



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

**GELEIFICAÇÃO DE SISTEMAS SIMPLES E MISTOS DE ISOLADOS  
PROTÉICOS DE SOJA E DE SORO DE LEITE**

**Janai Cristiane Santos Nascimento Paz**

Engenheira de alimentos

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flavia Maria Netto**

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-SP**

**2004**

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

P298g Paz, Janai Cristiane Santos Nascimento  
Geleificação de sistemas simples e mistos de isolados  
protéicos de soja e de soro de leite / Janai Cristiane Santos  
Nascimento Paz. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.Geleificação. 2.Isolado protéico. 3.Soja. 4.Soro do leite.  
5.Gel misto. I.Netto, Flavia Maria. II.Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

cars-fea

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Flavia Maria Netto

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DEPAN – UNICAMP

Orientadora

---

Profª Drª Mirna Lúcia Gigante

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DTA – UNICAMP

Membro

---

Profª Drª Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – DEA – USP

Membro

---

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DEPAN – UNICAMP

Membro



“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”

**Josué 1:8**



Ao Senhor Jesus Cristo,  
toda a honra, toda a glória, e a minha gratidão,  
por mais essa vitória que Ele me permitiu conquistar.

Ao meu marido José Enio,

Que com a paciência, dedicação e muito amor, este ao meu lado,  
tentando, incessantemente, me ensinar a confiar em Deus em qualquer  
circunstância, a estar em todo o tempo, e ajudando-me a superar as  
dificuldades.

DEDICO



## **AGRADECIMENTOS**

À Profª Drª Flavia Maria Netto, pela orientação e disponibilidade na realização desta pesquisa;

Aos Professores membros da banca examinadora, Prof. Dr. Carlos Grosso, Profª Drª Maria Teresa B. Pacheco e á Profª Drª Mirna L. Gigante, pelas correções e sugestões feitas ao trabalho;

À Drª Maria Cristina Añón, pela colaboração na análise dos resultados de eletroforese.

À minha mãe Maria e a minha irmã Genes, por terem sido pai e mãe para mim e efeito o impossível para que eu conquistasse os meus objetivos;

À minha irmã Cristina, pelo exemplo de mulher cristã que é, pelo incentivo que mesmo de longe me dá;

Ao irmão Nestor, grande amigo, pelas orações;

À D. Sara Paz, minha sogra, pelo apoio concedido sempre que precisamos;

Às amigas maravilhosas que aqui encontrei, Sônia, Adriana(Dudinha), Suziley (Suzi), Elizabete Lourenço (Bete), Rosângela (Rô), Noemi (Nonô), Fernanda Ventura (Fer), Caroline Capitani (Carol), Carolina (Carol do DTA), pela grande amizade, auxílio, incentivo e apoio constantes, sugestões, e a amizade em todos os momentos; também pela alegria que sentiram a cada conquista que alcancei.

Aos amigos, D. Vilma, Sr. Diniz, Dinda, Olguinha, D. Tereza (mãe da Sonia), por torcerem pelo meu sucesso;

Ao Luciano, pelas horas de estudo e também de descontração;

Aos amigos Henrique, Valquíria, Yasmim e Marcos Kols, pela amizade vivida nesses anos;



À Ana Silvia, Carol, Andréa e Flávia que, sem me conhecerem me acolheram em sua casa, minha gratidão.

À Elizabete Lourenço, Sônia Souza, Adriana Diniz, Eliana Motta e Lucia de La Hoz pela ajuda na realização e discussão do trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, Eliana P. Motta, Elizabete F. Silva e Francisco (Chico), pela atenção, colaboração e disponibilidade.

À Ana Braga pela ajuda na análise de DSC;

À Secretaria de Pós graduação, em especial ao Cosme Perota, pela simplicidade, gentileza e capacidade de realização de seu trabalho;

À Dr<sup>a</sup>. Vera Lucia S. Baldini, Lucimara e Marjorie (ITAL) pela amizade e apoio quando aqui cheguei;

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas/Biológicas e Agrícolas, em especial ao pesquisador Adilson Fartoratto, pela gentileza e auxílio na análise densitométrica dos géis de eletroforese (SDS-PAGE);

À BUNGE do Brasil S/A (Esteio, RS, Brasil), pelo fornecimento do isolado protéico de soja e à Davisco Foods International, inc. (Le Sueur, MN, USA), pelo fornecimento do isolado protéico de soro de leite;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

À FAEP pelo auxílio financeiro à pesquisa;

Enfim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram neste trabalho.



## ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Características estruturais e conformacionais de proteínas .....	3
2.1.1 Proteínas de soja .....	3
2.1.2 Proteínas do soro de leite.....	4
2.2 Isolado protéico de soja e de soro de leite.....	5
2.3 Propriedades funcionais das proteínas da soja e do soro de leite .....	6
2.3.1 Solubilidade protéica .....	7
2.3.2 Propriedade de geleificação.....	9
2.3.3 Microestrutura dos géis .....	13
2.3.4 Capacidade de retenção de água do gel.....	14
2.3.5 Textura.....	16
2.4 Géis mistos .....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Materiais .....	23
3.2 Métodos .....	23
3.2.1 Caracterização dos Isolados Protéicos de Soja e de Soro de Leite.....	23
3.2.1.1 Determinação da composição centesimal.....	23
3.2.1.2 Determinação de cálcio e sódio.....	24
3.2.1.3 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	24
3.2.1.4 Determinação de grupos sulfidrilas livres (SHF) .....	24
3.2.1.5 Solubilidade Protéica dos IPS e IPSL.....	25
3.2.2 Efeito do pH, temperatura, concentração de proteína e proporção entre os isolados protéicos na obtenção de géis simples e mistos de IPS e de IPSL .....	25
3.2.3 Análise dos géis.....	26
3.2.3.1 Microestrutura .....	26
3.2.3.2 Capacidade de retenção de água.....	27
3.2.3.3 Perfil de Textura .....	27
3.2.3.4 Solubilidade do gel.....	27
3.2.3.5 Perfil eletroforético das proteínas solúveis.....	29
3.2.4.6 Análise estatística .....	29
<b>4 RESULTADOS e DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
4.1 Caracterização dos isolados protéicos de soja (IPS) e de soro de leite (IPSL) .....	30
4.1.1 Composição centesimal dos isolados protéicos de soja e de soro de leite .....	30
4.1.2 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	32
4.1.3 Sulfidrilas livres.....	34
4.1.4 Solubilidade Protéica.....	34
4.1.5 Efeito do pH, temperatura, concentração de proteína e proporção entre os isolados protéicos na obtenção de géis simples e mistos de IPS e de IPSL .....	37
4.2 Análise dos géis.....	41
4.2.1 Microestrutura, CRA e perfil de textura dos géis.....	41
4.2.3 Solubilidade dos géis.....	48
<b>5- CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>



