. A calorimetric study of thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. **Journal of Dairy Research**, Barking, v.44, p.500-520, 1977.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESODOBRY-BANON, S. e HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 38, p. 689-753, 1998.

SVASTI, J.; PANIJAN, B. SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 54, n. 9, p. 560-562, 1977.

TOSTOGUZOV, V.B. Functional properties of protein-polysaccharides mixtures, In: Mitchell, J.R. e Ledward, D.A (Eds.), **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p.385-415,

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

TOSTOGUZOV, V.B. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. In: PHILIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A.; WEDLOCK, D.J. (Eds.), **Gums and Stabilizers for the Food Industry 7**. New York: Oxford University Press, 1994. p.115-124,.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. In: DAMONDARAN, S.; PARAF, A. (Eds.), **Food Proteins and their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. Inc. p.171-198.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: HILL, S.E; LEDWARD, D.A.; MITCHELL, J.R. **Functional Properties of Food Macromolecules**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., 1998. Cap. 6, p. 252-277.

WEINBRECK , F.; KRUIF, C.G. Complex coacervation of globular proteins and gum arabic. In: DICKINSON, E.; VLIET, T.V. **Food Colloids, Biopolymers and Materials**. Manchester: The Royal Society of Chemistry, 2003. p. 337-344.

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SOLUBILIDADE, GELEIFICAÇÃO E VISCOSIDADE APARENTE, DOS COMPLEXOS PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE-CARBOXIMETILCELULOSE

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas as propriedades hidrofílicas de solubilidade protéica, geleificação e viscosidade aparente de três complexos coacervados em pH ácido de proteínas do soro de leite com o hidrocolóide carboximetilcelulose (CMC): β -Lactoglobulina/CMC (β -Lg/CMC), α -Lactoalbumina/CMC (α -La/CMC) e proteínas totais do soro de leite/CMC (PT/CMC). A porcentagem de solubilidade protéica foi avaliada em água e em soluções de NaCl (0,1 e 0,5M). Parâmetros de textura e de oscilações dinâmicas (reologia) foram realizados em soluções a 20% de concentração em diferentes valores de pH, para avaliar o desempenho de geleificação das amostras. A viscosidade aparente dos três complexos foi analisada em pH 6,0 nas concentrações de 0,5 e 1 g/mL de amostra, com o objetivo de estudar seu comportamento reológico e correlacioná-lo com outros parâmetros funcionais analisados. Os complexos tiveram a solubilidade aumentada quando solubilizados com NaCl a 0,5M, com exceção da amostra α -La/CMC. Os resultados revelaram que estas amostras se comportam como sólidos viscoelásticos antes do aquecimento e por isso não podem ser caracterizadas como géis, já que os valores de G' encontram-se sempre acima de G'' . Quanto à viscosidade, os resultados mostraram que os sobrenadantes das soluções em pH 6,0 possuem comportamento pseudoplástico e que os complexos α -La e β -Lg/CMC são mais viscosos que a PT/CMC.

Palavras-chave: proteínas do soro, solubilidade, coacervação, geleificação e viscosidade aparente.

EFFECT OF WHEY PROTEIN-CARBOXYMETHYLCELLULOSE INTERACTION ON FUNCTIONAL PROPERTIES: SOLUBILITY, GELLING AND APPARENT VISCOSITY BEHAVIOR.

SUMMARY

It was evaluated the hydrophilic properties of solubility, gelling behavior and apparent viscosity of three complexes: β -lactoglobulin (β -lg/CMC); α -lactoalbumin (α -La/CMC) and total proteins of milk whey (PT/CMC) interaction results of hydrocolloid-protein in acid pH. The percentage of protein solubility was evaluated in water and NaCl (0,1 and 0,5M) solutions. The gelling performance of the samples was evaluated for the texture and dynamic oscillations (rheology) in solutions of 20% of concentration in different values of pH. The apparent viscosity of the three complexes was made in pH 6,0 with concentrations of 0,5 and 1 mg/mL of sample; and to study its rheological behavior it was related to another functional parameter analyzed. The complexes had their solubility increased with NaCl 0,5M soluble except for α -La/CMC sample. The obtained results classified the samples as viscoelastics solids. Before heating they cannot be characterized as gels since G'' values are always above G' . Related to viscosity the results showed that the solutions in pH 6,0 presented pseudoplastic behavior and the complexes section α -La/CMC and β -lg/CMC was more viscous than PT/CMC.

Key-words: whey proteins, solubility, coacervation, gelling behavior, apparent viscosity.

1- INTRODUÇÃO

Em certos tipos de reação de coacervação entre proteínas e polissacarídeos, a solubilidade protéica é reduzida, permitindo desta forma, recuperar seletivamente as proteínas de uma maneira simples, através de ajuste de pH seguido de precipitação por aplicação de força centrífuga (HIDALGO; HANSEN, 1971). A solubilidade deste complexo é afetada por alterações do pH, adição de sais e pela razão entre proteínas e polissacarídeos (SCHMITT et al., 1998).

Tanto proteínas como polissacarídeos contribuem para as propriedades estruturais e de textura de alimentos através de suas propriedades de agregação e geleificação. A morfologia e as propriedades mecânicas de géis obtidos da mistura de proteínas e polissacarídeos, em um sistema termodinamicamente incompatível, vai depender primeiro das características iniciais do sistema líquido (sistema de fase única ou de duas fases) e da capacidade de geleificação dos polímeros individualmente. Dependerá, também, da concentração (chamada crítica) de geleificação do sistema, a qual pode estar acima ou abaixo da capacidade geleificante das gomas (BAEZA et al., 2002)

Numa solução na qual dois biopolímeros capazes de geleificar encontram-se em quantidade acima da concentração crítica e não ocorre a inversão de fases, forma-se um sistema homogêneo de gel misto. Porém, se ocorre a separação de fases, forma-se uma emulsão do tipo água em água o que ocasiona a separação de fases do gel (TOSLTOGUZOV, 1997).

As propriedades de um gel podem ser afetadas pela solubilidade da amostra, e ainda pelo pH, tipo e concentração de sais, açúcares e outros componentes como líquidos e polissacarídeos, sendo a concentração protéica o fator mais importante (PILOSOF, 2000).

A coacervação de proteínas e polissacarídeos pode ser utilizada em processos de geleificação, pelo fato das proteínas garantirem a gelatinização (por aplicação de calor e sob condições específicas como de pH e força iônica) mesmo

que os polissacarídeos não sejam geleificantes. Dependendo do tipo e da intensidade das forças que envolvem a interação das proteínas com o solvente, podem ocorrer fenômenos de agregação, coagulação ou geleificação (PILOSOF, 2000).

A viscoelasticidade destes géis pode ser medida através de um reômetro de tensão controlada, com o qual é possível obter valores de G' , que representa o módulo elástico (“Storage modulus”) ou a energia armazenada elasticamente na sua estrutura, e G'' que representa a perda de energia associada ao módulo viscoso (“Loss modulus”). Os dois resultados descrevem as propriedades dinâmicas viscoelásticas destes géis (PILOSOF, 2000; SCHMITT, 1998).

Já o perfil de textura permite correlacionar medidas de análise sensorial do material geleificado. O ensaio consiste da compressão da amostra duas vezes seguidas imitando o processo de mastigação, avaliando a evolução da força aplicada pelo texturômetro (PILOSOF, 2000).

Medidas de compressão uniaxial dos testes, com os géis em faixas distintas de pHs, permitiram avaliar os parâmetros de dureza e elasticidade das amostras. A dureza é definida como força que se deve aplicar para conseguir uma deformação; e a elasticidade está relacionada com a altura que o material recupera entre o final da primeira compressão e o começo da segunda (PILOSOF, 2000; PUPPO; AÑON, 1998).

A capacidade de solubilização de uma determinada amostra influencia diretamente na viscosidade da solução e conseqüentemente em outras propriedades funcionais tecnológicas, como na capacidade de formar gel. A viscosidade de uma solução de biopolímeros depende primariamente da concentração, da extensão da interação entre estes e o solvente, e da estrutura aerodinâmica dos compostos (tamanho, conformação e flexibilidade da molécula). A dispersão de um complexo de proteínas e polissacarídeos, após uma separação de fases associativa, causa um discreto aumento da viscosidade do sistema. Isto se deve a maior resistência ao fluxo causada pelas partículas dispersas no sistema (SCHMITT et al., 1998).

Neste trabalho fez-se um estudo preliminar da solubilidade para correlacioná-la com as propriedades de formação de gel e viscosidade. Analisaram-se alguns parâmetros de geleificação através de medidas de oscilação dinâmica, dureza e textura. Foram realizadas análises de viscosidade das soluções obtidas com os complexos de proteínas de soro de leite (α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC) com o hidrocolóide carboximetilcelulose (CMC) em pH 6,0.

2-MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Materiais

Foram obtidos três complexos coacervados de proteínas do soro de leite com polissacarídeo. Para tal, utilizou-se o polissacarídeo carboximetilcelulose (CMC) em pH ácido (INDUSKOL – G3000, Denver-Cotia Indústria e Comércio Ltda. -SP), com grau de substituição (DS) de 0,65 - 0,85, de alta viscosidade. O soro de leite proveniente da fabricação do queijo tipo “minas frescal” foi doado por uma indústria da região de Espírito Santo do Pinhal (SP).

Os complexos β -lactoglobulina/CMC (pH 4,0) e α -lactoalbumina/CMC (pH 3,2) foram obtidos após centrifugação segundo a metodologia descrita por Hidalgo; Hansen (1971) com algumas modificações. Já o complexo de proteínas totais/CMC (pH 3,0) foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Hansen; Hidalgo; Gould (1971). Todo processamento foi realizado em escala piloto.

2.2- Métodos

2.2.1- Solubilidade de proteínas em função da força iônica.

Realizaram-se estudos preliminares da porcentagem de solubilidade protéica (%SP) dos três complexos em diferentes valores de força iônica (NaCl 0,0; 0,1 e 0,5M) a 1% de concentração de proteínas, segundo a metodologia descrita por Morr et al. (1985). A solubilidade de proteínas nos sobrenadantes foi determinada por micro-Kjeldahl (AOAC, 1990), e calculada segundo a equação abaixo:

$$\% SP^* = \frac{\text{Concentração de proteína no sobrenadante (mg/ml)} \times \text{vol inicial de solução (mL)} \times 100}{\text{Peso da amostra (mg)} \times \text{Concentração inicial de proteína da amostra (\%)}}{100}$$

Obs: * Solubilidade Protéica

2.2.2- Solubilidade das proteínas e de CMC em função do pH

Com a finalidade de avaliar a influência do pH na estabilidade dos complexos, foram realizadas determinações de porcentagem de proteínas e CMC solúveis (mg/100mL) nos sobrenadantes das amostras após centrifugação. Os complexos em concentrações de 1 mg/ml e nos valores de pH de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0, foram solubilizados a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida centrifugados a 13.000 rpm, por 30 minutos (Centífuga.RC5C da marca Sorvall Instruments – DuPont) para obter somente os carboidratos e proteínas solúveis.

Para determinar a porcentagem (%) de proteína solúvel utilizou-se o método micro-Kjeldahl, e a concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes foi calculada pela diferença da quantidade de proteínas iniciais presentes na solução.

A quantidade de CMC solúvel (mg/100mL) foi determinada segundo o método colorimétrico descrito por Hodge; Hofreiter (1962). Tomou-se 0,5 mL do sobrenadante em diferentes diluições, acrescentou-se 0,5 mL de fenol a 5%, e por último 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos, foram feitas leituras a 480 nm em espectrofotômetro (Spectrophotometer Beckman, Du-70).

2.2.3- Geleificação

2.2.3.1- Preparo dos géis

Foram preparadas soluções a 20% de concentração, lentamente homogeneizadas com uma bagueta de vidro por 30 minutos, em temperatura ambiente. Devido à alta viscosidade das amostras, o valor final do pH foi monitorado por um pHmetro com eletrodo de ponta (Mettler Delta 320).

Uma alíquota de 10 mL da dispersão foi transferida para tubos de ensaio com as paredes internas levemente impregnadas com silicone. Em seguida foram aquecidos em banho seco (Thermolyne – Dri Bath) a 90°C por 45 minutos e resfriados a 4°C por 24 hs.

2.2.3.2- Medidas de oscilações mecânicas (Reometria)

Utilizando as mesmas dispersões a 20% de concentração (para preparação dos géis) nos pHs 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0, realizaram-se testes de medidas de oscilação dinâmica (reometria – Varredura de Frequência). As medidas de oscilação mecânica foram realizadas no equipamento Modular Compact Rheometer (Phaar Physica MCR 300), utilizando os seguintes parâmetros: geometria de ponta - PP 30 mm/segundos, com diâmetro de 29,95 mm, 16 micrometros de concentricidade e 7 micrômetros de paralelidade. Para análises dos reogramas gerados utilizou-se o programa de análises do próprio equipamento (US 200 V2.21). As soluções à temperatura ambiente (25°C) foram colocadas sobre o prato do reômetro, e a temperatura durante as corridas foram controladas através do Sistema Peltier (Viscotherm VT2, Phaar Physica).

A duração das corridas foi de 40 minutos no total, sendo 30 minutos de aquecimento de 25°C a 90°C e 10 minutos para o resfriamento de 90°C a 5°C. A temperatura na qual o módulo elástico e o viscoso (G' e G'') se sobrepõem foi estabelecida como temperatura de formação do gel. A partir dos valores de G' e G'' , calculou-se a tangente de delta (Tang δ), a qual indica o caráter da estrutura geleificada (mais ou menos sólido).

Para estudar o caráter viscoelástico da estrutura antes do aquecimento e depois do aquecimento e resfriamento (90-25°C) utilizou-se a Varredura de Frequência (“Barrido de Frecuencia”).

2.2.3.3- Avaliação e Caracterização estrutural dos géis

Neste estudo utilizou-se o equipamento texturômetro TA-XT2i (Stable Micro Systems) para análise dos perfis de dureza e elasticidade dos géis. Os géis, após

resfriamento (4°C por 24 horas), foram cuidadosamente desmoldados e a partir da região mediana foram retiradas amostras contendo 19 mm de diâmetro e 1 cm de altura para cada tubo. Estas amostras foram colocadas no TA-XT2i e comprimidas utilizando uma ponta de prova cilíndrica de alumínio de 36 mm de diâmetro (P/36R), a 30% de sua altura original, numa velocidade de deformação de 0,5 mm/segundos. A amostra foi submetida a 2 ciclos de compressão, sendo o tempo de espera entre a compressão e a expansão de 5 segundos (BAEZA, 2003).

Utilizou-se o software do equipamento (Texture Expert Exceed) para obter, a partir das curvas de força em função do tempo, os parâmetros de dureza (pico máximo de força aplicada durante a primeira compressão) e elasticidade (relação entre a recuperação da altura da amostra entre o final da primeira compressão e o começo da segunda).

2.2.4- Viscosidade aparente

Os complexos foram solubilizados em água destilada, à temperatura ambiente, nas concentrações de 0,5 e 1,0%. O pH foi ajustado para 6,0 (NaOH 2N ou 0,1N) e mantidas sob agitação por 30 minutos.

As soluções foram centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos para evitar que bolhas de ar e partículas em suspensão interferissem nas leituras. Foram transferidos 3,5 mL de sobrenadante coletadas com pipeta volumétrica para o cilindro de parede dupla de acrílico com raio de 21,96 mm. As corridas foram realizadas no Reômetro de Tensão Controlada (Carri-Med Rheometer - TA Instruments – CSL 2 –500).

A curva de escoamento foi traçada utilizando uma taxa de deformação de 0-100 s⁻¹. Para obter a viscosidade aparente das soluções o intervalo de tensão utilizado foi de 0,15 a 1,5 Pa para as soluções a 0,5% e de 0,15 a 2,5 Pa, para 1,0%.

2.2.4.1- Modelagem e obtenção dos parâmetros

Para ajuste dos pontos experimentais das curvas de escoamento foram realizados cálculos utilizando os modelos com três parâmetros (Herschel – Bulkley) e com dois parâmetros (Lei de Potência – fluido pseudoplástico ou dilatante), utilizando o programa Excel através de regressão não linear.

A classificação do modelo foi realizada a partir dos parâmetros calculados de índice de consistência (K), índice de comportamento do fluido (n) e valores de coeficiente de correlação linear (R^2) e de qui-quadrado (X^2). Maiores valores de R^2 e menores de X^2 indicam melhor ajuste da curva em relação aos modelos calculados. Na Tabela 1 encontram-se os valores utilizados como parâmetros para justificar os modelos calculados.

Tabela 1- Parâmetros utilizados para classificação dos modelos obtidos a partir das curvas de escoamento (Herschel-Bulkley, Newtoniano, Lei de Potência -Fluido Pseudoplástico e Dilatante).

Classificação Do Fluido	Equação Constitutiva	σ_0	K	n	Exemplos Típicos
Herschel – Bulkley	$\sigma = \sigma_0 + k (\dot{\gamma})^n$	> 0	> 0	$0 < n < \infty$	Pasta peixe picado, pasta uva passa.
Newtoniano	$\sigma = k (\dot{\gamma})$	0	> 0	1	Água, leite, mel, suco de fruta clarificado.
Pseudoplástico	$\sigma = k (\dot{\gamma})^n$	0	> 0	$0 < n < 1$	Purê de banana, suco concentrado de laranja.
Dilatante	$\sigma = k (\dot{\gamma})^n$	0	> 0	$1 < n < \infty$	Suspensão 40% de amido de milho.

* Fonte: STEFFE, J.F. (1996).

3- RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1- Solubilidade

Os resultados de solubilidade protéica em função da força iônica revelaram que a solubilidade das amostras foi maior com o aumento da concentração de NaCl na solução (Tabela 2), com exceção da α -La/CMC. A amostra de β -Lg/CMC teve a solubilidade aumentada em aproximadamente 60% em NaCl 0,5M,

enquanto a de PT/CMC aumentou-se em 45%. Já o complexo α -La/CMC apresentou um comportamento diferenciado, ou seja, não apresentou aumento da %SP quando a concentração de NaCl passou de 0 a 0,1 M, sendo esta de 6,37 para 6,6%SP, respectivamente. Porém, este valor foi reduzido ao ser solubilizado em NaCl 0,5M (2,63%SP).

Tabela 2– Porcentagem de Solubilidade Protéica (%SP) dos três complexos em pH original das amostras (NaCl 0 M) e em de NaCl com diferentes concentrações.

Amostras	%SP		
	NaCl 0 M	NaCl 0,1M	NaCl 0,5M
β -Lg/CMC	3.04 \pm 0.05	4.40 \pm 0.25	63.46 \pm 0.9
α -La/CMC	6.37 \pm 0.02	6.57 \pm 0.10	2.63 \pm 0.06
PT/CMC	2.93 \pm 0.02	3.53 \pm 0.006	48.81 \pm 0.36

Tem sido verificado que as globulinas reagem de maneira muito particular com relação à solubilidade frente às variações de força iônica. O complexo α -La/CMC na presença de NaCl 0,5M apresentou um comportamento inverso as demais, o qual pode indicar a baixa disponibilidade da molécula para se ligar a água, apresentando um fenômeno de “salting out”, no qual proteínas e íons salinos competem pela água, levando à maior interação entre proteínas-proteínas reduzindo a solubilidade (PACHECO, 1996). Cabe ressaltar que a α -La apresenta 4 pontes dissulfetos intermoleculares que conferem a proteína uma estrutura bastante compacta .

Em um estudo comparando a solubilidade da β -Lactoglobulina com diferentes tipos de concentrados de soro de leite comercial em pH 4,6, apenas a proteína isolada apresentou 100% de solubilidade (de WIT, 1998). Neste mesmo valor de pH as proteínas totais do concentrado protéico de soro a 25°C apresentaram cerca de 84% de solubilidade protéica (PACHECO; AMAYA-FARFÁN; SGARBIERI, 2002).

Mudanças de pH do meio afetam a conformação da maior parte das proteínas do soro de leite, e isso podem implicar em alterações na solubilidade e outras propriedades funcionais (de WIT; KLARENBECK, 1984).

Durante o processo de coacervação complexa ocorre uma perda da entropia intrínseca devido à depleção dos segmentos aniônicos do polissacarídeo junto às proteínas (SCHMITT et al., 1998). Desta forma ocorre precipitação pela diminuição da solubilidade protéica (HIDALGO; HANSEN, 1971).

Desta maneira, pode-se afirmar que o processo utilizado neste trabalho resultou na obtenção de complexos de baixa solubilidade, que por sua vez foram precipitados por aplicação de força centrífuga. Esta baixa solubilidade das proteínas que compõem as amostras pode ser observada na baixa porcentagem de solubilidade protéica em pH original dos complexos (4,0 - β -Lg/CMC; 3,2 - α -La/CMC e 3,0 - PT/CMC).

Estudos realizados pela técnica de complexação de polissacarídeos aniônicos com leguminosas, na razão de 1:1 (proteína : polissacarídeo), a incorporação de 0,4M de NaCl ocasionou o rompimento do complexo, verificada através de sistemas de sedimentograma e termograma. Esta análise permitiu confirmar a natureza eletrostática do complexo (TOLSTOGUZOV, 1991).

3.2- Solubilidade das proteínas e de CMC em função do pH

De modo geral os resultados mostraram que em pH original de formação dos complexos (4,0 - β -Lg/CMC; 3,2 - α -La/CMC e 3,0 - PT/CMC) as amostras apresentaram menor solubilidades de proteínas e de CMC. No entanto, quando o pH do meio foi alterado para valores na faixa de 2,0 e entre 5,0 e 6,0, ocorreu uma dissociação do complexo e a porcentagem de solubilidade dos biopolímeros foi maior (Figuras 1 e 2).

A amostra PT/CMC apresentou menores valores de solubilidade protéica e de carboidrato, quando comparados os valores com os de β -Lg/CMC e de α -La/CMC.

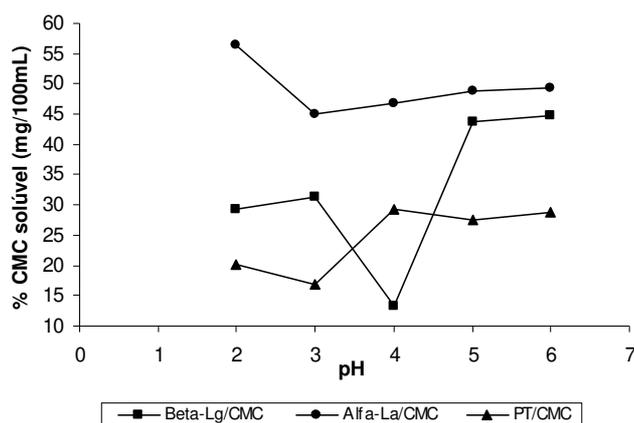


Figura 1- Concentração de proteínas solúvel (mg/mL) em sobrenadantes obtidos a partir de soluções a 1mg/mL de amostra (β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC) variando o pH (2,0-6,0).

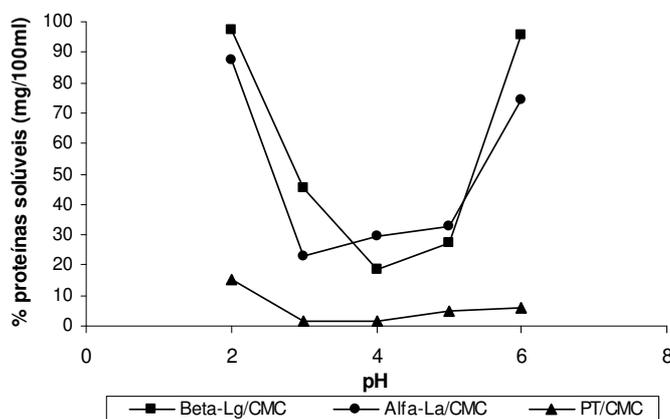


Figura 2- Concentração de CMC solúvel (mg/mL) em sobrenadantes obtidos a partir de soluções a 1mg/mL de amostra (β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC) variando o pH (2,0-6,0).

O complexo α -La/CMC apresentou aproximadamente 45% de solubilidade da CMC em pH original (3,2). Isto indica que parte da goma encontra-se unida e solúvel, formando um sistema em que proteínas e polissacarídeos estão co-solúveis no meio.

As mudanças no pH, na força iônica e/ou na viscosidade podem ser favoráveis nos resultados de outras propriedades funcionais. A reologia de uma dispersão protéica depende do volume hidrodinâmico, do tamanho ou forma, da

concentração das partículas dispersas e ainda da natureza e força de interação que há entre as partículas e a solução (PACHECO; SGARBIERI, 1998).

3.3- Geleificação

Neste estudo foi possível avaliar os resultados de textura e de viscoelasticidade de géis preparados a 20% de concentração como os três precipitados coacervados em diferentes valores de pH.

Optou-se por trabalhar em pH 5,0 - 5,5, pois em estudos preliminares foi observado que a variação de pH (3,0; 4,0; 5,0 e 6,0) não influenciou nos resultados obtidos para a formação de gel, conforme observado com os dados de oscilação mecânica (valores de G' e G''), para todos os complexos analisados.

3.3.1- Medidas de oscilação mecânica dos géis (Reometria)

Através do reograma de varredura de freqüência (Figura 3), observou-se que numa concentração de 20%, e em pH 5,0 a amostra α -La/CMC não desenvolveu uma estrutura de gel. Pode-se observar que nesta condição, a amostra já tem um caráter de sólido viscoelástico antes do aquecimento, uma vez que G' apresentou aproximadamente uma ordem maior que G'' em toda a faixa de freqüência (CLARK, 1991).

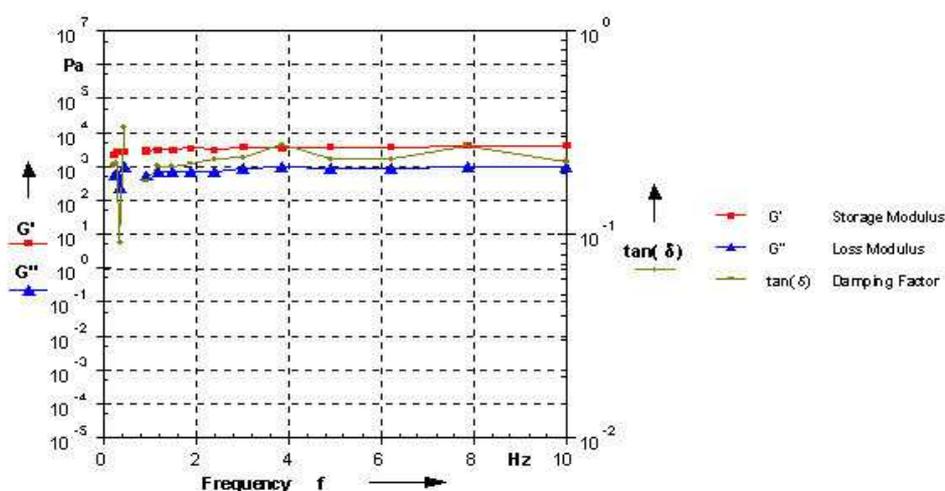


Figura 3- Varredura de freqüência da amostra α -La/CMC em pH 5,0 a 25°C.

Observa-se na Figura 4 que G' apresenta valores superiores a G'' desde o início da corrida, sendo $\tan \delta$, próximo a 0,2. Estes valores levam a concluir que este sistema apresentou inicialmente um caráter viscoelástico. Logo após aquecimento a 90°C e resfriamento até 25°C não se observa uma variação significativa dos módulos e nem da tangente delta. Deste modo, pode-se dizer que a amostra de $\alpha\text{-La/CMC}$, em pH 5,0, não desenvolve uma estrutura de gel durante a aplicação de calor.

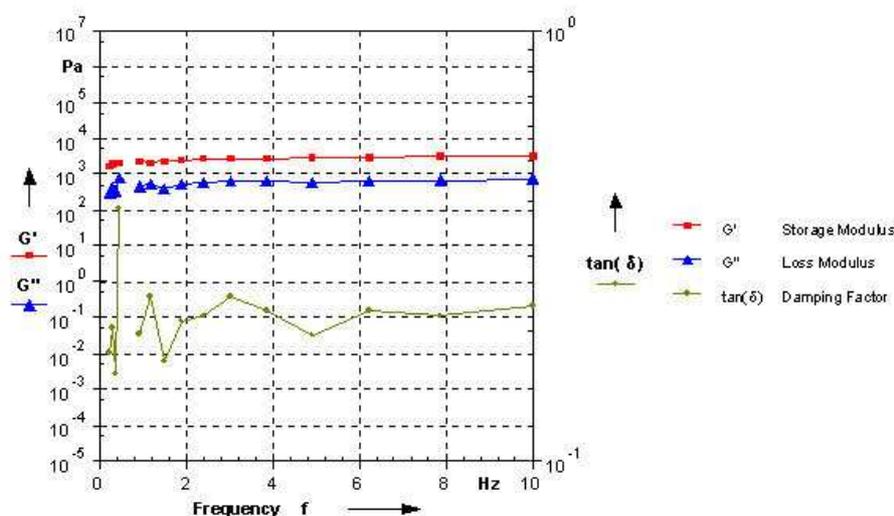


Figura 4- Varredura de frequência da amostra $\alpha\text{-La/CMC}$ em pH 5,0, depois de aquecida a 90°C e resfriada até 25°C .

O comportamento da amostra $\beta\text{-Lg/CMC}$ em pH 5,5 pode ser visualizado nas Figuras 5 e 6. Antes de aquecer (25°C), a varredura de frequência mostra que os valores de G' são aproximadamente iguais aos de G'' , e a $\tan \delta \cong 0,7\text{-}0,8$, o que demonstra que a $\beta\text{-Lg/CMC}$ não é um gel e nem um sólido (Figura 5). Porém, quando aquecida e em seguida resfriada (90°C para 25°C) os valores de G' aumentaram muito e resultaram em valores muito maiores que G'' , de tal forma que $\tan \delta$ têm valor de 0,25, o que indica que se formou um sólido viscoelástico (Figura 6).

Assim, em todos os casos, os valores de G' são maiores que de G'' , o que resulta em valores de $\tan \delta$ de 0,2-0,3. Deste modo, pode-se dizer que o

complexo β -Lg/CMC desenvolveu um caráter de estrutura sólida durante o processo de aquecimento, porém não formou um gel característico ($G' > G''$).

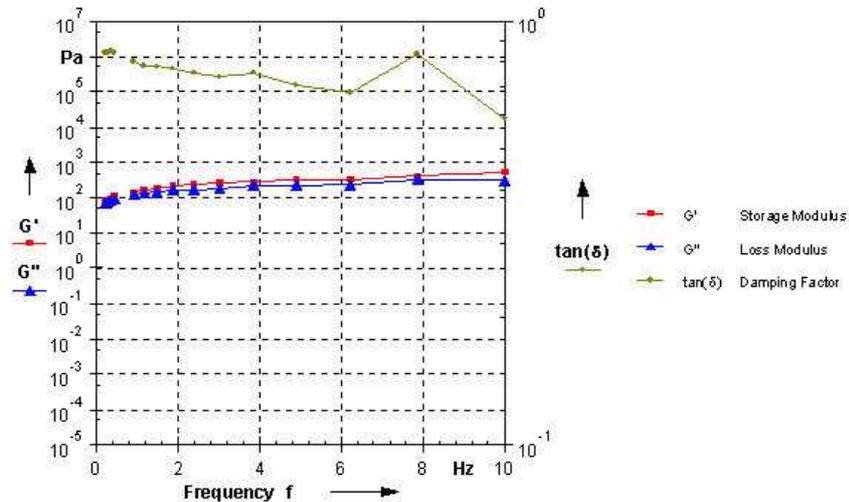


Figura 5- Varredura de freqüência da amostra β -Lg/CMC em pH 5,5, a 25°C.