## RESUMO

A influência do pH (3,5 e 7,0); da temperatura de aquecimento (80 e 95 °C) e da concentração de proteína (8 a 14%) na obtenção de géis de isolados protéicos comerciais de soja (IPS) e de soro de leite (IPSL) foi estudada em sistemas simples e mistos, nas proporções de IPS : IPSL 100 : 0; 80 : 20; 60 : 40; 40 : 60; 20 : 80; 0 : 100. Os géis simples e mistos formados em pH 3,5 foram do tipo coágulo, opacos, com grande exudação de água e quando a concentração de IPSL foi maior que a de IPS, os géis apresentaram separação de fase dos dois sistemas protéicos. Os géis preparados em pH 7,0, com 12 e 14% de proteína e temperatura de 80°C eram extremamente moles e, com 12% de proteína e temperatura de aquecimento de 95°C, eram formados géis incapazes de manter a sua forma. Os géis simples e mistos preparados em pH 7,0, com 14% de proteína, e temperatura de aquecimento 95°C eram firmes e elásticos, sendo que nos géis mistos essas características tiveram intensidade intermediária a dos géis simples de IPS e IPSL. As propriedades físico-químicas, estruturais e funcionais dos géis foram estudadas pela análise da solubilidade dos componentes protéicos dos géis em diferentes meios de extração, caracterização dessas frações solúveis por SDS-PAGE e da microestrutura por microscopia diferencial de varredura. A capacidade de retenção de água (CRA) e os parâmetros de textura dureza, coesividade e elasticidade também foram determinados. Os resultados mostraram que houve aumento na dureza dos géis com o aumento da proporção de IPSL na mistura em ambos os pHs estudados e em pH 7,0, géis com dureza igual ( $p \leq 0,05$ ) à do gel de IPSL foi obtido quando a substituição foi de 20%. A mistura IPS:IPSL também favoreceu o aumento da coesividade dos géis de pH 7,0 e da elasticidade dos géis de pH 3,5, quando comparados ao gel simples de IPS. Os géis de filamentos finos e estrutura compacta, obtidos em pH 7,0, apresentaram maior CRA que os géis de estrutura grosseira obtidos em pH 3,5. A substituição parcial de IPS por IPSL na obtenção de géis com pH 3,5 favoreceu a formação de uma microestrutura mais compacta, menos porosa, que a do gel simples de IPS. A



análise de solubilidade indicou que os géis foram mantidos principalmente por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio em ambos os pHs estudados. O perfil indica que a  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, proteínas do soro de leite, e o polipeptídeo ácido da fração 11S, foram estabilizados principalmente por interações eletrostáticas. A fração 7S e o polipeptídeo básico da fração 11S, foram mantidos principalmente por ponte de hidrogênio e interações hidrofóbicas.



## ABSTRACT

The influence of pH (3.5 and 7.0); heating temperature (80 and 95°C) and protein concentration (8 to 14%) on gelation properties of commercial soy protein isolate (SPI), whey protein isolate (WPI) was tested in isolation and when mixed in ratios 100:0; 80:20; 60:40; 20:80; 0:100 SPI:WPI. The simple and mixed gels obtained in pH 3.5 were clot gels, opaque, with high loss of water, and when the concentration of WPI was larger than the concentration of SPI, the gels showed phase separation of the two protein systems. In pH 7.0 with protein concentration of 12 and 14% and 80°C, the gels were very soft and when the protein concentration was of 12% and the heating temperature was 95°C the gels were unable to keep their shape. In pH 7.0, 14%, 95°C, the simple and mixed gels were firm and elastic, and the mixed gels showed these characteristics in an intermediate intensity when compared to simple gel obtained from SPI or WPI. These gels' physical-chemical, structural, and functional properties were studied by determination of solubility of the gel proteinic components, characterization of the soluble fractions by SDS-PAGE and of the microstructure by scanning electron microscopy (SEM). The water-holding capacity (WHC) and parameters of texture (hardness, cohesiveness and elasticity) were also determined. The results showed that the hardness increased when the amount of WPI was higher than the amount of SPI in the mixture in both pH studied, and in pH 7.0 the gels as hard as ( $p \leq 0.05$ ) the simple gel of WPI were obtained when the substitution of SPI to WPI was of 20%. The mixture SPI:WPI favored the increase of cohesiveness of the gels with pH 7.0 and the elasticity of the gels with pH 3.5, when compared to the simple gel of SPI. The gels that showed fine strand and compact structure, pH 7.0, had higher WHC than the gels with coarse structure, pH 3.5. The partial change of SPI for WPI in the gels pH 3.5 made the microstructure more compact and less porous than the microstructure of the simple gel of SPI. Solubility assays indicated that the main responsible forces for the maintenance of the gel structure in these pHs are hydrophobic and H bindings.



It is possible that the  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, whey protein, and the acid polypeptide of the 11S globulin was maintained mainly for electrostatic forces. The 7S globulin and the basic polypeptide of the 11S globulin was maintained mainly for hydrophobic and H binding.

# 1 INTRODUÇÃO

A soja é uma excelente fonte de proteína, possuindo alta concentração de aminoácidos essenciais, particularmente lisina, leucina e aminoácidos aromáticos (CHEFTEL et al., 1989). Estudos recentes mostram também que a soja é uma das principais fontes de isoflavanóides, principalmente genisteína, um fitohormônio com atividade estrogênica, anticarcinogênica, antiviral e antioxidante, atribuindo à soja efeitos benéficos à saúde humana e animal (MAZUR e ADLERCREUTZ, 1998).

As proteínas do soro de leite são uma fonte excepcionalmente rica e balanceada de aminoácidos. É reconhecido que várias proteínas do soro de leite conferem proteção não imune aos recém nascidos (SMITHERS et al., 1998). Estas e outras proteínas do leite também apresentam outros efeitos fisiológicos e biológicos como hipocolesterolêmico (ZHANG e BEYNEN, 1993); anticarcinogênico (BEZAULT et. al., 1994); antimicrobiana (MEISEL e SCHLIMME, 1996) e cicatrizante (BELFORD et. al., 1997).

Estas proteínas têm como principais características funcionais: capacidade de hidratação, solubilidade, estabilidade coloidal, geleificação, emulsificação, formação de espuma e adesão/coesão (MORR, 1990). Atualmente, milhares de toneladas de proteína de soja e de soro de leite são utilizadas como ingrediente funcional nas indústrias de alimentos e indústrias não alimentícias em diversas aplicações (RHEE, 1994).

Uma das propriedades funcionais mais importantes dos isolados protéicos de soja e de soro de leite é a capacidade de formar gel quando aquecidos, modificando a textura e aceitabilidade de alimentos tais como produtos lácteos e cárneos (MORR e FOEGEDING, 1990; PARASKEVOPOULOU e KIOSSEOGLU, 1997).

A formação do gel é o resultado de um equilíbrio entre forças atrativas intermoleculares, representadas por interações covalentes e não covalentes (pontes dissulfeto, interações hidrofóbicas e van der Waals e pontes de hidrogênio), e forças repulsivas intermoleculares entre cargas de mesmo sinal. As

propriedades dos géis são influenciadas por fatores interrelacionados, tais como concentração de proteína, temperatura de geleificação, pH, força iônica, presença de íons divalentes e reagentes sulfidril como cisteína. (FOEGEDING et al., 2001).

Com exceção de alguns sistemas, a maior parte dos géis são misturas de vários componentes protéicos, alguns dos quais podem geleificar individualmente, outros não. Essas misturas podem ocorrer naturalmente, como é o caso dos isolados protéicos de soja (IPS), isolado protéico de soro de leite (IPSL), ou proteínas miofibrilares, ou ainda podem resultar de uma formulação intencional (KINSELLA,1990). O comportamento de géis mistos tem atraído a atenção de pesquisadores devido a uma esperada maior flexibilidade de suas propriedades mecânicas e estruturais comparadas às dos géis simples (TURGEON e OULD ELEYA, 2000).