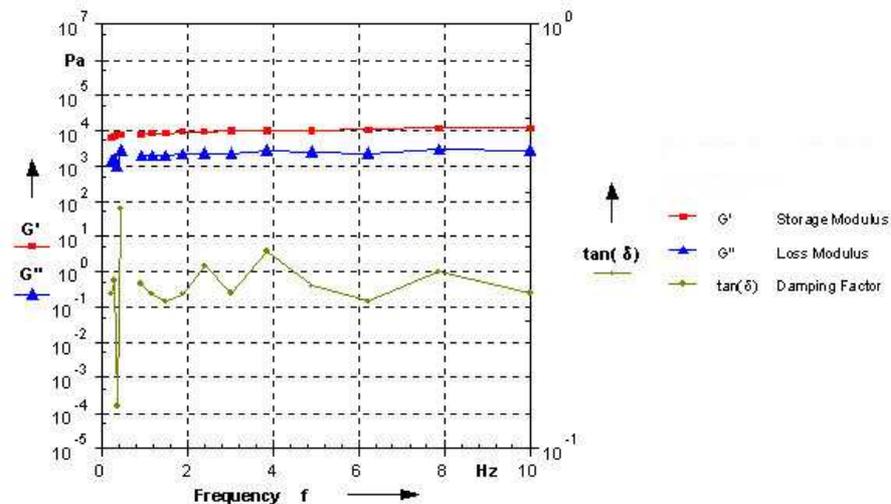


Figura 6- Varredura de freqüência da amostra β -Lg/CMC em pH 5,5, depois de aquecida a 90°C e resfriada até 25°C.

Quando um sistema inicialmente fluido ($G'' > G'$) é submetido ao calor e ocorre um cruzamento dos dois módulos e G' passa a ser maior que G'' , significa que a estrutura de gel foi formada (PILOSOF, 2000). No entanto, através dos diagramas (Figuras 3, 4, 5 e 6) nota-se que os módulos elástico e viscoso não se

cruzam em nenhum momento, e G' apresenta valores maiores que G'' a temperatura ambiente.

O complexo PT/CMC obteve resultados similares aos da α -La/CMC quando analisados os reogramas de varredura de frequência em pH 5,5.

Na Figura 7 observa-se a aparência visual dos sistemas a 20% de concentração em pH 5,0 antes e depois do aquecimento. Observa-se que o complexo de β -Lg/CMC desenvolve uma estrutura sólida com o aquecimento, enquanto a α -La/CMC não se modifica, similarmente à PT/CMC. Em todos os casos foram obtidos sistemas com partículas não homogêneas e visíveis, após o aquecimento e resfriamento.

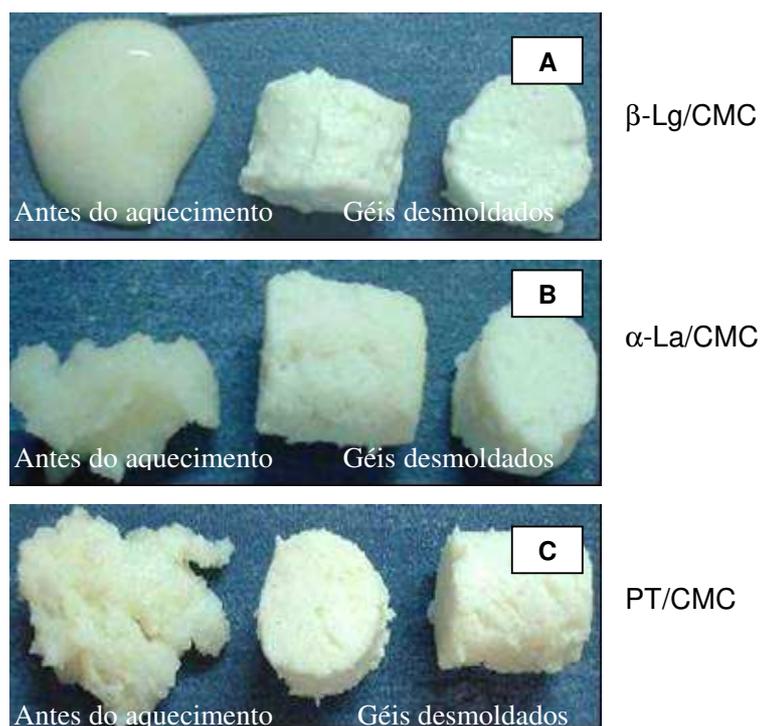


Figura 7- Fotos ilustrativas dos géis formados em pH 5,0 a 20% de concentração com os complexos β -Lg/CMC (A), α -La/CMC (B) e PT/CMC (C), antes e depois do processo de aquecimento (90°C/45 min) e resfriamento ($\pm 4^\circ\text{C}$).

3.3.2- Avaliação e Caracterização estrutural dos géis

A Figura 8 exhibe os resultados de dureza obtidos com os géis dos três complexos em pH de obtenção (4,0 - β -Lg/CMC; 3,2 - α -La/CMC e 3,0 - PT/CMC) e em pH 5,0. Os resultados indicaram que em pH original de obtenção dos coacervados, as amostras de PT/CMC e β -Lg/CMC não formam géis desmoldáveis e por isso os valores de dureza (Figura 8) e elasticidade (Figura 9) são iguais a zero. Entretanto, em pH 5,0 todos formaram um gel desmoldável e com característica de elasticidade.

A amostra α -La/CMC foi a que apresentou, em valores absolutos, maior dureza e a única que em pH original (3,2) formou uma estrutura desmoldável. Isto mostra que este complexo apresentou uma grande capacidade de absorção e retenção de água, resultando em uma aglomeração de partículas de estrutura sólida e caráter elástico

Os valores de elasticidade a pH 5 são similares para todos os complexos (Figura 9). Valores de elasticidade próximos a 1,0 podem indicar que a recuperação da altura original (próximos de 100%) ocorre logo após a compressão.

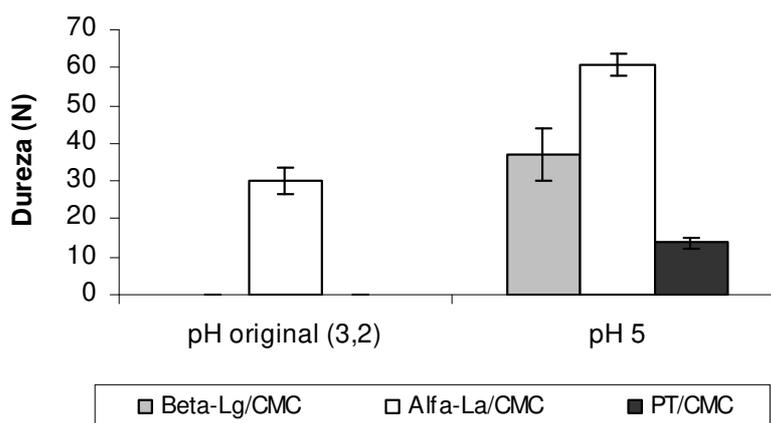


Figura 8- Valores de Dureza (N) dos géis de α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC em função do pH.

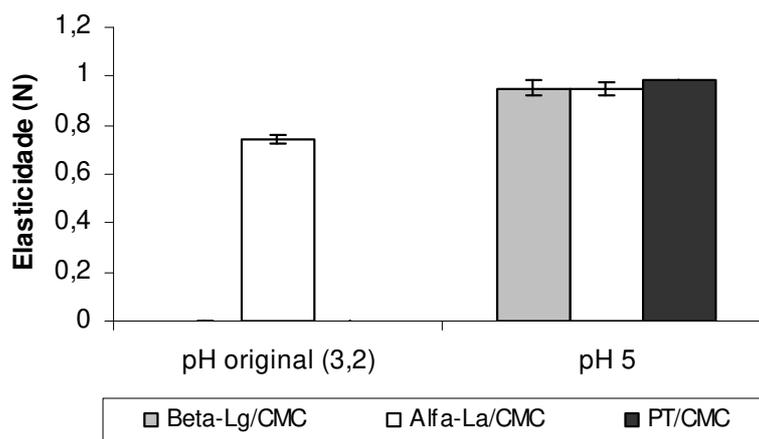


Figura 9- Valores de Elasticidade (N) dos géis de α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC em função do pH.

Estudos realizados com proteínas do soro lácteo demonstraram que estas apresentam elevada capacidade de geleificação, formando géis estáveis após aquecimento entre 70-90°C (MORR; HA, 1993).

Quando as proteínas do soro estão complexadas com polissacarídeos, ocorre uma modificação estrutural em função das zonas de união entre os biopolímeros, modificando tanto suas características hidrofílicas como hidrofóbicas. A formação das zonas de união, provavelmente, bloqueiam segmentos protéicos que participariam da agregação necessária para a formação de rede durante a geleificação. Desta forma, sua capacidade geleificante torna-se reduzida (TOLSTOGUZOV, 1998). Mann; Malick (1996), concluíram que complexos de CMC com concentrado protéico de soro de leite (CPS) produzem géis fracos e frágeis, os quais não puderam ser seccionados e avaliados quanto ao perfil de textura nas condições testadas.

3.4- Viscosidade aparente

3.4.1- Modelagem e obtenção dos parâmetros reológicos

Foram realizados cálculos para modelagem e obtenção dos parâmetros reológicos das amostras em duas concentrações (0,5 e 1,0%) e pH 6,0. Este valor

de pH foi escolhido, pois as soluções preparadas em pH acima de 5,0 apresentaram um comportamento aparentemente mais viscoso e homogêneo que nas demais condições. Em valores de pH de 3,0 a 4,0 a solubilidade dos complexos foi mínima apresentando muitas partículas em suspensão (Figuras 1 e 2).

3.4.1.1- Curvas de escoamento e cálculos dos modelos reológicos

O ajuste das curvas de escoamento (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) está representado nas Figuras 10, 11 e 12, obtidas a 0,5 e 1,0% de concentração e pH 6,0 para todas as amostras.

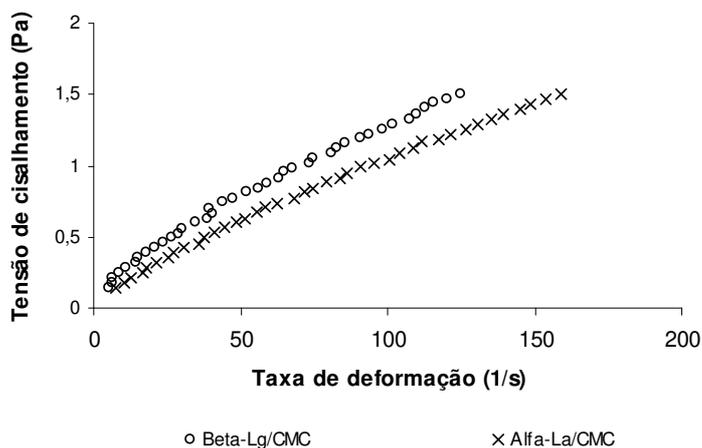


Figura 10- Curva de escoamento (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) das amostras β -Lg/CMC e α -La/CMC a 0,5% e em pH 6,0.

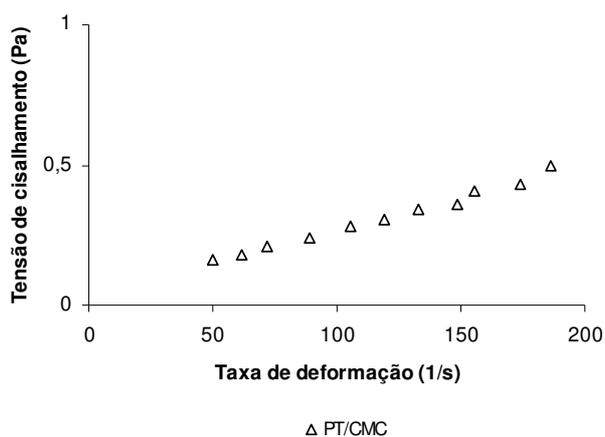


Figura 11- Curva de escoamento (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) da amostra PT/CMC a 0,5% e em pH 6,0.

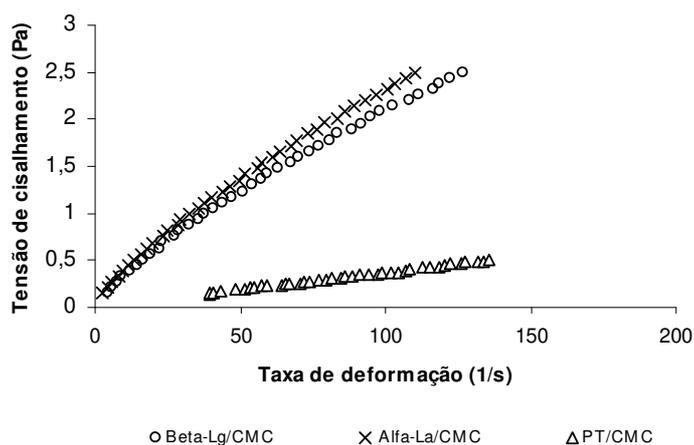


Figura 12- Curva de escoamento (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) das amostras β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC a 1,0% e em pH 6,0.

Nas Tabelas 3, 4 e 5 estão representados os resultados dos ajustes dos parâmetros de controle para os modelos Herschel – Bulkley (HB) e Lei de Potência (LP) das amostras α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC, respectivamente.

Observando os valores de X^2 e R^2 pode-se concluir que o modelo que melhor se ajustou foi o de Lei de potência (LP), para a amostra α -La/CMC (Tabela 3), pois a 0,5 e a 1,0% de concentração foram obtidos os menores valores de X^2 e maiores de coeficiente de regressão linear (R^2). Neste caso, esta amostra pode ser classificada como um fluido pseudoplástico, pois os valores de n estão entre um e zero ($0 < n < 1$).

Tabela 3- Valores obtidos a partir dos cálculos de modelo reológico para a amostra α -La/CMC, a 0,5 e 1,0% de concentração em pH 6,0.

Amostras				
Parâmetros	α -La/CMC 0,5%		α -La/CMC 1,0%	
	LP	HB	LP	HB
σ_0	-	-0.024	-	0.031
K (Pa.s ⁿ)	0.0297	0.034	0.0702	0.1145
n	0.77	0.74	0.76	0.62
X^2	0.002	0.002	0.005	0.743
R^2	0.9997	0.9996	0.9997	0.9972

Em relação à β -Lg/CMC (Tabela 4), apesar de apresentar maior coeficiente de regressão linear (R^2) para o modelo HB, a 1,0% de concentração, observou-se que o valor de tensão inicial é negativo, o que indica um erro no ajuste deste modelo. Para que um fluido ou material plástico seja classificado como Herschel-Burkley é necessário que apresente uma tensão inicial residual (σ_0) (STEFFE, 1996). Desta forma, pode-se dizer que o modelo que melhor se ajusta para esta amostra também é o de Lei de potência, que não possui tensão residual.

Tabela 4- Valores obtidos a partir dos cálculos de modelo reológico para a amostra β -Lg/CMC a 0,5 e 1,0% de concentração em pH 6,0.

Amostras				
Parâmetros	β -Lg/CMC 0,5%		β -Lg/CMC 1,0%	
	LP	HB	LP	HB
σ_0	-	0.018	-	-0.06
K (Pa.s ⁿ)	0.0509	0.0461	0.059	0.0737
n	0.69	0.71	0.77	0.73
X ²	0.0085	0.0082	0.1119	0.0063
R ²	0.9986	0.9985	0.9994	0.9996

Com a PT/CMC o modelo que melhor se ajustou aos dados também foi o de Lei de potência, conforme os resultados da Tabela 5. Através dele foram obtidos maiores valores de R² e menores de X². Apesar dos resultados destes parâmetros serem similares para o modelo HB, observa-se que os valores de tensão residual (σ_0) calculados foram negativos, indicando o não ajuste do modelo para este parâmetro. Portanto, os resultados obtidos mostram que esta solução tem caráter de um fluido pseudoplástico.

Tabela 5- Valores obtidos a partir dos cálculos de modelo reológico para a amostra PT/CMC a 0,5 e 1,0% de concentração em pH 6,0.

Amostras				
Parâmetros	PT/CMC 0,5%		PT/CMC 1,0%	
	LP	HB	LP	HB
σ_0	-	-0.4834	-	-0.025
K (Pa.s ⁿ)	0.0043	0.0693	0.0051	0.0069
n	0.89	0.50	0.94	0.88
X ²	0.010	0.1209	0.0014	0.0011
R ²	0.9983	0.9817	0.9974	0.9973

No geral todas as soluções apresentaram característica de fluido pseudoplástico. Esta afirmação é confirmada a partir dos valores de índice de comportamento do fluido (n), citados na Tabela 2. Neste caso, os valores devem estar entre zero e um ($0 < n < 1$).

3.4.2 – Curvas de viscosidade aparente em função da taxa de deformação

Os gráficos representados pelas Figuras 13 e 14 mostram as curvas comparativas da viscosidade aparente (Pa.s) *versus* taxa de deformação (1/s).

Observa-se que a 0,5% a amostra β -Lg/CMC apresentou valores mais altos de viscosidade, enquanto a PT/CMC é a menos viscosa (Figura 13). Deve-se ressaltar que a amostra de PT/CMC é a que permanece com maior número de agregados insolúveis mesmo após a solubilização por 30 minutos. Estes dados se correlacionam com os resultados de solubilidade protéica e de CMC em diferentes valores de pH. Nas Figuras 1 e 2 observa-se que este complexo (PT/CMC) obteve menores porcentagens de solubilidade de proteínas e de carboidratos comparando com as outras duas amostras.

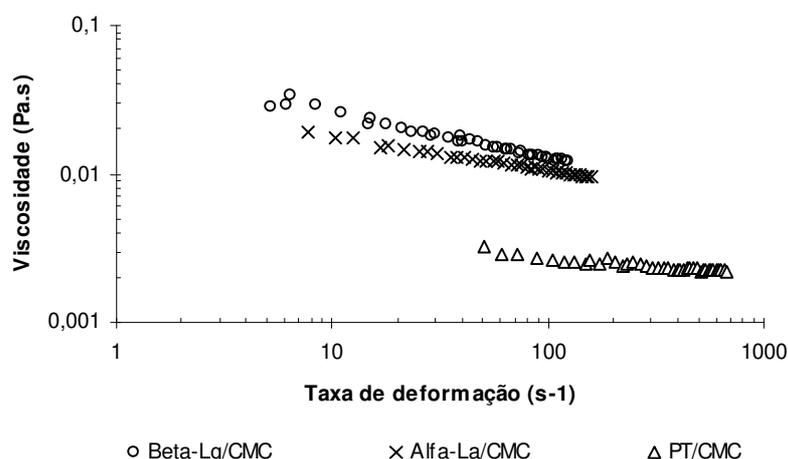


Figura 13- Curvas comparativas da viscosidade aparente x taxa de deformação, das soluções dos três complexos a 0,5% de concentração em pH 6,0.

De modo geral, com todas as soluções de complexos, ao aumentar a taxa de deformação, a viscosidade do sistema diminuiu. Em um estudo observou-se que soluções de concentrados de soja, obtidos por diferentes tipos de processamentos, em três concentrações e em pH 7,0, apresentaram comportamento característico de um fluido pseudoplástico. Nesta situação a taxa de tensão é inversamente proporcional à taxa de deformação (PACHECO; SGARBIERI, 1998), como ocorreu com as amostras testadas neste estudo.

Soluções de CMC apresentam pseudoplasticidade porque sua cadeia tende a se orientar em direção ao fluxo à medida que se aumenta a força ou a tensão aplicadas. Assim a viscosidade ou a resistência ao fluxo é drasticamente reduzida (FEDDERSEN; THORP, 1993).

A Figura 14 mostra os resultados a 1,0% de concentração da solução. Apesar dos valores de α -La/CMC parecerem maiores que da β -Lg/CMC, esta diferença é muito pequena. Neste caso, os valores iniciais de viscosidade aparente da PT/CMC são menores que os valores finais dos precipitados β -Lg/CMC e α -La/CMC.

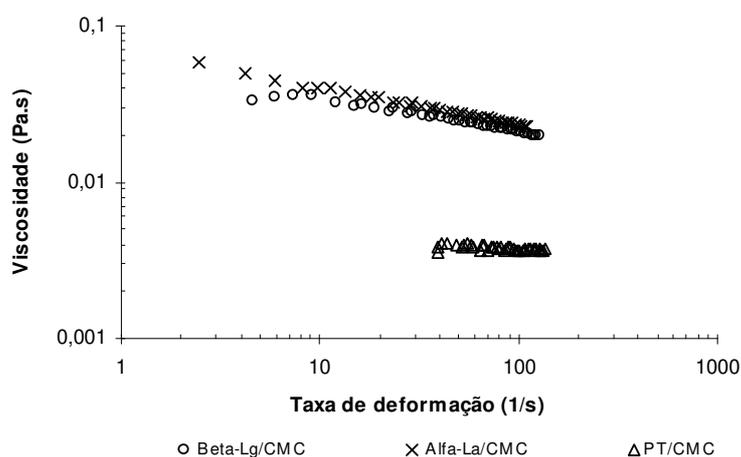


Figura 14- Curvas comparativas da viscosidade aparente x taxa de deformação das soluções dos três complexos a 1,0% de concentração em pH 6,0.

Ao correlacionar a quantidade de proteína e CMC solúvel (Figuras 2 e 3) com as medidas de viscosidade (Figuras 13 e 14) pode-se dizer que as amostras de α -La/CMC e β -Lg/CMC apresentaram maiores valores de viscosidade em concentração de 1,0 e de 0,5%, e resultaram em valores sempre acima dos valores obtidos com a PT/CMC, tanto para a viscosidade como para as concentrações de proteínas e polissacarídeos solúveis.

Ao elevar o valor de pH de obtenção dos complexos para 6,0, observou-se que ocorreu uma maior solubilização da CMC para todas as amostras quando comparados os resultados em pH original de formação dos complexos, sendo o valor mais reduzido da PT/CMC (Figuras 2 e 3). A viscosidade medida nestes sistemas pode ser justificada pelo fato de que uma dispersão polissacáridica em geral é mais viscosa que a de proteínas, por isso a concentração de gomas modifica a textura do meio (SCHIMITT et al., 1998).

Ainda que em pH 2,0, as proteínas e o polissacarídeo possam ser solubilizados (Figuras 2 e 3), nesta condição, a solução de CMC apresenta uma viscosidade reduzida (FEDDERSEN; THORP, 1993). Como verificado anteriormente, ocorre uma descomplexação parcial da CMC nesta condição, e apenas uma fração dos hidrocolóides permanece livre na solução.

Faz-se necessário retomar o conceito de que ao elevar o pH para 6,0 (acima do ponto isoelétrico - pI - das proteínas do soro) o aumento das cargas negativas reduz a atração entre proteínas e hidrocolóides pela inibição da interação dos grupos positivamente carregados das proteínas com as cargas negativas da CMC. Nestas condições pode ocorrer uma descomplexação parcial dos polímeros, facilitando o aumento da viscosidade da solução (DICKINSON, 2003).

4- CONCLUSÕES

A partir das análises de solubilidade protéica pode-se afirmar que a adição de NaCl (0,5M) alterou a estrutura do complexo e promoveu aumento da interação com o solvente, exceto para a α -La/CMC.

A variação do pH (2,0 a 6,0) das soluções de α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC revelou que a quantidade de proteínas e de CMC solúvel no sobrenadante foi menor em valores iguais ou próximos aos de obtenção dos coacervados (3,0; 3,2 e 4,0).

Em relação a geleificação verificou-se que em concentrações de 20% de complexo as amostras não formaram um gel característico, pois os valores da fase sólida (G') foram sempre maiores que de G'' (fase líquida).

Através de medidas em reômetro, observou-se que o comportamento geleificante não foi afetado pela mudança de pH. Nos valores de pH de obtenção dos coacervados a única amostra que formou gel desmoldável foi a α -La/CMC.

As análises de viscosidade aparente indicaram que a amostra PT/CMC apresentou menor viscosidade. Todas as amostras se caracterizaram como um fluido pseudoplástico.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. – Association of Official Analytical Chemists. In: HORWITZ, W. (Ed.), **Official Methods of Analysis**. Washington, 1990. 15TH. ed.

BAEZA, R.; CARP, D.J.; BATHOLOMAI, G.B.; PILOSOF, A.M.R. The application of thermodynamic incompatibility between proteins and polysaccharides to design of food gels. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 2, p. 128- 136, 2002.

BAEZA, R. I. **Interacciones entre β -Lg y polysacháridos en coloides alimentarios**. 2003. Tese doutorado. Universidade de Buenos Aires - Buenos Aires, Argentina, 2003.

CLARK, A.H. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In: DICKINSON, E. (Ed.). **Food Polymers. Gels and Colloids**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991, p. 322-338.

de WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v.81, p.597-608, 1998.

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

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 17, p. 25-39, 2003.

- FEDDERSEN, R.L.; THORP, S.N. Sodium Carboxymethylcellulose. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N., (Eds.). **Industrial Gums**. San Diego: Academic Press, 1993, 3 ed., cap. 20, p.537-578.
- HANSEN, P.M.; HIDALGO, J. E GOULD, I.A. Reclamation of whey protein with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 6, p. 830-834, 1971.
- HIDALGO, J. E HANSEN, M.T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 9, p. 270-1274, 1971.
- HODGE, J.E.; HOFREITER, B.T. Determination of reducing sugars end carbohydrates, Analyses - Phenol – H₂SO₄ test. In: WISTLER, R.L.; WOLFMON, M.L. (Eds.), **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press Inc., 1962. Cap. 115, sessão 4, p. 377- 469.
- MANN, B., MALICK, R.C. Studies on some functional characteristics of whey protein-polysaccharide complex. **Journal of Food Science and Technology**, India, v.33, n.3, p.202-206, 1996.
- MORR, C.V.; GERMA, B.; KINSELLA, J.E.; REGEISNTEIN, J.P.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MENGINO, M.E. A colaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 1715- 1718, 1985.
- MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- PACHECO, M.T.B. **Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados protéicos de levedura (*Saccharomyces sp.*) obtidos por diferentes processos de extração**. 1996. 158p. Tese (doutor em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Hydrophilic and rheological properties of brewer's yeast protein concentrate. **Journal of Food Science**, Champaign, v.63, n.2, p.238-243, 1998.
- PACHECO, M.T.B; AMAYA-FARFÁN, J.; SGARIBIERI, V.C. Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v.26, n.4, p.327-338, 2002.
- PILOSOFF, A.M.R. Geleificação. In: PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. (Eds.). **Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas**. Buenos Aires: Eudeba, 2000. Cap. 4, p. 75- 96.
- PUPPO, M.C.; AÑON, M.C. Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybeans protein gel. **Journal of Agricultural Food Chemistry, Washington**, v.46, p. 3039-3046, 1998.
- SCHIMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews un Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.
- STEFFE, J.F. In: STEFFE, J.F (Ed.). **Rheological Methods in Food Processing Engineering**. East Lansing: Freeman Press, 1996, 428p.
- TOLSTOGUZOV, V.B. Functional Properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 4, n. 6, p. 429-468, 1991.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: HILL, S.E.; LEDWARD, D.A.; MITCHELL, J.R. (Eds). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, 1998. Cap. 6, p. 252- 277.

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

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SUPERFÍCIE: FORMAÇÃO DE ESPUMAS E ESTABILIDADE DE EMULSÕES PREPARADAS COM OS COMPLEXOS β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades de superfície de três complexos obtidos por coacervação com carboximetilcelulose (CMC) em pH ácido: β -Lactoglobulina/CMC (β -Lg/CMC), α -Lactoalbumina/CMC (α -La/CMC) e proteínas totais do soro de leite/CMC (PT/CMC). As propriedades espumantes foram estudadas pela técnica de batimento utilizando um homogeneizador de hélice. Com o objetivo de avaliar a capacidade espumante e a estabilidade da espuma foram analisadas medidas do volume de espuma formado, tempo médio de drenagem e tempo para colapsar 10% do volume total espumado. Para avaliar a influência do pH e da concentração salina na formação de espuma, empregou-se a metodologia de superfície de resposta, com o desenho experimental 2^2 incluindo os pontos centrais e axiais. Já as propriedades emulsificantes, foram analisadas através de medidas de “Backer Scattering”, com a qual se fez uma estimativa do número e distribuição das gotas da emulsão, obtendo assim, valores de constante de cremado, de “Back-Scattering” e porcentagem de coalescência. As variáveis estudadas foram pH (2,0, original de obtenção dos complexos e 6,0) e concentração de amostra (1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL). Os resultados mostraram que a capacidade espumante foi melhor em pH ácido para todas as amostras. Em pH 6,0 houve menor volume de espuma, porém maior estabilidade. Ocorreu uma interação positiva entre as variáveis pH e NaCl para a porcentagem de volume de espuma com as amostras α -La/CMC e β -Lg/CMC. Em relação às emulsões, a coalescência só foi observada em pH original para todas as amostras, sendo mais expressiva para o complexo PT/CMC.

Palavras chave: proteínas do soro, coacervação, espuma, emulsão, carboximetilcelulose.

STUDY OF SURFACE FUNCTIONAL PROPERTIES: FOAM FORMATION AND EMULSION STABILITY WITH THE COMPLEXES β -Lg/CMC, α -La/CMC AND MILK WHEY TOTAL PROTEIN/CMC.

SUMMARY

This study aimed to evaluate the surface properties of three complexes: β -lactoglobulina/CMC (β -Lg/CMC), α -lactoalbumin/CMC (α -La/CMC) and, milk whey total protein (PT/CMC) through coacervation with carboxymethyl-cellulose (CMC) in acid pH. The foaming properties were studied through beating technique with a homogeneous helix. The objective was to evaluate the foam capacity and stability measuring the foam formed volume, draining average time and collapsed time of 10% of the bubbled total volume. It was used methodology of replying with experimental design 2^2 , including central and axial points, to analyze the effects of variables such as pH and saline concentration on the foaming formation. Emulsifiers properties were analyzed through Backer Scattering measures and it was estimated the number and distribution of the emulsion drops; and thus, one could get the values of Back-Scattering and coacervation percentage. The used variables were pH (values of 2.0, original of sample – 4,0 for β -Lg/CMC; 3,2 for α -La/CMC and 3,0 for PT/CMC, and 6.0) and sample concentration (1.0; 2.5 and 5.0 mg/mL). The results presented foam capacity better in acid pH. In pH 6.0 had reduced volume but higher stability time. The presence of NaCl interacts with pH and interferes in a distinct way for each sample with an increased the percentage of bubbled volume. Related to emulsion the stability was higher for 5mg/mL concentrations and in pH 6,0. However, the coalescence itself was observed for all the samples in original pH and, was expressive for PT/CMC complex.

Key words: whey proteins, coacervation, foam, emulsion, carboxymethyl-cellulose

1- INTRODUÇÃO

As proteínas são conhecidas por suas propriedades emulsificantes e espumantes enquanto os polissacarídeos por suas propriedades de absorção de água e agente espessante. Essas propriedades podem ser modificadas tanto pela estrutura química dos biopolímeros como pela sensibilidade às condições extrínsecas do meio (temperatura, estado vítreo) ou da solução (pH, força iônica, presença de outros íons e/ou outras substâncias) (DICKINSON, 2003).

A característica de solubilidade de uma amostra interfere diretamente na sua capacidade de exercer propriedades interfásicas. Em uma mistura de biopolímeros como proteínas e polissacarídeos, esta propriedade hidrofílica pode ser modificada através de variações de força iônica, pH e relação estequiométrica entre os polímeros. Desta maneira, a capacidade de formação de espumas e/ou emulsões também será influenciada (PACHECO, 1996; PILOSOF, 2000).

Em complexos obtidos de proteínas de concentrado protéico de soro de leite (WPC) com carboximetilcelulose (CMC), observou-se que a solubilidade foi melhorada quando o pH foi elevado de 3,5 para pH 7,0, e conseqüentemente houve melhora das propriedades de espuma (MANN; MALICK, 1996). Em estudos realizados com complexos de proteínas de soro de leite e o mesmo hidrocolóide, os valores de capacidade e estabilidade de espuma foram melhorados quando o pH foi elevado para valores acima de 7,5, encontrando uma correlação diretamente proporcional entre a solubilidade e as propriedades espumantes (HANSEN; BLACK, 1972).

A capacidade de formar espumas refere-se à expansão de volume da dispersão com a incorporação de ar, por batimento, aeração ou agitação (SGARBIERI, 1996). Através destas técnicas, forma-se um sistema onde uma fase líquida circunda uma fase dispersa constituído de bolhas de ar. Entre elas existe a lamela surfactante que forma a interface ar-água e previne a coalescência (HALLING, 1981).

Em sistemas aerados tanto as proteínas como os polissacarídeos podem contribuir favoravelmente para sua estabilidade. Geralmente a presença de polissacarídeos promove um aumento da viscosidade do líquido lamelar, enquanto as proteínas contribuem na diminuição da tensão interfacial entre as fases e promovem uma repulsão eletrostática posterior entre as bolhas de ar encapsuladas (DICKINSON, 2003; DICKINSON; IZGI, 1996).