Há várias vantagens e potencial econômico na substituição parcial das proteínas do leite pelas proteínas de soja. A combinação das duas proteínas poderia produzir uma mistura de excepcional valor nutricional, combinar o baixo custo dos IPS e a ampla aceitação dos produtos lácteos, além de poder ser utilizada em produtos como iogurtes e sobremesas.

As proteínas podem interagir e afetar as propriedades de um gel multicomponente. Entre os fatores que influenciam o tipo de estrutura formada estão a compatibilidade termodinâmica dos componentes, sua reatividade mútua ou o potencial para interação, e, para a combinação de dois ou mais geleificantes, seus respectivos mecanismos de geleificação (KINSELLA,1990).

Este trabalho teve o objetivo de estudar o efeito de diferentes pHs, temperaturas, concentração protéica e proporção de IPS e IPSL sobre as características físico-químicas, estruturais e funcionais dos géis obtidos dessa mistura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características estruturais e conformacionais de proteínas

#### 2.1.1 Proteínas de soja

Sob condições apropriadas de tampão (pH 8,0 aproximadamente) as proteínas de soja exibem quatro frações, após ultracentrifugação, cujos coeficientes de sedimentação S (unidades Svedberg, a 20°C em água, computada como a velocidade de sedimentação por unidade do campo de força gravitacional) são 2, 7, 11 e 15 (LIU, 1997). A fração 2S é composta por inibidores de tripsina e Citocromo C, a fração 7S por hemaglutinina, lipoxigenases,  $\beta$ -amilase e a 7S globulina, a fração 11S pela 11S-globulina, correspondendo respectivamente a 22%; 37% e 31% do total das proteínas da soja, sendo que a fração 15S corresponde a 11% desse total (WOLF e COWAN, 1975; *apud* HERMANSSON 1978).

A glicinina (11S) e a  $\beta$ -conglucina (7S) são os principais componentes protéicos do isolado protéico de soja (IPS). Estas proteínas possuem estruturas quaternárias complexas que facilmente sofrem reações de associação-dissociação, dependendo das condições do meio (MORI; NAKAMURA e UTSUMI, 1986).

A fração 11S (320 a 350 KDa) é formada por seis subunidades (AB) composta de cadeias polipeptídicas ácidas (A) e básicas (B) unidas por ligações dissulfeto intermoleculares. O peso molecular dos polipeptídeos básicos pode variar de 19 a 22 KDa e os polipeptídeos ácidos de 34 a 45 KDa. Os pontos isoelétricos dos polipeptídeos básicos e ácidos são: 8,0 a 8,5 e 4,2 a 4,8, respectivamente (BADLEY et al., 1975).

A fração 7S (140 a 170 KDa) é um trímero formado a partir de várias combinações das suas três subunidades,  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$  (BADLEY et al., 1975). Estas subunidades são mantidas por ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (THANH e SHIBASAKI, 1976). O peso molecular da subunidade  $\alpha$  pode variar de

57 a 76 KDa;  $\alpha'$  de 57 a 83 Kda e a  $\beta$  de 42 a 53 KDa. As subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$  têm pontos isoelétricos nos pHs 4,9; 5,2 e 5,7 a 6,0, respectivamente (ARRESE et al., 1991). A  $\beta$ -conglucina corresponde a mais de 90% da fração 7S e normalmente é encontrada na forma de dímero.

Segundo Koshiyama (1971), a fração 7S possui apenas 4 átomos de enxofre que formam duas pontes dissulfeto intramoleculares e as pontes dissulfeto parecem não fazer parte das ligações entre as subunidades. De acordo com Staswick; Hermodson e Nielsen, (1984), a fração 11S contém 48 átomos de enxofre e cada polipeptídeo ácido está ligado a um polipeptídeo básico por ligação dissulfeto exceto para o polipeptídeo ácido A<sub>4</sub>. As frações podem formar ligações dissulfeto intermoleculares, diminuindo a flexibilidade, causando insolubilidade, turbidez e o aumento da viscosidade.

### **2.1.2 Proteínas do soro de leite**

As proteínas do soro correspondem a 20% do total de proteínas do leite. As principais proteínas do soro são:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), proteose-peptona, imunoglobulinas e albumina de soro bovino (BSA). As três frações protéicas  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg e BSA, ocorrem naturalmente no soro como proteínas globulares organizadas em uma estrutura tridimensional compacta, na qual cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos reativos estão localizados no interior da proteína, ficando a maior parte das cadeias laterais polares voltadas para a região externa. A estrutura é mantida por ligações não covalentes fracas e no caso da  $\beta$ -Lg, por poucas ligações dissulfídicas (KINSELLA e WHITEHEAD, 1989).

A proteína presente em maior concentração no soro do leite é a  $\beta$ -Lg (7 a 12% das proteínas totais do leite), que em pH entre 5,0 e 7,0, existe como um dímero de 376.700 Da devido as interações que ocorrem entre a Asparagina 130 e a Glutamina 134 de um monômero, com os resíduos lisil Lisina 135, Lisina 138 e Lisina 141 do outro monômero, resultando em um seguimento  $\alpha$ -helicoidal estável. Acima do pH 6,5, os dímeros dissociam devido à repulsão eletrostática. Em pH de 4,0 a 5,0 e também acima de 8,0, os dímeros se associam em octâmeros

especialmente quando a temperatura é reduzida para 2°C (HOWELL, 1995). O mecanismo molecular de desnaturação térmica da  $\beta$ -Lg em pH neutro inclui dissociação dos dímeros, perda da estabilidade da hélice em aproximadamente 65°C e agregação por ligação dissulfeto, transição para um estado fundido tipo glóbulo em aproximadamente 77°C (HOLT, 2000).

A segunda fração mais importante das proteínas do soro (2 a 5% das proteínas totais do leite) é a  $\alpha$ -La que é uma proteína globular compacta, com peso molecular em torno de 14 KDa, com uma seqüência de 123 resíduos de aminoácidos (EIGEL et al., 1984). É estável na faixa de pH entre 5,4 e 9,0, contém 4 ligações dissulfídicas intramoleculares e não apresenta grupos sulfidrilas. Seu ponto isoelétrico é aproximadamente 4,8 e não se trata de uma albumina verdadeira (FOX, 1989). A  $\alpha$ -La é uma metaloproteína que liga  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , com capacidade para ligar um mol de cálcio iônico por mol de proteína (BRAMAUD; AIMAR e DAUFIN, 1995). A remoção do cálcio da  $\alpha$ -La pelo ajuste do pH a 3,8 ou pela adição de um agente seqüestrante como EDTA, ácido cítrico ou citrato de sódio resulta na redução da estabilidade térmica quando comparada à proteína nativa. A  $\alpha$ -La se desnatura a 65,2°C e pH 6,7 (RÜEGG; MORR e BLANC, 1977).

## **2.2 Isolado protéico de soja e de soro de leite**

O isolado protéico de soja (IPS) é um dos ingredientes protéicos mais refinados, contendo aproximadamente 90% de proteína (Nx6,25) em base seca (JOHNSON e KIKUCHI, 1988; WOLF e COWAN, 1975) e é obtido a partir da farinha desengordurada de soja.

Durante o processo de obtenção de isolado protéico de soja, podem ocorrer reações que alteram o estado inicial da proteína. Os diversos tipos de tratamentos utilizados para extração e remoção de lipídios durante a preparação da farinha desengordurada, no processo de obtenção dos isolados e concentrados protéicos de soja, podem ocasionar mudanças químicas e físicas na proteína (KINSELLA, 1979). O método de isolamento da proteína afeta tanto a porcentagem das frações

da proteína do isolado quanto a sua estrutura (LÓPEZ et al., 1992). Isolados protéicos de soja produzidos comercialmente podem apresentar características bastante diferentes das proteínas de soja nativa devido às condições de processamento, as quais podem causar desnaturação e vários níveis de agregação protéica (HERMANSSON, 1986). O grau de desnaturação protéica afeta as propriedades funcionais como a solubilidade, absorção de água, viscosidade e geleificação (ARRESE et al., 1991).

Os isolados protéicos de soro de leite (IPSL) são obtidos principalmente de dois tipos de soro, que são o soro ácido, com pH menor ou igual a 5,1 resultante da acidificação direta do leite e o soro doce, produzido através da coagulação do leite pela enzima renina, em pH igual ou superior a 5,6. Os soros ácido e doce contêm 0,7% de proteína e 0,8% de minerais e 0,8% de proteína e 0,5% de minerais respectivamente (MORR, 1989).

IPSL são encontrados com concentração de proteína de até 95%. No preparo destes produtos são utilizadas técnicas como ultrafiltração, cristalização, precipitação, osmose reversa e outros métodos de separação física para criar produtos de acordo com especificações fornecidas pelo usuário final (MODLER, 1985; USDEC, 2002).

### **2.3 Propriedades funcionais das proteínas da soja e do soro de leite**

Morr e Ha (1993) definem propriedades funcionais das proteínas como sendo as propriedades físico-químicas que influenciam a estrutura, aparência, textura, viscosidade ou a retenção de sabor do produto. As propriedades funcionais das proteínas são influenciadas por propriedades físico-químicas, hidrofílicas, interfásicas e intermoleculares e contribuem com características tecnológicas desejáveis nos produtos.

Segundo Rhee (1994), a composição, estrutura e conformação das proteínas são fatores intrínsecos que influenciam nas suas propriedades funcionais. A elucidação sistemática das propriedades físico-químicas dos componentes protéicos, assim como as condições do meio, são críticas para o entendimento dos mecanismos de funcionamento das características funcionais.

### 2.3.1 Solubilidade protéica

A solubilidade da proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre as interações proteína – proteína e proteína – solvente. Em geral, as proteínas usadas como ingredientes funcionais requerem alta solubilidade para promover boa emulsão, espuma e geleificação (DAMODARAN, 1996).

A solubilidade é influenciada pela força iônica ou concentração de sais, hidrofobicidade das proteínas, natureza do solvente e pelo pH e temperatura do meio. Interações hidrofóbicas promovem ligações proteína-proteína, resultando na diminuição da solubilidade, já interações iônicas induzem a formação de ligações proteína-água, que resultam no aumento da solubilidade. (DAMODARAN, 1996).

Segundo Vojdani (1996), para proteínas globulares e algumas albuminas, a adição de sais neutros em concentração de 0,1 a 1M diminui as interações eletrostáticas entre as moléculas protéicas, causando maior solvatação da proteína e aumento da solubilidade (“salting-in”). Em concentrações superiores a 1M, ocorre decréscimo da solubilidade protéica (“salting-out”) devido ao aumento de interações hidrofóbicas e também pela competição da proteína e dos íons salinos pela água.

Alterações na natureza e densidade de cargas na superfície das moléculas de proteína são influenciadas pelo pH. No pH isoelétrico (pI), o número de cargas positivas e negativas é igual, portanto, há uma neutralização intramolecular de cargas e as moléculas de proteína atraem-se mutuamente formando uma massa insolúvel que se precipita. À medida que o pH se torna mais ácido ou mais alcalino, há predominância de cargas positivas ou negativas, respectivamente, havendo interação mais forte das moléculas de proteína com a água e também uma maior repulsão entre moléculas de proteína, aumentando significativamente a solubilidade (SMITH e CIRCLE, 1972). As proteínas de soja têm uma solubilidade mínima em pH 4 a 4,5, região do pI, e máxima solubilidade em pHs alcalinos. As proteínas do soro do leite, devido a sua estrutura globular e hidrofílica, apresentam elevada solubilidade em todos os pHs, sendo, porém, mínima em pHs 3,5 a 4,5 e

máxima em pHs ligeiramente alcalinos, em virtude de maior repulsão eletrostática (HERMANSSON, 1973).

A temperatura aumenta a solubilidade das proteínas, porém, o aquecimento a temperaturas superiores a 50 °C pode provocar desnaturação térmica. A desnaturação da molécula da proteína possibilita o contato de grupos hidrofóbicos com o solvente, ocasionando diminuição de solubilidade (KARLESKIND et al., 1996).

A água é um ótimo solvente para um grande número de proteínas e outros hidrocolóides. Isto se deve a sua elevada constante dielétrica (ao redor de 80) que age no sentido de diminuir a força eletrostática de atração entre partículas com cargas opostas. Quando se substitui o solvente água por um solvente orgânico de menor constante dielétrica, a força de atração entre partículas aumenta, podendo haver insolubilização (SGARBIERI, 1998).

Morr (1992) avaliou a solubilidade protéica de três IPSL e oito concentrados protéicos de soro de leite (CPSL) comerciais com teor de proteína variando de 88,6 a 92,7% e de 72,0 a 76,6% respectivamente, encontrando valores de solubilidade em pH 7,0 iguais ou superiores a 98% para os IPSL e iguais ou superiores a 62% para os CPSL. Valores mínimos de solubilidade foram encontrados em pH 4,5 que variaram de 49,4 a 94,5%.

Lupano; Dumay e Cheftel (1992) analisaram a solubilidade de IPSL dialisados ou não, verificando que as proteínas do IPSL são 87% solúveis em pH 8,0 e 92 a 97% solúveis em água destilada. Lupano (1994) verificou que a solubilidade de dispersões de IPSL em pH 2,5, pH 6,5 e pH 7,0, não aquecidas e aquecidas a 90°C por 15 a 60min foi de 85 a 100%. Para dispersões de IPSL aquecidas por 120min nas mesmas condições de pH e temperatura, a solubilidade foi de 61 a 65%. A solubilidade das proteínas do IPSL em pH 4,7 nas amostras aquecidas a 90°C por 60min foi de 50,1%.

Hermansson (1973) avaliou a solubilidade de IPS em água e encontrou valores de solubilidade iguais a 5% em pH 4,5, 88% em pH 3,5 e 90% em pH 7,0. Isolados protéicos de soja, obtidos em laboratório, com pHs ajustados para 3,25 e 8,0 antes da etapa de liofilização foram, respectivamente, 78 e 100% solúveis em água (PUPPO; LUPANO e AÑÓN, 1995) .

### 2.3.2 Propriedade de geleificação

A habilidade de várias proteínas em formar diferentes estruturas de géis é muito importante para a indústria alimentícia. As propriedades de textura, as características sensoriais de muitos produtos alimentícios tais como queijo, iogurte e salsicha estão diretamente relacionados com o tipo de gel formado durante a sua produção (HONGSPRABHAS e BARBUT, 1997).