As emulsões se caracterizam pela dispersão entre dois líquidos imiscíveis num mesmo sistema, geralmente formados por lipídeos e água. Quando se estuda a estabilidade de sistemas emulsionados é válido o mesmo princípio dos sistemas aerados, desde que o complexo (proteína-polissacarídeo) esteja solúvel no meio. Contudo, tem sido observado que em algumas condições de pH, força iônica e concentração da amostra a presença do complexo contribui para diminuição da estabilidade da emulsão (SCHMITT et al., 1998).

Um dos métodos utilizados para medir a estabilidade de emulsões é conhecido por “Back-Scattered” (BS). Este método mede a incidência ou a dispersão de luz através da emulsão preparada que é colocada em um tubo de vidro (± 80 mm). A intensidade da luz transmitida ($\lambda = 850$ nm) pelo equipamento (“Quick Scan”) é sensível à fração volumétrica e ao tamanho das gotas numa emulsão. A cada 1 minuto vão sendo registrados os dados de transmissão (T) e da dispersão (BS). Regiões do tubo que tem alta densidade de gotas emulsionadas terão alto valor de BS. Os valores ou a porcentagem de BS resultarão numa estimativa do número de gotas emulsionadas (PAN; TOMÁS; AÑON, 2002).

À medida que a %BS diminui, em função do tempo, significa que ocorreu o processo de cremado e, em alguns casos, a floculação das gotas. A formação do cremado pode ser observada quando o BS só abaixa em uma região do tubo e o perfil de luz se move em uma direção (alto BS). Neste caso, as gotas emulsionadas se concentram na parte superior do tubo. Depois de algum tempo este processo poderá evoluir para a coalescência e desestabilização total da emulsão (PAN; TOMÁS; AÑON, 2002; EUSTON; FINNIGAN; HIRST, 2002; CHANAMAI; MCCLEMENTS, 2000; MENGUAL et al., 1999).

Euston, Finnigan; Hirst (2002), analisaram por medidas de “Back-scattering” a estabilidade de emulsões preparadas com uma mistura de WPC com as gomas xantana, propileno glicol alginato e carragena. O aquecimento levou à separação de fases após 1-2 minutos de leitura, enquanto a não aplicação de calor deixou a emulsão estável por até 30 minutos. As variações de temperatura levam à desestabilização do sistema, pois o complexo eletrostático se torna mais fraco e o polissacarídeo reduz o efeito estabilizador na interface (FEDDERSEN; THORP, 1993).

Segundo Nagasawa; Takashi, Hattori (1996), conjugados de β -Lg com carboximetildextrana (CMD) tiveram melhor habilidade emulsificante do que a proteína sozinha. Quando o pH foi elevado, a capacidade de emulsão melhorou, sendo que, em pH entre 4,0 - 5,0 ela foi praticamente nula por estar próximo ao ponto isoelétrico (pI) da proteína. Outro fator analisado foi a melhor capacidade emulsificante em temperaturas até 80°C. A β -Lg, neste caso, foi adsorvida na superfície das gotas através de suas regiões hidrofóbicas, enquanto a CMD foi orientada na fase aquosa, estabilizando o sistema.

Os experimentos realizados neste estudo tiveram como objetivo analisar o comportamento interfacial dos complexos de proteínas de soro de leite com carboximetilcelulose – CMC (α -La/CMC, β -Lg/CMC e PT/CMC) em relação a variação do pH, concentração de amostra e força iônica (NaCl). Foram avaliadas a capacidade e estabilidade de formação de espumas, sendo a formação de espuma também analisada utilizando a metodologia de superfície de resposta, no qual as variáveis foram pH e concentração de NaCl. No estudo da estabilidade de emulsões os complexos foram avaliados comparativamente, sendo as variáveis pH e concentração de amostra.

2-MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Materiais

Para a obtenção dos complexos coacervados, utilizou-se o polissacarídeo carboximetilcelulose (CMC – FG-3000/INDUSKOL -Denver-Cotia Indústria e

Comércio Ltda. -SP), com grau de substituição (DS) de 0,65-0,85. O soro de leite foi proveniente da fabricação do queijo tipo “minas frescal” de um laticínio situado na região de Espírito Santo do Pinhal (SP).

Foram obtidos três complexos por coacervação das proteínas do soro de leite com o polissacarídeo carboximetilcelulose (CMC). Através do controle do pH e concentração da goma realizou-se uma complexação seletiva com as principais frações protéicas. Numa primeira etapa foram obtidos por precipitação fracionada os complexos β -lactoglobulina/CMC, por ajuste e recuperação por centrifugação em pH 4,0 e o α -lactalbumina/CMC em pH 3,2 (HIDALGO; HANSEN, 1971). A terceira amostra (PT/CMC) foi obtida a partir da complexação da CMC com as proteínas totais do soro de leite por ajuste e recuperação por centrifugação em pH 3,0 (HANSEN; HIDALGO; GOULD, 1971).

2.2- Métodos

2.2.1- Espuma

Para estudo das propriedades espumantes dos complexos β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC utilizou-se a técnica descrita por Elizalde et al. (1991). Foram preparadas soluções em concentrações de 1,0% de amostra e para ajuste do pH as soluções foram mantidas sob agitação com magneto por 30 minutos, usando HCl 2,0 ou 0,1N e/ou NaOH 2,0 ou 0,1N. Em seguida, 30mL de solução foram transferidos para uma proveta de 150 mL e agitada por 3 minutos a 250 rpm em um homogeneizador de hélice. O valor máximo de volume de espuma formado foi imediatamente anotado e o volume de líquido drenado, assim como o volume de espuma colapsado foi registrado em função do tempo.

2.2.1.1- Planejamento experimental e análise estatística

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para estudar as interações entre as variáveis pH e NaCl na porcentagem de espuma formada, seguindo a metodologia descrita anteriormente (ELIZALDE et al., 1991). Os

complexos foram solubilizados em NaCl (0 a 1,0M) e em seguida feito o ajuste de pH (variando de 2,0 a 6,0).

Foi utilizado o planejamento fatorial completo 2^2 , mais os pontos centrais (nível 0) e pontos axiais (níveis $\pm \alpha$). Desta forma, cada fator foi estudado em 5 níveis (Tabela 1), para avaliar o nível de significância das variáveis envolvidas (pH e força iônica - NaCl) e a forma como atuam sobre a resposta de interesse (porcentagem de formação de espuma). Esta metodologia foi descrita por Box et al. (1978).

A análise de variância foi aplicada para examinar a significância estatística do modelo ($p \leq 0,05$), ou seja, as análises de efeito foram feitas pelo erro padrão e as variáveis foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança. Para tal utilizou-se o software *Statística 98*, versão 5.0, para a obtenção das curvas de nível.

Tabela 1 - Níveis codificados e reais das duas variáveis utilizadas no planejamento.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
pH (X_1)	2,0	2,61	4,0	5,38	6,0
Concentração de NaCl (X_2)	0	0,15	0,5	0,84	1,0

2.3- Emulsão

2.3.1- Preparo das Emulsões

As dispersões com os complexos de β -Lg/CMC (pH 4,0), α -La/CMC (pH 3,2) e PT/CMC (pH 3,0) foram preparadas em água destilada, nas concentrações finais de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL. Antes de completar o volume, as soluções permaneceram sob agitação por 30 minutos, sendo o pH ajustado dos valores originais de obtenção dos complexos para os valores 2,0 e 6,0, com soluções de NaOH 2N e/ou HCl 0,1N. Em seguida, foram transferidos 150 mL de solução para um béquer de 250 mL e adicionou-se 50 mL de óleo de girassol refinado – densidade (ϕ) 0,25. A mistura foi emulsionada utilizando o equipamento Ultra-

Turrax T25 (IKA Labortechnik), por 3 minutos a uma velocidade constante de 20.000 rpm, com o dispositivo grande. Todas as análises foram feitas em duplicata.

2.3.2- Análise das emulsões utilizando fotos em microscópio óptico

Para todas as emulsões preparadas foi retirada uma alíquota de 4 μL e colocada diretamente em uma lâmina coberta com uma lamínula de (22 x 22 mm). Foi utilizado um microscópio de contraste de fase (Leica 100) acoplado a uma câmera fotográfica digital. Para realização das fotos utilizou-se um aumento 20X a fim de avaliar a estrutura macroscópica das emulsões e a presença ou ausência de agregados insolúveis.

Nenhum tipo de tampão foi utilizado, com a finalidade de observar de maneira qualitativa a formação de flóculos na estrutura das emulsões.

2.3.3- Estabilidade das emulsões

Uma fração de aproximadamente 80 mL da emulsão preparada foi transferida para um tubo de vidro com tampa. Este foi acoplado ao equipamento QuickK Scan (Beckman Coulter), que utiliza medidas de dispersão de luz ($\lambda = 850$ nm) para caracterizar a emulsão quanto à estabilidade relativa. O intervalo de tempo para tomada das medidas foi de 60 minutos, sendo feita em média uma leitura por minuto. Para calcular a porcentagem de coalescência (%C) as emulsões foram mantidas nos tubos por 24 horas, quando se realizou uma nova leitura de 60 segundos (BS de 24 horas).

2.3.4- Medidas da estabilidade das emulsões

2.3.4.1- “Back Scattering” inicial (BS₀)

Para esta medida elege-se uma zona do tubo escaneada na qual foi obtida uma curva mais homogênea. Esta zona pode estar entre 0 a 80 mm da altura do tubo, mas em geral, é escolhida a altura entre 10 a 25 mm. A densidade elevada das gotas emulsionadas vai resultar em valores de BS elevados. Por outro lado,

nas regiões onde o BS é reduzido significa que houve maior transmissão de luz. O valor médio de BS dentro da zona eleita do tubo, no tempo inicial logo após a formação da emulsão, é chamado de “Back Scattering” zero ou inicial (BS₀).

2.3.4.2- Constante de Cremado (K)

Para cálculo da Constante de Cremado (K), tomou-se valores de BS₀ entre 20-25 mm de altura do tubo, e calculou-se o tempo médio ($T_{1/2}$) para formar a fase “Cremado” aplicando-se a seguinte equação:

$$K = (1/BS_0 \times T_{1/2}) \times 10^3$$

$$K = [min^{-1}]$$

O valor de K correlaciona o tempo em que a emulsão demorou em formar a fase de cremado. Quanto maior os valores de K, mais rápido é a formação do cremado (PAN; TOMÁS; AÑON, 2002).

2.3.4.3- Porcentagem de coalescência (%C)

Uma vez que se forma o cremado, favorecido pelos fenômenos de floculação e diferença de densidade, ele pode se estabilizar ou não. Quando se desestabiliza, ocorre o que chamamos de Coalescência. Neste caso ocorre uma queda no valor de BS.

A porcentagem de Coalescência é calculada a partir de valores de BS máximo dentro da zona eleita (10 a 25 mm de altura do tubo) e de BS lido depois de 24 horas (PAN; TOMÁS; AÑON, 2002).

$$C (\%) = (BS \text{ máx} - BS \text{ 24 h} / BS \text{ máx}) \times 100$$

2.4- Análise dos resultados

Todos os parâmetros de estabilidade das emulsões tiveram seus resultados expressos através da média das corridas realizadas em duplicata no equipamento “Quick-Scan”.

3- RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1- Propriedades Espumantes

Observa-se na Tabela 2 que os valores de volume de espuma foram maiores no pH 2,0, principalmente para a amostra de α -La/CMC. A não formação de espuma no pH original de obtenção dos complexos provavelmente está associada à baixa solubilidade das proteínas, constada pela determinação da porcentagem de proteína solúvel (%SP) no pH original. Estes resultados foram de aproximadamente 3,0, 6,3 e 3,0% de solubilidade para as amostras de β -Lg/CMC, α -La/CMC e PT/CMC, respectivamente

Apesar ter ocorrido maior aumento do volume espumado para a α -La/CMC em pH 2,0, a estabilidade desta espuma foi menor quando comparada com os complexos β -Lg/CMC e PT/CMC, nas mesmas condições. Observou-se em estudos anteriores que neste pH a porcentagem de CMC solúvel foi de aproximadamente 60% para a α -La/CMC. Sabe-se que a presença de hidrocolóides solúveis na interface melhora a estabilidade do sistema, contudo, a CMC em pH abaixo de 4,0 apresenta viscosidade reduzida, o que conseqüentemente pode ocasionar a diminuição da estabilidade (FEDDERSEN; THORP, 1993). Esta hipótese nos leva a acreditar que ocorreu fenômeno similar com a amostra α -La/CMC em pH 2,0, pois, apesar da CMC se encontrar solúvel e parcialmente descomplexada da proteína neste pH, a estabilidade da espuma formada foi reduzida (Tabela 2). Sendo assim, é possível afirmar que o hidrocolóide não apresentou viscosidade suficiente para garantir a estabilidade do líquido lamelar entre as interfaces.

Os melhores resultados de formação de espuma foram obtidos em valores de pH afastados daquele de obtenção dos complexos, sendo que não houve formação de espuma nos valores próximos ao de coacervação e precipitação. Provavelmente, nesta condição as proteínas insolúveis não puderam se difundir no meio e alinhar-se à interfase ar/ água para exercer função tensoativa.

Tabela 2- Valores de capacidade espumante e estabilidade da espuma ($T_{1/2}$ drenagem e $T_{1/2}$ de colapso) das amostras a 1% de concentração, em pH 2,0; pH original de obtenção dos complexos e pH 6,0.

Amostras	pH	% de aumento do volume	$T_{1/2}^{**}$ drenagem (min)	$T_{1/2}^{**}$ colapso (10% - min)
α -La/CMC	2 \pm 0,1	193,3	3,5	11,2
α -La/CMC	3 \pm 0,2	*	*	*
α -La/CMC	6 \pm 0,1	73,3	15,5	34,0
β -Lg/CMC	2 \pm 0,1	26,6	0,16	*
β -Lg/CMC	4 \pm 0,2	*	*	*
β -Lg/CMC	6 \pm 0,1	13,3	>60,0	>60,0
PT/CMC	2 \pm 0,1	53,3	0,34	0,65
PT/CMC	3 \pm 0,3	*	*	*
PT/CMC	6 \pm 0,3	6,6	3,98	>60,0

* não formou um volume expressivo de espuma; ** $T_{1/2}$ = tempo médio.

Em pH afastado do pH original (pH 2,0 e 6,0), os complexos se apresentaram parcialmente dissociados e solúveis. No pH 6,0 essa dissociação permitiu que a CMC descomplexada (aproximadamente 50%) atribua uma certa viscosidade ao sistema e eleve consideravelmente os resultados da estabilidade, principalmente em relação ao tempo de colapso. Esta condição (pH 6,0) não apresentou nenhuma correlação com a capacidade de formação de espuma para as amostras β -Lg/CMC e PT/CMC, pois o volume espumado destas amostras foi limitado neste valor de pH. Com exceção da α -La/CMC que nesta condição de pH teve um bom desempenho tanto no volume de espuma formado quanto na estabilidade (tempo médio de colapso e tempo médio de drenagem).

A amostra mais estável ao tempo médio de drenagem foi a β -Lg/CMC em pH 6,0, sendo este tempo maior que 60 minutos (Tabela 2). Neste caso a interface do sistema apresentou um aspecto bem viscoso e turbido, indicando a presença da CMC no líquido interlamelar. Apesar de não haver grande formação de espuma (13%), a presença de CMC no líquido interlamelar contribuiu na sua estabilidade.

Resultados anteriores demonstraram que nos valores de pH 5,0 e 6,0 houve uma maior solubilidade de CMC (45%) para a amostra em questão, o que explica sua presença na interface da espuma.

A estabilidade destes sistemas pode ser explicada pelo fato dos polissacarídeos, quando solúveis, funcionarem como agente espessante do meio aquoso num sistema complexo (SCHMITT et al., 1998).

3.1.1- Planejamento experimental e análise estatística

Para analisar os resultados obtidos para a formação de espuma utilizando o desenho experimental fatorial (2^2) foram escolhidas as variáveis de maior influência na solubilidade, ou seja, pH e concentração de sal (NaCl). Os valores mostraram que de maneira individual, ou em conjunto, os parâmetros influenciaram na resposta de porcentagem de volume de espuma formada ($p < 0,05$), demonstrados através das análises de variância - ANOVA. Os níveis decodificados para cada ensaio, e os resultados obtidos para formação de espuma encontram-se na Tabela 3.