O processo de geleificação por aquecimento consiste de duas etapas: um desdobração inicial das moléculas de proteína (aquecimento) seguido por um estágio de agregação (resfriamento). As proteínas são aquecidas para promover a desnaturação e interação molecular, pois nesta fase ocorre ruptura das pontes de hidrogênio, diminuição das interações eletrostáticas, enfraquecimento das interações intermoleculares, e estabilização de interações hidrofóbicas com favorecimento de associações de moléculas em uma estrutura tridimensional durante o resfriamento (PUPPO e AÑÓN, 1998; RENKEMA et. al., 2000). Se essas interações levarem à formação de uma rede tridimensional capaz de englobar moléculas de água, então ocorrerá a formação do gel. Se as interações da rede são de natureza fraca, a viscosidade poderá aumentar e permitir fluxo do fluido, ocasionando o rompimento da rede. Se interações proteína-proteína forem muito fortes, a rede se romperá e a água será expelida. Um balanço entre forças para formar a rede e forças repulsivas para prevenir o colapso da rede são necessárias para a formação do gel (MANGINO, 1992).

A geleificação envolve uma alteração no estado macroscópico da matéria, chamado de “transição” do estado de sol para gel. Do ponto de vista físico do polímero, a formação de gel se processa via transição de um estado molecular desordenado na solução para um estado mais ou menos ordenado na rede. O “gel point” (ponto de geleificação) representa o instante quando a solução torna-se um sólido viscoelástico (AGUILERA, 1995).

Na geleificação de proteínas globulares induzida pelo aquecimento, outras “transições” ocorrem na molécula que são intrínsecas às proteínas: desnaturação→desdobração→agregação (AGUILERA, 1995). O desdobração parcial da estrutura molecular expõe uma grande quantidade dos

sítios reativos para interações intermoleculares e agregação das moléculas desdobradas. A agregação se realiza por uma seqüência de reações de desdobração (unimolecular) e a associação bimolecular para produzir uma estrutura polimérica ordenada. Numa etapa posterior ocorre a formação de uma estrutura linear (fios) dos agregados (SCHMIDT, 1981).

Para proteínas globulares, geralmente dois tipos diferentes de rede podem ser formados: rede de fios finos e rede grosseira (particulada), embora estruturas intermediárias também têm sido observadas (TOMBS, 1974). Em redes de fios finos, as proteínas estão conectadas umas as outras como em colar de pérolas. Esse tipo de gel é geralmente transparente, indicando que os agregados protéicos no gel são menores que 50nm. Géis de rede grosseira são opacos, esbranquiçados e são formados por agregação ao acaso das proteínas. A maior parte dos géis de proteínas globulares adquire ambas as formas de rede dependendo de condições de geleificação como: concentração de proteína, pH, força iônica, temperatura, tempo de aquecimento e outros. (HERMANSSON, 1986).

A concentração de proteína é um fator importante na determinação do tipo de gel e nas suas características finais, principalmente em relação à textura, sendo que a dureza do gel aumenta com o aumento da concentração protéica devido à formação de um número maior de ligações cruzadas. Interações protéicas intermoleculares ocorrem mais rapidamente em concentrações protéicas elevadas, dada a maior probabilidade de contatos intermoleculares (PHILLIPS; WHITEHEAD e KINSELLA, 1994). Géis irreversíveis se formam com concentração de proteína superior a 12% para IPSL (HONGSPRABASHAS e BARBUT, 1997). Comfort e Howell (2002) obtiveram géis de IPS e de IPSL comerciais, pH 7,0, com concentrações mínimas de proteína de 14 a 15% para o IPS e 13% para o IPSL.

A temperatura tem influência marcante no processo de geleificação e nas características do gel. Para proteínas globulares, a faixa de temperatura ótima para geleificação é definida pela sua temperatura de desnaturação. Aquecimento excessivo em temperaturas superiores a 100°C freqüentemente causa quebra das ligações peptídicas primárias em proteínas, inibindo a formação da rede do gel (DAMODARAN, 1994). A temperatura para formação de gel deve ser selecionada

de tal maneira que haja um balanço entre a velocidade de desdobramento da proteína e a agregação. Se a velocidade de agregação é grande, um precipitado irá se formar sem a imobilização da água (HERMANSSON, 1979). A desnaturação das proteínas do soro do leite ocorre na faixa de temperatura entre 60 e 80°C e sua geleificação normalmente é observada acima de 70°C (MYERS, 1990).

Segundo Howell e Lawrie (1984), interações sinérgicas entre proteínas globulares compatíveis (plasma e albumina do ovo) podem ocorrer dependendo do grau de desdobramento das proteínas individuais na mistura e da exposição de grupamentos específicos e conseqüente interação entre eles. Ngarize et. al. (2004) observaram que ligações dissulfeto contribuíram para a formação de géis fortes e irreversíveis na geleificação induzida por aquecimento do sistema misto de albumina do ovo e proteínas do soro de leite. Adicionalmente, o aumento da estrutura  $\beta$ -pregueada favoreceu as pontes de hidrogênio requeridas para aumentar a polimerização de ambas as proteínas no resfriamento. Os autores verificaram também que a exposição de grupamentos hidrofóbicos no aquecimento contribuiu para a estabilidade da rede.

Comfort e Howell (2002) verificaram que o módulo elástico ( $G' \sim 160$  Pa) de uma dispersão protéica de IPS comercial foi maior que o módulo viscoso ( $G'' \sim 39,5$  Pa) mesmo antes do aquecimento da dispersão, indicando haver interação entre as proteínas devido à desnaturação ocorrida no processo de obtenção do isolado. A carga líquida das moléculas de proteína é responsável pela manifestação de forças atrativas e repulsivas e por conseqüência, as interações entre as moléculas de proteína e solvente. Para proteínas da soja, a formação de gel coincide com a desnaturação pelo aquecimento da  $\beta$ -conglucina (7S) em pH 3,8 e 5,2, porém, em pH 7,6, a formação do gel começa simultaneamente com a desnaturação da glicina (11S). As maiores temperaturas de desnaturação da glicina são observadas em pH 5,2 e força iônica de 0,2M (RENKEMA et. al., 2000).

Renkema et. al. (2000) verificaram que ao aquecer dispersões de glicina e de IPS com pH 3,8, a 98°C/30 minutos e a 95°C/30 minutos, respectivamente, toda a proteína dispersa em água era incorporada à rede do gel. Quando o pH das dispersões era 7,6, apenas 50% das proteínas dispersas eram incorporadas ao

gel após o aquecimento, as demais permaneceram solúveis. Comfort e Howell (2002) verificaram porém que a interação entre as proteínas de uma dispersão protéica com IPS, 14% de proteína, pH 7,0, ocorre principalmente no resfriamento, etapa posterior ao aquecimento.

A composição protéica num sistema misto também é um fator importante a ser considerado. A temperatura de desnaturação da glicinina pura, 88°C, aumenta para 92°C quando a glicinina está misturada às demais proteínas da soja no IPS (RENKEMA et. al., 2000). As principais proteínas do soro de leite possuem composição em aminoácidos, estruturas e propriedades diferentes, e o comportamento funcional de uma proteína individual pode ser alterado pela presença da outra. Há evidências de interações sinérgicas entre a  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg, pois tem sido mostrado que a adição de  $\alpha$ -La ou BSA em soluções de  $\beta$ -Lg melhora a força dos géis formados durante o aquecimento e a agregação da  $\alpha$ -La é dependente da presença da BSA e/ou  $\beta$ -Lg, devido à falta de grupos tiol na  $\alpha$ -La (BOYE e ALLI, 2000; DALGLEISH; SENARATNE e FRANCOIS, 1997; MATSUDOMI et al. 1993).