A partir dos resultados da Tabela 3, observa-se que o maior volume de espuma formado foi obtido pela amostra α -La/CMC (133,3%) em pH 2,61 e concentração de NaCl 0,15M. Este mesmo complexo, também obteve maior formação de espuma (193,3%) em pH $2,0 \pm 0,1$ (Tabela 2). Esta resposta positiva pode ser explicada pela alta solubilidade da CMC em pH ácido (56,52%), comprovados em análises preliminares. Nesta mesma condição de pH e força iônica, o complexo β -Lg/CMC apresentou 13,3% de espuma formada e o PT/CMC, 23,3%.

Tabela 3 – Matriz decodificada e resultados de volume de espuma formado

Ensaio	Níveis decodificados		Volume de espuma formada (%)		
	pH (X ₁)	NaCl (X ₂)	α -La/CMC	β -Lg/CMC	PT/CMC
1	2.61	0.15	133.3	13.3	23.3
2	5.38	0.15	23.3	16.6	16.6
3	2.61	0.84	70.0	40.0	33.3
4	5.38	0.84	23.3	20.0	20.0
5	4.0	0.5	66.6	36.6	40.0
6	4.0	0.5	60.0	36.6	33.3
7	4.0	0.5	73.3	33.3	40.0
8	2.0	0.5	170	36.6	20.0
9	6.0	0.5	26.6	20.0	20.0
10	4.0	0.0	10.0	6.66	3.3
11	4.0	1.0	60.0	56.6	33.3

Menor porcentagem de espuma foi obtido em pH 4,0 e ausência de NaCl (0,0M) para o complexo PT/CMC (3,33%), seguido do β -Lg/CMC (6,66%) e por fim, α -La/CMC (10,0%). Diante dos resultados obtidos pode-se levantar a hipótese de que a variável NaCl está exercendo grande influência na formação de espuma, pois, neste mesmo pH e utilizando NaCl 0,5M (pontos centrais – 0), os volumes de espuma formada foram em média de 66,6% para a α -La/CMC, 35,4% para a β -Lg/CMC e 37,7% para a PT/CMC.

Deve-se considerar que quando se alteram os parâmetros ótimos de pH e concentração de sal, utilizados durante o processo de complexação, ocorre uma modificação da ação eletrostática do polissacarídeo e, conseqüentemente, uma dissociação do complexo. Estas condições provavelmente refletem no desempenho funcional do sistema (TOSLTOGUZOV, 1986), modificando, neste caso, as propriedades espumantes dos distintos complexos de proteínas do soro com CMC.

Os resultados da análise estatística aplicada aos dados experimentais de formação de espuma dos três complexos encontram-se nas Tabela 4, 5 e 6. Os efeitos dos fatores lineares (L), quadráticos (Q) e da interação que estão em negrito são significativos ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

O efeito estimado indica o quanto cada fator influi nas respostas estudadas. Quanto maior é o seu valor, maior é a sua influência, e um efeito positivo indica que ao passar de um valor mínimo a um valor máximo da variável a resposta aumenta. Já um efeito negativo indica o contrário, ou seja, ao passar de um valor mínimo para o valor máximo, a resposta diminui.

Em relação à formação de espuma para o complexo α -La/CMC (Tabela 4), observou-se que o único parâmetro que não foi significativo ao nível de 95% de confiança foi o NaCl (L), não interferindo no volume formado. Verificou-se que os efeitos dos parâmetros pH (Q) e a interação pH*NaCl possuem efeitos positivos na formação de espuma. Já os parâmetros pH (L) e NaCl (Q), são significativos a 95% de confiança, porém apresentam efeitos negativos, indicando menor formação de espuma.

Tabela 4 - Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para formação de espuma para o complexo α -La/CMC

Fatores	Efeito estimado	Erro padrão	Significância estatística (p)
pH (L)	-89.8805*	4.7026*	0.0027*
pH (Q)	29.5872*	5.5980*	0.0339*
NaCl (L)	1.8502	4.7026	0.7319
NaCl(Q)	-33.7319*	5.5980*	0.0264*
pH * NaCl	31.6500*	6.6500*	0.0411*

Obs: * Valores apresentam-se significativos a $p \leq 0,05$

(L): termo linear

(Q): termo quadrático

Na resposta de formação de espuma (Tabela 5), para o complexo β -Lg/CMC, observou-se que todos os parâmetros foram significativos a 95% de confiança. Pode-se verificar que os efeitos dos parâmetros pH (L), pH (Q), NaCl (L) e interação pH*NaCl são significativos ao nível de 95% de confiança, mas

apresentaram efeitos negativos. Já a força iônica (NaCl (L)) foi positivo na formação de espuma.

Tabela 5 - Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para formação de espuma para o complexo β -Lg/CMC

Fatores	Efeito estimado	Erro padrão	Significância estatística (p)
pH (L)	-9.9696*	1.3473*	0.0177*
pH (Q)	-10.9865*	1.6038*	0.0206*
NaCl (L)	25.2576*	1.3473*	0.0028*
NaCl(Q)	-7.6555*	1.6038*	0.0411*
pH * NaCl	-11.8000*	1.9052*	0.0250*

Obs: * Valores apresentam-se significativos a $p \leq 0,05$

(L): termo linear

(Q): termo quadrático

Na Tabela 6, observam-se os valores da análise estatística na resposta de formação de espuma para o complexo PT/CMC. Pode-se dizer que os parâmetros pH (L) e a interação pH*NaCl não foram significativos ao nível de 95% de confiança. O NaCl (L) apresentou efeito significativo positivo, indicando maior volume espumado, enquanto pH (Q) e NaCl (Q) foram significativos a 95% de confiança, porém negativos.

Tabela 6 - Efeito estimado, erro padrão e grau de significância estatística (p) para cada fator no modelo codificado para formação de espuma para o complexo PT/CMC

Fatores	Efeito estimado	Erro padrão	Significância estatística (p)
pH (L)	-5.0007	2.7354	0.2090
pH (Q)	-15.6928*	3.2562*	0.0404*
NaCl (L)	13.9571*	2.7354*	0.0363*
NaCl (Q)	-17.3933*	3.2562*	0.0333*
pH * NaCl	-3.3000	3.8682	0.4834

Obs: * Valores apresentam-se significativos a $p \leq 0,05$

(L): termo linear

(Q): termo quadrático

Após a eliminação dos fatores não significativos, verificou-se através da análise de variância (ANOVA) a significância da regressão ao nível de 95% de

confiança ($p \leq 0,05$), utilizando o teste F, para o planejamento estudado conforme as Tabelas 7, 8 e 9. As equações simplificadas que explicam cada modelo obtido dentro da faixa estudada encontram-se descritas abaixo das respectivas Tabelas.

Para o complexo α -La/CMC o modelo (Tabela 7), apresentou regressão significativa ao nível de confiança de 95% (F calculado superior ao F tabelado). O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,89, indicando que o mesmo explicou 89% de variação dos dados observados com o modelo linear obtido através da regressão, para os resultados com a α -La/CMC.

Tabela 7 - Análise de variância do modelo ajustado para formação de espuma utilizando o complexo α -La/CMC

	SQ	MQ	GL	F calculado	F tabelado**
Regressão	21172,53*	5293,13*	4	12,02**	4,53**
Resíduo	2640,97	440,16	6	14,43	19,25
Falta de ajuste	255,52	638,13	4		
Erro puro	88,45	44,25	2		
Total	23813,5		10		

Obs: *Valores apresentam-se significativos a $p \leq 0,05$

** Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ \Rightarrow Soma quadrática;

MQ \Rightarrow Média quadrática;

GL \Rightarrow Grau de liberdade

Abaixo, encontra-se descrita a equação que explica o modelo para formação de espuma da amostra α -La/CMC:

$$Y = 66,63 - (4,94 P) + (14,80 P^2) - (16,87 N^2) + (15,83 P.N)$$

*onde $P = pH$ e $N = NaCl$

O modelo ajustado para formação de espuma com o complexo β -Lg/CMC (Tabela 8) foi considerado preditivo, pois apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança (F calculado superior ao F tabelado). O coeficiente de

correlação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,84, indicando que o mesmo explicou 84% da variação dos dados observados.

Tabela 8 - Análise de variância de modelo ajustado para formação de espuma do complexo β -Lg/CMC

	SQ	MQ	GL	F calculado	F tabelado**
Regressão	1814,28*	362,856*	5	5,5**	5,05**
Resíduo	330,24*	66,048*	5	29,65**	9,01**
Falta de ajuste	322,98*	107,66*	3		
Erro puro	7,26	3,63	2		
Total	2144,52		10		

Obs: *Valores apresentam-se significativos a $p \leq 0,05$

** Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ \Rightarrow Soma quadrática;

MQ \Rightarrow Média quadrática;

GL \Rightarrow Grau de liberdade.

A seguir encontra-se descrita a equação que explica o modelo representado pela amostra β -Lg/CMC:

$$Y = 35,5 - (4,98 P) - (5,5 P^2) + (12,63 N) - (3,83 N^2) - (5,91 P.N)$$

*onde $P = pH$ e $N = NaCl$

Para verificar a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de 95% de confiança com a amostra PT/CMC realizou-se uma análise de variância (ANOVA) conforme dados da Tabela 9. O modelo ajustado para a formação de espuma com o complexo PT/CMC foi considerado preditivo por apresentar regressão significativa (F calculado superior ao F tabelado). O modelo descrito apresentou valor de coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,78, indicando que o modelo explicou 78% de confiança para os dados obtidos com esta amostra.

Tabela 9 - Análise de variância de modelo ajustado para formação de espuma do complexo PT/CMC

	SQ	MQ	GL	F calculado	F tabelado**
Regressão	989,35*	329,78*	3	8,22**	4,35**
Resíduo	280,7	40,10	7	3,35	19,3
Falta de	2350,76	50,15	5		
Erro puro	29,92	14,96	2		
Total	1270,04		10		

Obs: *Valores apresentam-se significativos a $p \leq 0,05$

** Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$

SQ \Rightarrow Soma quadrática;

MQ \Rightarrow Média quadrática;

GL \Rightarrow Grau de liberdade.

A equação que explica o modelo obtido com a amostra PT/CMC encontra-se descrita abaixo:

$$Y = 37,7 - (7,85 P^2) + (6,98 N) - (8,7 N^2)$$

*onde $P = pH$ e $N = NaCl$

As superfícies de resposta e as curvas de níveis geradas pelos modelos propostos encontram-se nas Figuras 1, 2 e 3. Essas superfícies confirmam a análise dos efeitos realizada anteriormente e permitem a visualização da variação da resposta de formação de espuma para cada parâmetro estudado.

Para o complexo α -La/CMC (Figura 1), a superfície da resposta “porcentagem de volume de espuma formado”, mostrou que este resultado foi maior quando os valores de pH são mais baixos, bem como a concentração de NaCl. Por outro lado, valores de pH próximos a neutralidade associados a altas concentrações de NaCl, reduzem a capacidade espumante deste complexo.

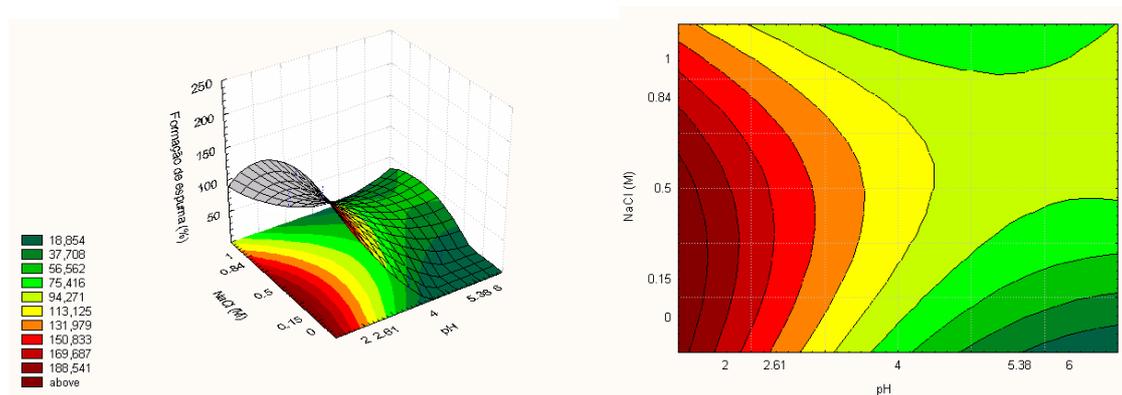


Figura 1- Superfície de resposta e curva de contorno do complexo α -La/CMC para as concentrações de NaCl (M) e valores de pH para a formação de espuma (%), à concentração de 1%.

Observa-se na Figura 2 que numa faixa de pH de 2,0 - 4,0, ao aumentar a concentração de sal, a porcentagem de espuma formada é crescente. No entanto, a resposta foi desfavorável quando se aumentou o valor de pH e reduziu a concentração de sal.

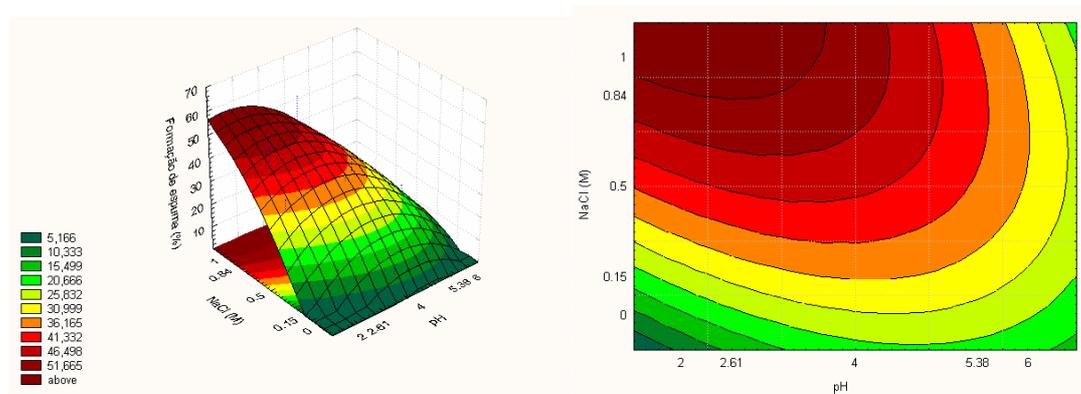


Figura 2- Superfície de resposta e curva de contorno do complexo β -Lg/CMC para as concentrações de NaCl (M) e valores de pH para a formação de espuma (%), à uma concentração de 1%.

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos com a amostra de PT/CMC.. Dentro do intervalo estudado, os valores intermediários de NaCl e pH

apresentaram melhores resultados para a porcentagem de espuma formada. Analisando os fatores independentes, nota-se que nos extremos de valores, os fenômenos comportamentais são similares, ou seja, abaixo de 0,15M de NaCl houve uma diminuição do volume, assim como próximo de 1,0M. Em relação aos valores de pH estudados, verificou-se que acima de 5,38 e abaixo de 2,61 houve uma redução no volume de espuma, e, portanto, a melhor faixa para formação de espuma encontra-se entre os pHs 3 e 5.

Através dos resultados estatísticos apresentados no estudo da superfície de resposta, foi possível verificar que a concentração de NaCl exerceu maior influencia na formação de espuma para o complexo PT/CMC, ao contrário das outras amostras que tiveram um sinergismo estatisticamente significativo entre as variáveis independentes (pH e NaCl) na resposta de formação de espuma.

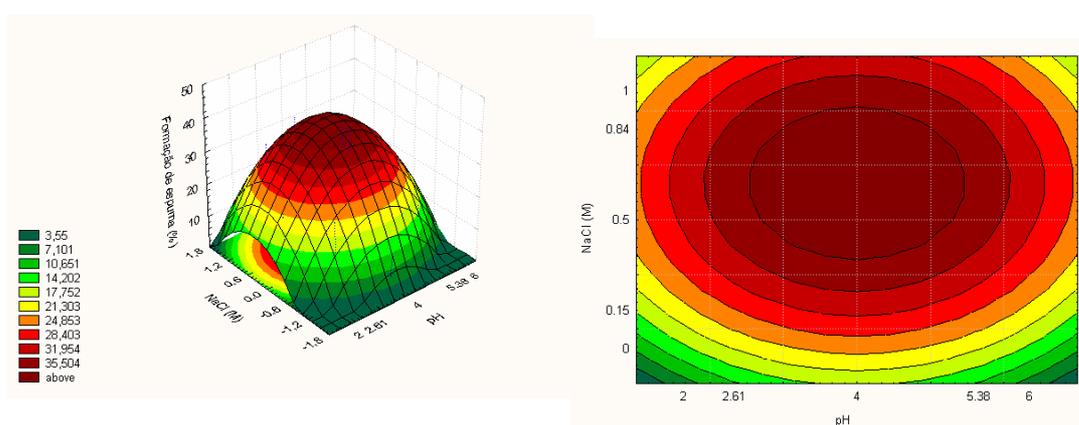


Figura 3- Superfície de resposta e curva de contorno do complexo PT/CMC para as concentrações de NaCl (M) e valores de pH para a formação de espuma (%), à uma concentração de 1%.

3.2- Emulsão

3.2.1- Valores de “Back-Scattering” inicial (BS₀)

Os gráficos das Figuras 4, 5 e 6 exibem os resultados de BS inicial das distintas amostras logo após a formação das emulsões. Nota-se que para os três

complexos os maiores valores de BS, em valores absolutos, foram obtidos em pH 6,0. Sendo os resultados mais favoráveis expressos pelas amostras α -La/CMC e β -Lg/CMC em máxima concentração testada (5 mg/mL). No entanto, para a PT/CMC, este parâmetro produziu melhores resultados quando a concentração da solução foi de 2,5 mg de amostra/mL e no pH 6,0.

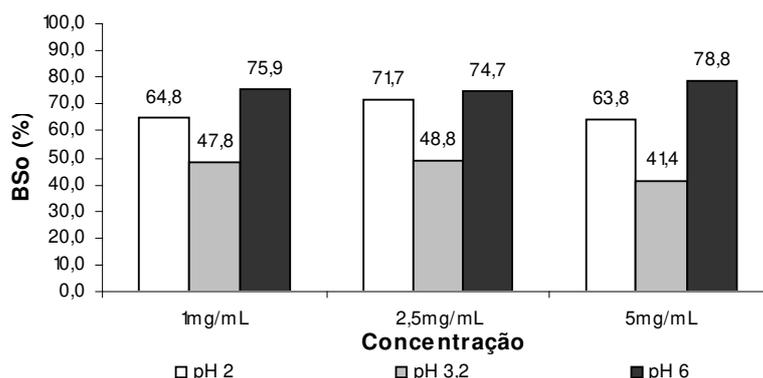


Figura 4- Valores de Back-Scatering inicial (BSo) do complexo β -Lg/CMC em diferentes valores de pH, nas concentrações de 1; 2,5 e 5 mg/mL.

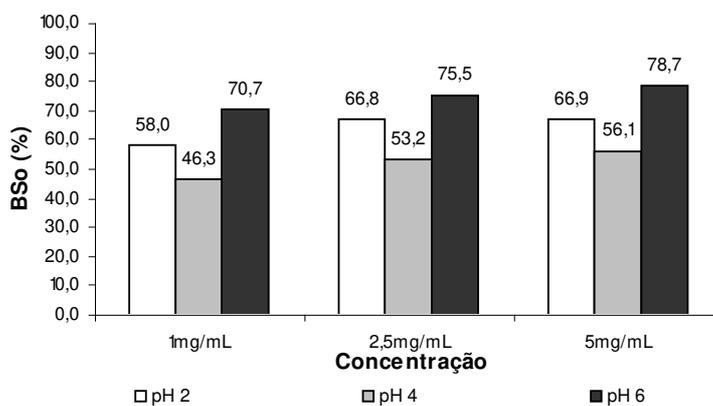


Figura 5– Valores de Back-Scatering inicial (BSo) do complexo α -La/CMC em diferentes valores de pH, nas concentrações de 1; 2,5 e 5 mg/mL.

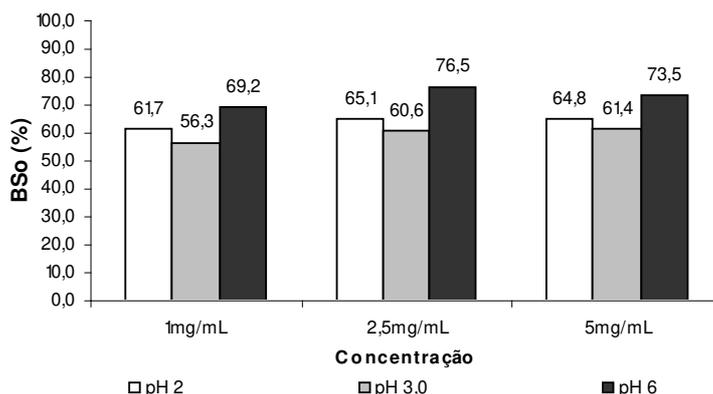


Figura 6 – Valores de Back-Scatering inicial (BSo) do complexo PT/CMC em diferentes valores de pH, nas concentrações de 1; 2,5 e 5 mg/mL.

Isoladamente, os valores de BSo determinam a estabilidade de uma emulsão. Porém, para afirmar se uma emulsão é mais ou menos estável é importante correlacionar os resultados de BSo, constante de cremado (K) e porcentagem de coalescência.

A partir destes resultados pode-se afirmar que em pH 6,0 e independente da concentração de amostra, obteve-se os maiores valores de BSo, exceto para a PT/CMC que apresentou maiores valores em 2,5 mg/mL de concentração. Estes elevados valores (% BSo) indicam que ocorreu uma maior densidade de gotas emulsionadas na região de leitura pelo equipamento (EUSTON; FINNIGAN; HIRST, 2002).

Os resultados podem estar relacionados a descomplexação e solubilidade da goma neste pH (6,0), conforme verificado anteriormente, contribuindo para a estabilidade do sistema. Ou seja, a goma que está solúvel neste pH age como espessante e a proteína solúvel e parcialmente descomplexada diminui rapidamente a tensão interfacial originando emulsões com gotas menores e estáveis (DICKINSON, 2003).

3.2.2- Constante de cremado (K)

Valores de constante de cremado (K) indicam o tempo necessário para que ocorra a formação da fase de cremado, a qual poderá evoluir, ou não, para a floculação e conseqüentemente para total desestabilização da emulsão pela coalescência, avaliada num intervalo de 24 horas (BS 24 hs).

Por ser uma grandeza inversamente proporcional ao tempo, dizemos que quanto maiores são os valores de K, menor é o tempo (minutos), para que se forme o cremado, refletindo na falta de estabilidade da emulsão.

Os resultados expressos nas Figuras 7, 8 e 9 correlacionam valores de K em relação ao pH e à concentração em que se encontram os complexos.

Na Figura 7 verificam-se os valores de K obtidos em pH 2,0 e diferentes valores de concentração. Observa-se que a amostra a α -La/CMC ($8,8 \text{ min}^{-1}$), apresentou menor estabilidade na concentração de 5 mg/mL, quando comparadas com os outros complexos ($0,9 \text{ min}^{-1}$ para α -La/CMC e $2,8 \text{ min}^{-1}$ para a PT/CMC). Neste mesmo pH o complexo β -Lg/CMC ($3,5 \text{ min}^{-1}$), apresentou menor estabilidade a 1 mg/mL de concentração, enquanto a PT/CMC ($2,9 \text{ min}^{-1}$), obteve menor estabilidade na concentração de 5 mg/mL.

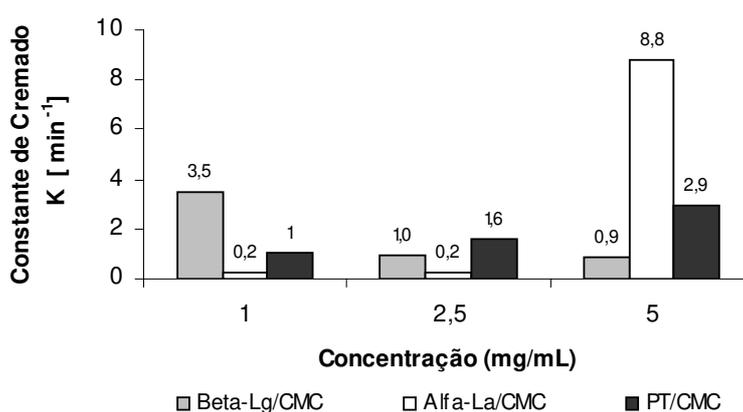


Figura 7 - Valores de K dos três complexos em pH 2,0, e concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL.

De acordo com a Figura 8, pode-se verificar que a amostra de maior estabilidade em pH original de formação do coacervado foi a PT/CMC ($0,28 \text{ min}^{-1}$), independente da concentração (Figura 8). A amostra α -La/CMC ($33,3 \text{ min}^{-1}$) foi a que apresentou menor estabilidade, principalmente na concentração de 5 mg/mL.

O complexo β -Lg/CMC ($6,5 \text{ min}^{-1}$), obteve maior estabilidade a 2,5 mg/mL de concentração quando preparada a emulsão em pH original.

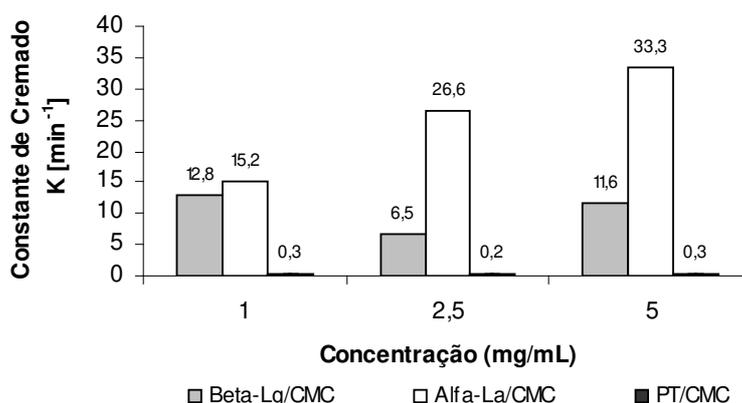


Figura 8- Valores de K dos três complexos em pH original (4,0 para a β -Lg/CMC; 3,2 para a α -La/CMC e 3,0 para a PT/CMC), em concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL.

Os testes de constante de cremado (K) em pH 6,0, encontram-se representados na Figura 9. Estes, mostraram que a PT/CMC foi a que apresentou maiores valores de K, sendo mais expressivo a 1 mg/mL ($0,7 \text{ min}^{-1}$). Este resultado indica menor estabilidade da amostra. Os complexos β -Lg/CMC e α -La/CMC (próximos de $0,2 \text{ min}^{-1}$), independente da concentração, apresentaram valores similares de K para este pH e portanto foram mais estáveis.

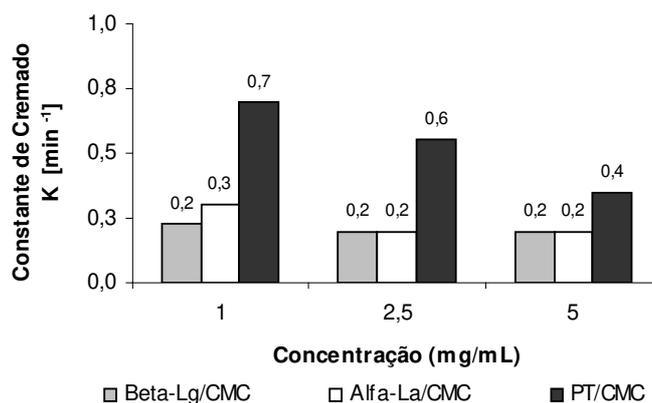


Figura 9- Valores de K dos três complexos em pH 6,0 e em concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL.

Comparando os valores absolutos de K nas diferentes Figuras (7, 8 e 9), os resultados em pH 6,0, mostraram que, em geral, ocorreu maior estabilidade (valores menores que $1,0 \text{ min}^{-1}$) das emulsões formadas pela β -Lg/CMC (Figura 9). Este mesmo resultado (menor que $1,0 \text{ min}^{-1}$), foi obtido pelo complexo α -La/CMC, em pH 2,0 e em concentrações de 1,0 e 2,5 mg/mL (Figura 7). Similarmente, a PT/CMC apresentou valores mais baixos de K em pH original (3,0) de obtenção do complexo (Figura 8).

Portanto, a única exceção que apresentou maior estabilidade no pH original de obtenção do complexo, para todas as concentrações avaliadas foi a amostra PT/CMC. Melhor estabilidade das soluções frente ao processo de cremado emulsionadas em pH 6,0, foi obtida com a β -Lg/CMC. A CMC que encontra-se livre ou parcialmente dissociada promoveu um aumento da viscosidade na fase aquosa a qual contribuiu favoravelmente para a estabilidade da interface água/óleo (EUSTON, FINNIGAN; HIRST, 2002; HUANG et al., 2001).

3.2.3- Porcentagem de Coalescência (%C)

A %C é um parâmetro avaliado pelo equipamento “Quick Scan”, 24 horas após o preparo da emulsão. Os maiores valores de %C indicam menor estabilidade da emulsão após 24 hs.

Através das análises, observou-se que em pHs 2,0 e 6,0 nenhum dos complexos coalesceu, ou seja, nestas condições os valores de BS 24 hs continuaram iguais aos valores de BSo. No entanto, em valores de pH de obtenção dos complexos, todas as emulsões coalesceram, com exceção do complexo PT/CMC (1,0 mg/mL) (Tabela 10).

No período de 24 hs, a amostra PT/CMC (pH 3,0) mostrou menor estabilidade em concentração de 5 mg/mL. Contudo, apresentou-se mais estável a concentração de 1 mg/mL e não coalesceu, impedindo a leitura do BSo em 24 hs.

Tabela 10 – Valores de Porcentagem de Coalescência (% C) dos três complexos em concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL, em valores de pH originais de obtenção; sendo pH 4,0 para a β -Lg/CMC; 3,2 para a α -La/CMC e 3,0 para a PT/CMC.

% Coalescência			
Concentração (mg/mL)	α -La/CMC	β -Lg/CMC	PT/CMC
1,0	25,2	22,5	0,3
2,5	20,1	10,8	49,9
5,0	19,4	5,3	64,4

No pH de formação dos complexos, análises preliminares mostraram que a solubilidade tanto da proteína como da CMC foram reduzidas, sendo mais expressiva para a PT/CMC. Devido à baixa solubilidade do hidrocolóide, sua concentração na interface é mínima e as gotas de óleo podem se unir pela adsorção ou interação do polissacarídeo na superfície da gota por efeito osmótico. Assim, irá ocorrer flocculação ou depleção das gotas e conseqüentemente evoluir para a coalescência (JENKINS; SNOWDEN, 1996).

Quando existe um excesso de polissacarídeos ou de agregados insolúveis na interface, ocorre um aumento na velocidade de formação do cremado, pois os polissacarídeos não complexados se ligam às gotas de óleo e desencadeiam o fenômeno de flocculação (SCHMITT et al., 1998; SRYBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998). Em emulsões formadas por complexos isolado de soro

de leite (ISL) e CMC obtidos em pH 4,2, o ajuste para pH 7,0 resultou na descomplexação parcial dos coacervados e reduziu a floculação (GIRARD; TURGEON; PAQUIN, 2002).

Para as amostras α -La/CMC e β -Lg/CMC ocorreu um comportamento oposto, ou seja, o aumento da concentração de amostra contribuiu para o ganho de estabilidade da emulsão. De um modo geral, é de se esperar que a floculação e, por conseqüência, a coalescência, sejam reduzidas com o aumento da concentração de sólidos solúveis que são adsorvidos na emulsão. Isto porque com a presença de um agente estabilizante solúvel ocorre uma redução da formação de microcanais que poderão proporcionar a perda de água da fase aquosa (GIRARD; TURGEON; PAQUIN, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho com os complexos α -La/CMC e β -Lg/CMC foram concordantes com o estudo realizado por Huang et al. (2001). Neste, emulsões feitas com diversas gomas mostraram maior estabilidade com o aumento da concentração, melhorando a estabilidade do sistema. Os polissacarídeos solúveis agem não somente na melhora da viscosidade da fase contínua, mas também terão efeitos na adsorção da proteína na interface A/O, pois, promovem aumento na atividade termodinâmica protéica. Desta forma, as proteínas interagindo com os lipídeos diminuem sua estabilidade conformacional e expõem suas regiões hidrofóbicas, importantes para a estabilidade da emulsão (TOLSTOGUZOV, 1997).