Ao acompanhar o processo de geleificação da dispersão protéica mista IPS:IPSL (1:1) com 18% de proteína quando submetida ao aquecimento, Comfort e Howell (2002) observaram que a temperatura de desnaturação da  $\beta$ -Lg é o principal determinante da temperatura de geleificação do sistema misto, com rápida formação de gel a 90°C. O subsequente resfriamento do gel de 90°C para 20°C resultou em um segundo aumento no módulo elástico ( $G'$ ), provavelmente devido à presença das proteínas da soja que são responsáveis pelo aumento mais significativo do módulo elástico no resfriamento do que no aquecimento.

Ainda considerando a influência da composição protéica em dispersões mistas, Chronakis e Kasapis (1993) e Comfort e Howell (2002) observaram que existem proporções ótimas de IPS:IPSL para que ocorram interações ou separação de fase durante o aquecimento. A adição de concentrado protéico de soja às proteínas do leite proporcionou agregação a frio em pH mais alto (pH 5,8) que o pH em que normalmente ocorre agregação das proteínas do leite (pH 5,3), provavelmente devido à instabilidade das proteínas de soja em pH elevado (ROESCH et. al., 2004).

Condições adversas de estocagem da soja (umidade relativa e temperatura elevadas) exercem influência sobre a qualidade do tofu, que é considerado um gel protéico. De proteínas extraídas de soja armazenadas por 2 meses a 84% UR e 30°C, foram obtidos tofu com estrutura mais grosseira e com maior dureza do que o de soja armazenada em condições moderadas, 57% UR e 20°C, ou sob refrigeração (4°C) por 18 meses. O armazenamento em condições adversas favorece a redução da velocidade de hidratação, da solubilidade protéica e da quantidade de proteína extraída; possibilitando também alterações na estrutura protéica da glicinina, com aumento na glicosilação e na estrutura helicoidal, e diminuição estrutura  $\beta$ -pregueada e hidrofobicidade superficial. O mecanismo exato de como as modificações bioquímicas que ocorrem durante a estocagem afetam concomitantemente o rendimento e a qualidade do tofu ainda não estão completamente esclarecidos (CHAN et al. 2004).

### **2.3.3 Microestrutura dos géis**

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

Renkema (2004) avaliou a relação entre textura e microestrutura de géis de IPS em soluções 0, 0,2 e 0,5 M de NaCl, nos pHs, 7,6; 3,8 e 5,2. O gel no pH 3,8 (0 M NaCl) apresentou estrutura homogênea (não particulada), alto valor para o módulo elástico (15000 a 20000 Pa) e baixa força de ruptura ( $0,28 \pm 0,01$ ) enquanto que em pH 7,6, a estrutura também era compacta (não particulada) e o módulo elástico era baixo ( $G' \sim 1000$  Pa) e força de ruptura intermediária ( $0,79 \pm 0,03$ ), portanto não se observou relação entre as propriedades reológicas e a microestrutura. Estrutura particulada (coarseness) e curvatura dos filamentos

devem ser ambos considerados para se ter uma relação direta com propriedades reológicas.

Renkema et al. (2000) verificaram que o gel de IPS no pH 7,6, era liso e levemente opaco, consistindo de agregados muito pequenos, com rede de filamentos finos e pequenos poros, enquanto que em pH 3,8, os géis desenvolveram uma estrutura grosseira, esbranquiçada, com agregados grandes, filamentos grossos e grandes poros. A cor esbranquiçada dos géis indica que as partículas formadas têm 1  $\mu\text{m}$  ou mais.

Segundo Puppo e Añón (1995), géis de IPS em pH 3,5 apresentaram-se menos transparentes, com microestrutura mais agregada e menos homogênea que em pH 2,75 ou pH 8,0. Géis ácidos de IPS (0,5 M de NaCl) foram mais opacos e desenvolveram uma estrutura mais aberta e mais frágil que géis ácidos de IPS (0 M de NaCl) (PUPPO e AÑÓN, 1998).

Géis de  $\beta$ -lactoglobulina de estrutura fina e transparente são formados na faixa de pH entre 7 e 9, enquanto géis de estrutura agregada e opaca resultam de pH próximo ao pI (DOI, 1993; HERMANSSON, 1988).

Géis de IPSL mostram-se mais translúcidos e menos granulados na presença de baixas concentrações de cálcio. Géis de IPSL produzidos com 10% de proteína e 25mM de NaCl em pH 7,0 são translúcidos e com filamentos finos. O aumento da concentração de NaCl de 25mM para 50mM nas mesmas condições de pH e temperatura produz um gel de IPSL com filamentos mais grossos e menos translúcido (BARBUT, 1995).

#### **2.3.4 Capacidade de retenção de água do gel**

A capacidade de retenção de água (CRA) de um gel refere-se à habilidade da proteína de absorver e reter água dentro da matriz protéica, contra a aplicação de força gravitacional. Esta água é a soma da água ligada, água livre e água fisicamente retida no gel (DAMODARAN, 1996). A capacidade do gel de reter água, lipídios, açúcares e outros constituintes é muito útil no desenvolvimento de novos produtos, como salsichas, produtos de panificação e sistemas geleificados,

e depende basicamente da interação da água com a proteína (PUPPO; LUPANO e AÑÓN, 1995; DAMORAN, 1996).

Puppo e Añón (1998) verificaram que géis de IPS (0 M de NaCl ou CaCl<sub>2</sub>) em pHs extremos (2,5 e 8,0), apresentam alta CRA, a qual diminuiu quando o pH se aproximou do pl. Nesses mesmos pHs, géis de IPS (0,5 M de NaCl ou 0,2 M CaCl<sub>2</sub>) tiveram estrutura mais aberta e CRA menor que a de géis obtidos na ausência desses sais.

Um perfeito balanço entre forças atrativas e repulsivas deve existir para a formação de uma matriz de gel ordenada que produz géis fortes com grande capacidade de retenção de água (MANGINO, 1992). A permeabilidade aumenta e a capacidade de reter água diminui quando a estrutura do gel é grosseira como a dos géis obtidos em pH próximo ao pl (STADING e HERMENSSON, 1991).

Géis mistos de IPSL e glúten nas proporções 10:0%; 10:5% e 10:10% (p/p), obtidos em pH 3,75, apresentaram maior CRA que os géis preparados em pH 4,2. A adição de glúten aumentou a CRA dos géis, alcançando valores maiores que 90% em todos os casos. Esse resultado era esperado, pois 1/3 dos resíduos dos aminoácidos das proteínas do glúten é glutamina, o que explica a habilidade dessas proteínas para formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água (LUPANO, 2000).

Géis de IPSL, com 10% de proteína, têm o tamanho dos poros reduzido e a CRA significativamente ( $p \leq 0,05$ ) aumentada de 88,6% para 94,7%, quando a concentração de sódio é elevada de 25 mM para 50 mM. Porém, o aumento da concentração de sódio para 200 mM reduz em 30% a CRA do gel. A CRA do gel de IPSL na presença de 25 mM de CaCl<sub>2</sub>, nas mesmas condições, é diminuída na mesma proporção que a CRA de um gel com 500 mM de NaCl (BARBUT, 1995).