Pelos resultados obtidos com a α -La/CMC e β -Lg/CMC é interessante ressaltar que apesar da solubilidade reduzida destes complexos no pH original de obtenção (3,2 e 4,0, respectivamente), a força aplicada para emulsionar o sistema (Ultra-turrax), pode ter ocasionado mudanças na sua conformação estrutural. Uma vez alterada a superfície destes complexos pode ter ocorrido uma exposição dos grupos hidrofóbicos das proteínas, disponibilizando novos sítios de ligação para os lipídeos e contribuindo para a estabilidade da emulsão (LIPPI; TARANTO, 1981; PACHECO, SGARBIERI, 1998).

Analisando todos os parâmetros utilizados neste trabalho para medir a estabilidade das emulsões, foi possível observar que logo após a formação da emulsão todas se apresentaram estáveis, independente do pH e da concentração. Com decorrer do tempo, a PT/CMC, em pH original de formação do complexo (3,0) foi a que apresentou maior tempo para iniciar o processo de formação do cremado (< K), em todas as concentrações estudadas. Por outro lado, ao avaliar a estabilidade das emulsões após 24 horas, nenhuma amostra coalesceu em pH 2,0 e 6,0. Porém, em pH original de formação dos complexos todos coalesceram, sendo que a PT/CMC apresentou maiores porcentagens de coalescência (% C), principalmente em função do aumento da concentração de amostra. Portanto, a PT/CMC, embora tenha levado maior tempo para iniciar o processo de cremado, uma vez iniciado coalesceu em maior intensidade que os demais coacervados.

3.2.4- Análise das emulsões utilizando fotos em microscópio óptico

Do conjunto de resultados obtidos das fotos em microscopia óptica serão apresentados apenas as emulsões na concentração de 5 mg/mL, nas diferentes faixas de pH estudadas. Nas demais concentrações (1,0 e 2,5 mg/mL) não foram observadas mudanças no aspecto das emulsões.

Na Figura 10 observa-se que as emulsões preparadas contendo 5mg/ml de complexo formam gotas de aspecto e tamanhos diferenciados em função do valor do pH do meio.

Em valores de pH 2 (Figuras 10- A1, B1, C1) todas as amostras emulsionadas formaram gotas de pequeno tamanho com tendência a floculação, apresentando vazios entre elas, correspondente à fase líquida. Verificou-se a presença de agregados insolúveis no sistema, apontados pelas setas brancas.

Nota-se que em pH original de formação dos complexos (Figuras 10 - A2, B2, C2), em geral, todas as amostras estudadas apresentaram agregados insolúveis (apontados pelas setas), provavelmente em decorrência da falta de solubilidade inicial das amostras nesta condição. Para o complexo α -La/CMC em pH 3,2, verificou-se na Figura 10-A2, que as gotas apresentaram aspecto

nitidamente globular, de grande tamanho, que tenderam a coalescer para volumes maiores. O complexo β -Lg/CMC (pH 4,0) formou filmes que englobaram a fase oleosa em gotas de menor tamanho quando comparadas ao complexo α -La/CMC. Contudo, apresentaram a mesma tendência a coalescência, englobando os agregados insolúveis, gerando espaços livres da fase líquida. Este comportamento indicou claramente que ocorreu falta de estabilidade na emulsão logo após a sua formação. Para a emulsão formada com a PT/CMC (pH 3,0) verifica-se na Figura 10-C2 um comportamento diferenciado, pois as gotículas formadas foram de menor tamanho e por este complexo ter apresentado a menor solubilidade em água em relação as demais amostras no pH original, e provavelmente por sua característica de hidrofobicidade formaram um grande agregado revestido por uma capa de óleo ao seu redor, nitidamente visualizada por seu aspecto esbranquiçado. Comparando aos resultados da Tabela 10, percebe-se que esta foi a emulsão que apresentou maior porcentagem de coalescência.

Para as emulsões preparadas em pH 6,0 verifica-se na Figura 10 - A3, B3, C3, que as gotas apresentaram floculação entre elas, porém sem coalescência. Observa-se pouco espaço vazio de fase líquida e maior homogeneidade entre as fases. Em relação ao estudo de estabilidade, em pH 6,0 todas as amostras apresentaram maior valor de BS_0 (menor dispersão de luz) reforçando o aspecto de homogeneidade das emulsões. Neste pH os valores de constante de cremado (K) para os complexos α -La/CMC e β -Lg/CMC foram menores que os obtidos pela PT/CMC, indicando maior tempo para formar a fase de cremado e, portanto maior estabilidade destas amostras. No caso da α -La/CMC, esta apresentou os mesmos valores de K em pH 2,0.

As emulsões preparadas nestes experimentos foram todas do tipo líquida e por isso a fase de cremado sempre foi formada, ainda que este parâmetro ocorra em diferentes intervalos de tempo (K).

Comparando as fotos e os resultados de estabilidade das emulsões com a estabilidade de espuma (Tabela 2), verificou-se que a maior estabilidade destes sistemas ocorreu no pH 6,0. Provavelmente neste pH houve uma dissociação do

complexo, permitindo ao polissacarídeo aumentar a viscosidade da fase líquida, e a proteína (livre) migrar para a interface formando um sistema estável frente aos fenômenos de desestabilização.

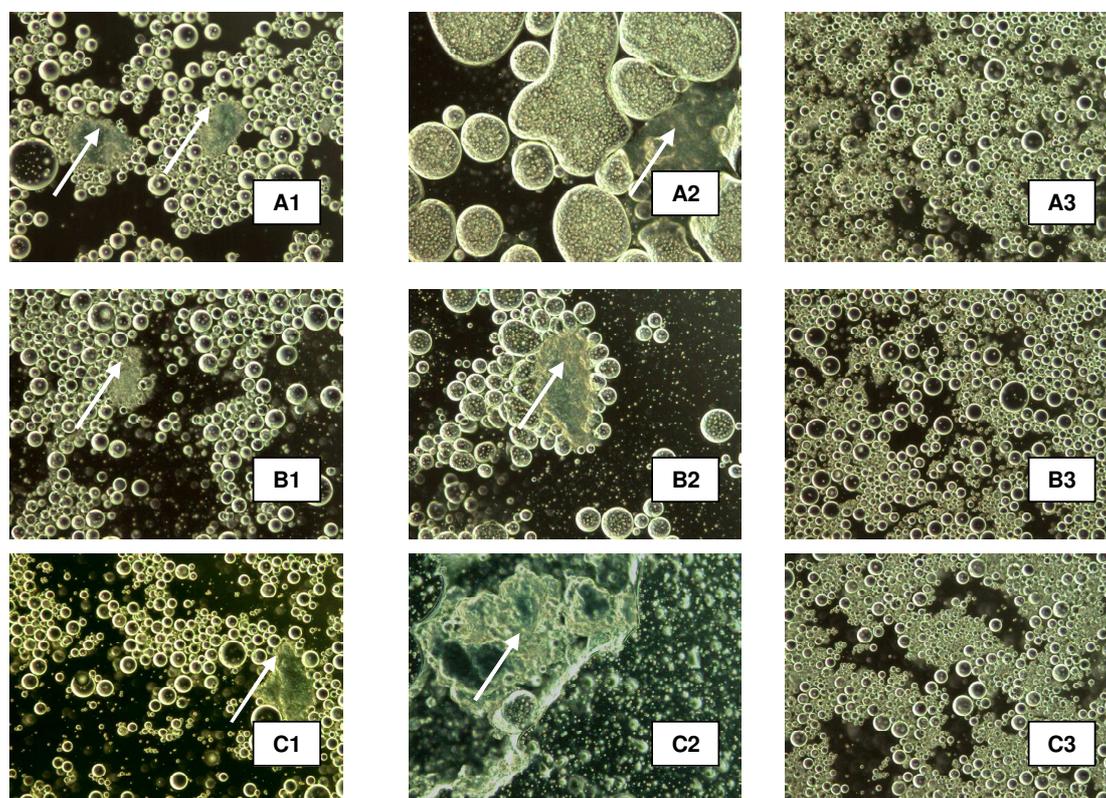


Figura 10- Fotos das emulsões a 5 mg/mL de concentração, em aumento 20X.

* As setas em branco indicam os precipitados insolúveis em meio à emulsão (A1 e A2, B1 e B2, C1 e C2).

- A1, A2 e A3 representam respectivamente emulsões de α -La/CMC em pHs 2,0; 3,2 e 6,0.

- B1, B2 e B3 representam respectivamente emulsões de β -Lg/CMC em pHs 2,0; 4,0 e 6,0.

- C1, C2 e C3 representam respectivamente emulsões de PT/CMC em pHs 2,0; 3,0 e 6,0.

4- CONCLUSÕES

A melhor formação de espuma ocorreu em pH 2,0 para todas as amostras, sendo o maior volume exibido pelo complexo α -La/CMC. Neste pH todas formaram espumas de menor estabilidade, porém em pH 6,0, a estabilidade da β -Lg/CMC e da PT/CMC foram melhores.

De acordo com o planejamento experimental (2^2) a resposta para porcentagem de volume espumado foi significativa ($p \leq 0,05$) para a interação das variáveis pH e NaCl nos experimentos com a β -Lg/CMC e a α -La/CMC. Observou-se que o melhor volume foi obtido com a α -La/CMC em pH abaixo de 4,0 e em concentrações de NaCl de até 0,84M.

Apesar da amostra PT/CMC em pH original (3,0) e em todas as concentrações ter se apresentado maior estabilidade frente ao processo de formação do cremado, foi a amostra que obteve maior porcentagem de coalescência neste mesmo pH. Em pH original, todas as amostras coalesceram após 24 hs, sendo este resultado mais expressivo para a PT/CMC a 5 mg/mL de concentração.

Os três complexos formaram emulsões do tipo líquida com gotas distribuídas na forma de flóculos, apresentando maior uniformidade para as emulsões preparadas em pH 6,0. A visualização do comportamento das amostras ao microscópio óptico correlacionou os valores obtidos com os parâmetros de estabilidade avaliados.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOX, G.E.P. In: BOX, G.E.P.; Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (Eds.). **Statistics for Experimenters: An Introduction to Design Data Analysis and Model Building**. New York: Chichester, 653p., 1978.

CHANAMAI, R.; Mc CLEMENTS, D.J. Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. **Colloids and Surfaces A**, Amsterdam, n. 172, p. 79-86, 2000.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, p. 25-39, 2003.

DICKINSON, E; IZGI, E. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v.113, p.191-201, 1996.

ELIZALDE, B.E.; GIACCAGLIA, D.; PILOSOF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 1, p. 24-26, 1991.

EUSTON, S.R.; FINNINGAN, S.R.; HIRST, R.L. Kinetics of droplet aggregation in heated whey protein-stabilized emulsions: effect of polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, p. 499-505, 2002.

FEDDERSEN, R.L.; THORP, S.N. Sodium Carboxymethylcellulose. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N., (Eds.). **Industrial Gums**. San Diego: Academic Press, 1993, 3 ed., cap. 20, p.537-578.

- GIRARD, M.; TURGEON, S.L.; PAQUIN, P.. Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n.1, p. 113-119, 2002.
- HALLING, P.J. Protein-stabilized foams and emulsions. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 12, p. 155-203, 1981.
- HANSEN, P.T.M.; BLACK, D.H. Whipping properties of spray-dried complexes from whey protein carboxymethylcellulose. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 37, p. 452-456, 1972.
- HANSEN, P.M.; HIDALDO, J. E GOULD, I.A. Reclamation of whey protein with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 6, p. 830-834, 1971.
- HIDALGO, J. E HANSEN, M.T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 9, p. 270-274, 1971.
- HUANG, X.; KAKUDA, Y.; CUI, W. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, p. 533-542, 2001.
- JENKINS, P.; SNOWDEN, M. Depletion flocculation in colloidal dispersions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, p. 57-96, 1996.
- LIPPI, M.S.; TARANTO, M.V. Soy protein – acidic polysaccharide interaction: modification of the emulsification properties of soy protein isolate. **Lebensm. Wiss.V. Technology**, local, v. 14, n. 2, p. 55-59, 1981.
- MANN, B., MALIK, R.C. Studies on some functional characteristics of whey protein-polysaccharide complex. **J. Food Science and Technology**, India, v.33, n.3, p.202-206, 1996.
- MENGUAL, G.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Turbiscam MA2000: Multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v.50, pp.445-456, 1999.
- NAGASAWA, K.; TAKASHI, K.; HATTORI, M. Improved emulsifying properties of β -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.10, n.1, p. 63-67, 1996.
- PACHECO, Maria Teresa Bertoldo; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Propriedades espumantes de concentrados protéicos de levedura (*Saccharomyces sp*), obtidos por diferentes processos de extração. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1998, Rio de Janeiro. **XV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Tec Art, 1998. v. 1, p.2090-2093.
- PACHECO, M.T.B. **Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados protéicos de levedura (*Saccharomyces sp.*) obtidos por diferentes processos de extração**. 1996. 158p. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- PAN, L.G.; TOMÁS, M.C.; AÑÓN, M.C. Effect of sunflower lecithins on stability of water-in-oil and oil-and-water emulsions. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.5, n. 2, p. 135-143, 2002.
- PILOSOFF, A.M.R. Geleificação. In: PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. (Eds.). **Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas**. Buenos Aires: Eudeba, 2000. Cap. 4, p. 75- 96.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews un Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

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

SRYBE, A.; BAUER, W.J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concept in dairy systems: an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n.3, p. 179-193, 1998.

TOLSTOGUZOV, V.B. Functional Properties of protein-polysaccharide mixtures. In: MITCHELL, J.R.; LEDWARD, D.A. (Eds.). **Functional Properties of Food Macromolecules**. London: Elsevier, 1986. p. 385-415.

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

CONCLUSÕES GERAIS

Através da técnica de coacervação complexa com carboximetilcelulose (CMC) foi possível fracionar e recuperar as proteínas do soro de leite de maneira seletiva, obtendo-se três complexos distintos que foram classificados como β -lactoglobulina/CMC (β -Lg/CMC) e α -lactoalbumina/CMC (α -La/CMC) por apresentarem maior presença destas proteínas nas respectivas frações precipitadas, e proteínas totais (PT/CMC). O maior rendimento de proteínas obtido foi na recuperação do complexo β -lactoglobulina, sendo de 86% de proteína precipitada quando feito o processamento em escala piloto.

As análises de solubilidade, determinação de proteínas e de CMC solúveis, e eletroforeses permitiram concluir que o complexo se dissocia parcialmente, quando o pH se afasta do valor de pH original de coacervação, ou seja, em pH 2,0; 5,0 e 6,0. Já em valores de pH 3,0 a 4,0 (valores originais), os biopolímeros apresentam duas situações, uma fração permaneceu unida e insolúvel e outra, co-solúvel.

Os resultados de DSC demonstraram que a presença de hidrocolóides estabiliza a proteína ao processo de desnaturação por calor, independente do tipo de união estabelecida entre os mesmos.

Segundo os reogramas de análises oscilatórias, as amostras se caracterizam como um sólido-viscoelástico em soluções a 20% de concentração. Todos os complexos apresentaram valores de fase sólida (G') maiores que os da fase líquida ou fluida (G''). Somente a α -La/CMC formou um gel desmoldável em valores de pH de complexação.

O complexo PT/CMC apresentou viscosidade aparente reduzida em relação às demais amostras, sendo que todas elas se comportaram como um fluido pseudoplástico.

A capacidade espumante foi melhor para a amostra de α -La/CMC em pH 2,0, porém a maior estabilidade se deu em pH alcalino para as três amostras

estudadas. A interação das variáveis (pH e NaCl) foi significativa na formação de espuma para a α -La/CMC e β -Lg/CMC ($p < 0,05$).

Em relação às emulsões preparadas concluiu-se que a estabilidade foi melhor para a amostra PT/CMC em pH original em relação à formação do cremado (K), porém, neste mesmo pH foi o complexo obteve maior porcentagem de coalescência (%C). Todas as emulsões coalesceram em pH original de formação do complexo independente da concentração de amostra. A melhor uniformidade das gotas emulsionadas foi obtida em pH 6,0.