#### 2.3.4 Textura

As propriedades de textura correspondem às características físicas dos elementos estruturais que compõem o alimento, podendo ser medidas tanto pelo tato, como através de testes objetivos, relacionados à deformação por uma força, expressos em função de massa, tempo e distância (BOURNE, 1982). A textura também é definida como a manifestação sensorial da estrutura dos alimentos e da maneira em que essa estrutura reage à aplicação de forças, desencadeando sensações específicas através da visão, audição e sensações resultantes do estímulo de nervos sensoriais em músculos, tendões e juntas (SZCZESNIAK, 1990).

As várias tentativas para definir textura de alimentos culminaram no desenvolvimento da padronização internacional ISO 5492 (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1992), que trata do vocabulário usado para avaliação sensorial. Esta define textura como “todos os atributos mecânicos, geométricos e de superfície de um produto perceptíveis por receptores mecânicos, táteis, visuais e auditivos” (ROSENTHAL, 1999).

A percepção de textura é um processo altamente dinâmico, pois as propriedades físicas dos alimentos mudam continuamente quando eles são manipulados. Fatores como temperatura, velocidade de movimento da mandíbula e língua, além da presença de saliva que atua como solvente e lubrificante, influenciam o comportamento reológico dos alimentos e são cruciais para a percepção de textura (ROSENTHAL, 1999). Como resultado, mesmo equipamentos, como analisadores de textura ou viscosímetros, não são capazes de reproduzir precisamente os eventos que ocorrem na boca na ingestão de alimentos e bebidas (GUINARD e MAZZUCHELLI, 1995).

Scott Blair (1958) apud Rosenthal (1999), classificou as técnicas instrumentais usadas para medir a textura de alimentos em três grupos:

1. Testes fundamentais: medem propriedades físicas bem definidas tais como viscosidade e elasticidade, relacionando a natureza do produto testado aos modelos reológicos básicos. Através dos métodos fundamentais é possível determinar uma ou mais constantes físicas que descrevem exatamente as propriedades dos alimentos em unidades bem definidas (VOISEY, 1976).
2. Testes empíricos: medem algum parâmetro físico, sob condições bem definidas e apresentam boa correlação com métodos sensoriais. Mecanismo simples e rápido, adequado para a rotina de controle de qualidade na indústria (BOURNE, 1975). Numerosos instrumentos, baseados nos princípios empíricos, podem ser classificados de acordo com o tipo de função exercida como: penetração, cisalhamento, extrusão, compressão e escoamento (BRENNAN, 1980).
3. Testes Imitativos: instrumentos tentam simular as condições que os alimentos são submetidos na boca. Dentre os instrumentos existentes estão o farinógrafo, denturômetro, consistômetro Adams e o texturômetro da General Foods (BOURNE, 1982).

O texturômetro, aparelho desenvolvido pela General Foods, simula a mastigação com a aplicação de dois ciclos de compressão sobre a amostra por um cilindro. A compressão da amostra em texturômetro gera uma curva força-tempo da qual se pode calcular diversos parâmetros de textura (FRIEDMAN; WHITNEY e SZCZESNIAK, 1963; SZCZESNIAK, 1963). A análise do perfil de textura compreende a interpretação de várias medidas sendo: três medidas de força: dureza, fraturabilidade e gomosidade; duas de trabalho: adesividade e mastigabilidade; uma de distância, a elasticidade e uma de proporção, a coesividade (BOURNE, 1968).

Os parâmetros de textura foram apresentados por van Vliet (1991) como:

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

A análise do perfil de textura tem sido muito utilizada na caracterização de géis protéicos. Hongsprabhas e Barbut (1998) investigaram o efeito combinado de  $\text{CaCl}_2$  e um agente bloqueador de sulfidrilas, como o N-etilmaleimide (NEM), nas características dos géis de IPSL utilizando a análise do perfil de textura (TPA) e verificaram que o aumento da concentração de  $\text{CaCl}_2$  de 10 para 120 mM resultou em géis que foram progressivamente mais duros, menos coesos, menos elásticos e que requeriam mais energia para desintegrar ( $p \leq 0,0001$ ), isto é, apresentaram maior gomosidade. A dureza dos géis dialisados contra concentração de  $\text{CaCl}_2 \geq 30$  mM mostrou significativa redução ( $p \leq 0,01$ ) quando 4 mM de NEM foi adicionado. A coesividade, que reflete a força das ligações internas (SZCZESNIAK, 1991), foi significativamente ( $p \leq 0,01$ ) mais baixa na presença de 2-4 mM de NEM quando comparado com géis sem a adição de NEM. A redução da dureza e da coesividade indicam um possível enfraquecimento da estrutura do gel causado pela adição de NEM. Alting et al. (2003) também demonstraram que há uma forte dependência entre a dureza (TPA) dos géis obtidos a frio e o número de grupos tiol livres presentes.

Alting et al. (2002; 2004) analisaram o perfil de textura (TPA) de géis de IPSL e de ovalbumina induzidos por ácidos, sugerido que a dureza desses géis teriam um máximo em torno do pI da proteína.

Técnicas instrumentais imitativas de determinação de textura foram também utilizadas por Matsudomi; Kanda e Moriwaki (2003) para verificar a contribuição da  $\alpha$ -caseína na propriedade de geleificação das proteínas da clara de ovo desidratada (COD). Os autores verificaram que mesmo  $\alpha$ -caseína não sendo capaz de formar gel na concentração de proteína da mistura, a sua adição (0,5-3%) a 8% de COD causou um notável aumento na dureza do gel quando comparado com o gel simples de COD com a mesma concentração total de proteína. Isto sugere que pode ter havido interação sinérgica entre essas proteínas na formação do gel. Os autores também verificaram que a adição de 5% de  $\alpha$ -caseína a 8% de COD resultou em redução da dureza do gel quando comparado com gel simples com 13% de COD, sugerindo a formação de um gel com separação de fase nessa proporção de  $\alpha$ -caseína:COD.

## 2.6 Géis mistos

Nos últimos anos, o comportamento de géis mistos tem atraído a atenção de um número crescente de pesquisadores devido à expectativa de comportamento mais flexível de suas propriedades mecânicas e estruturais quando comparada às dos géis simples (TURGEON e OULD ELEYA., 2000).

As interações proteína-proteína podem levar a três principais fenômenos (HOWELL, 1995):

(a) **Interações sinérgicas**, que resultam em um efeito que é maior que aqueles produzidos por cada isolado protéico separadamente, com formação de géis compatíveis e espumas estáveis, como verificado por Howell e Lawrie (1983, 1987), ao estudar a propriedade de geleificação da mistura albumina do ovo e proteínas do plasma no pH 8,0, a 73°C e 6% de proteína, misturadas nas proporções: 4:2, 3:3, 2:4.

(b) **Precipitação** por ocorrer predominantemente interações eletrostáticas intermoleculares. Howell; Yeboah e Lewis (1995) verificaram precipitação imediata, ao misturar lisozima (5%), uma proteína carregada positivamente, com proteínas do soro do leite (5%), uma proteína carregada negativamente, em água a temperatura ambiente;

(c) **Separação de fases**, como verificado por Howell (1995), ao examinar a propriedade de geleificação da mistura do IPS comercial e IPSL em 2% de NaCl, a 80 ou 90°C por 30min. As proteínas separadamente formaram gel a 10%. Ambas as misturas de 9% de IPS com 1% de IPSL e 8% de IPS com 2% de IPSL formaram géis de fase única. Aumento adicional na concentração do IPSL, resultou em separação de fases e a formação de três camadas, sendo a camada do topo e a da base formadas por proteínas de soja e a camada intermediária formada predominantemente por proteínas de soro de leite. Com o objetivo de verificar se os grandes agregados de IPS estão envolvidos na separação de fase, os pesquisadores também estudaram misturas da fração solúvel em água do IPS com o IPSL nas proporções 8:2, 6:4, e 2:8. Géis de fase única foram formados e interações sinérgicas foram observadas para todas as combinações da mistura protéica IPS-IPSL, quando comparados aos géis 10% formados por cada proteína isolada.

Chronakis e Kasapis (1993) estudaram as propriedades reológicas dos géis mistos de IPS : IPSL, usando uma quantidade fixa de IPSL (10% p/p) e um gradiente de concentrações de IPS (6-16% p/p). A comparação do perfil de dissolução dos sistemas protéicos mistos com o das proteínas individuais, indicou inversão de fase, do sistema contínuo de IPSL (fase dispersa de IPS) para um sistema contínuo IPS (fase dispersa IPSL) em uma concentração de 11% ( p/p ) de IPS (proporção de aproximadamente 1:1 IPS:IPSL).

A inversão de fases descrita acima, também foi verificada por Comfort e Howell (2002) ao analisarem as propriedades reológicas por pequena e grande deformação, de géis mistos de IPS e IPSL nas proporções 17:1 a 1:17 (IPS:IPSL), concentração final de 18% de proteína (p/p) em água destilada. Os autores propuseram um mecanismo de geleificação desse sistema misto, descrito na Figura 1, em que as proteínas do soro de leite quando em baixa concentração (Figura 1 a, b) estiveram concentradas na estrutura contínua de IPS. A redução na

concentração do IPS e o conseqüente aumento na concentração de IPSL fez com que o IPSL não permanecesse retido na estrutura de IPS (Figura 1 c). Aumento adicional do IPSL (IPS: IPSL 1:5) foi acompanhado por inversão de fases desse sistema, onde as proteínas do soro de leite tornaram-se uma fase contínua e o IPS a fase dispersa (Figura 1 d).

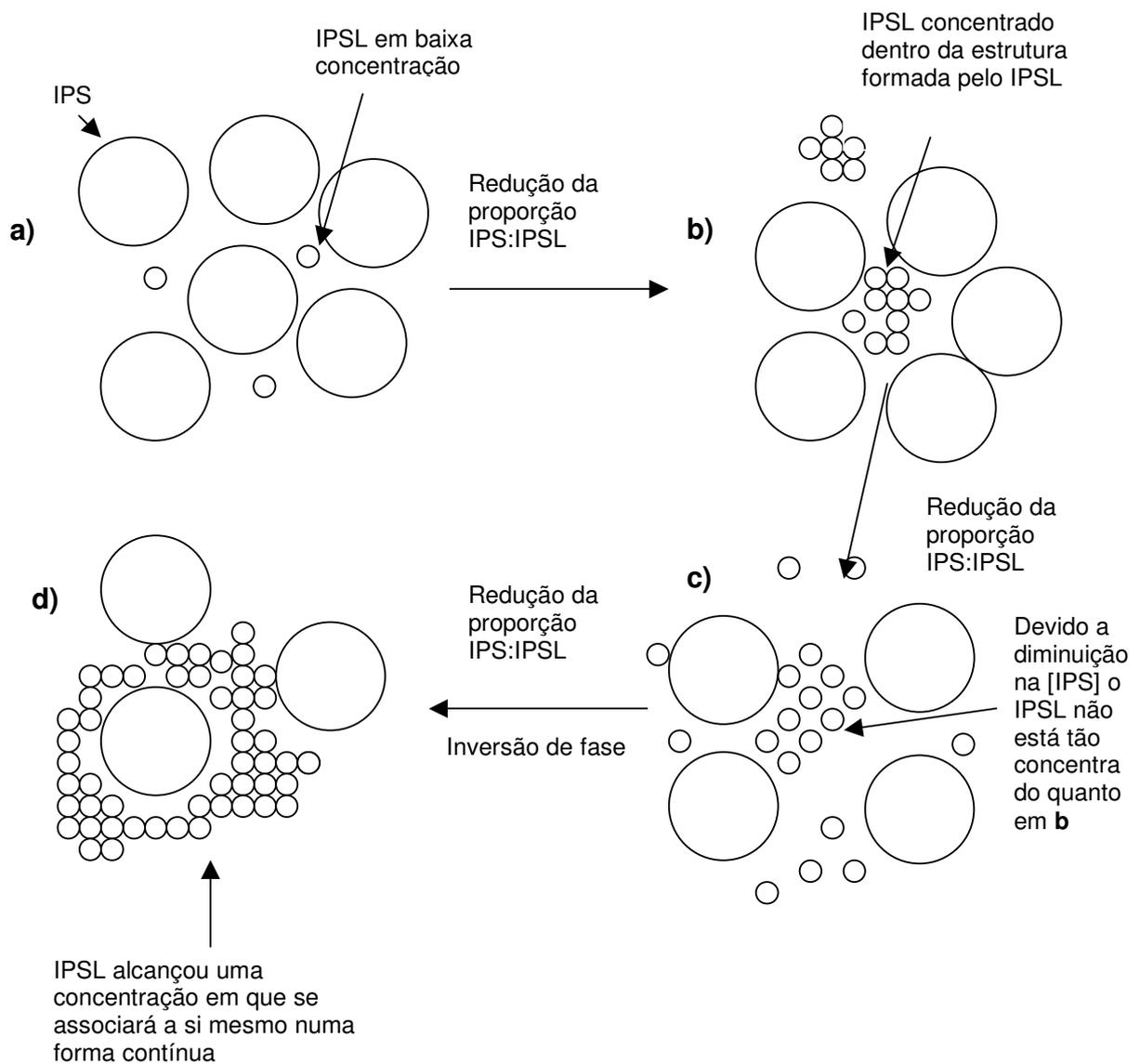


Figura 1. Diagrama do mecanismo de geleificação da mistura IPS:IPSL, proposto por Comfort e Howell (2002)

Buscando viabilizar a obtenção de géis protéicos numa faixa de pH mais ampla, Lupano (2000) estudou as propriedades de géis mistos de concentrado protéico de soro de leite e glúten em condições ácidas, pH 3,7 e 4,2. Com o mesmo objetivo, Aguilera e Kinsella (1991) estudaram as propriedades de géis mistos de caseína e IPSL nos pHs de 4 a 6,3. Nos dois estudos, os autores observaram que os géis mistos apresentaram maior firmeza, elasticidade e maior CRA que os géis simples produzidos nas mesmas condições.

As proteínas da soja e do soro de leite necessitam de temperaturas maiores que as proteínas do músculo (PM) para que ocorram mudanças estruturais necessárias para uma melhor interação intermolecular. (McCORD; SMYTH e O'NEIL, 1998). Com o objetivo de melhorar a propriedade de geleificação de sistemas mistos PM e CPSL; PM e IPS, Liu; Xiong e Butterfield (2000) submetem estas proteínas a condições oxidativas, pois tem sido mostrado que a oxidação induz mudanças nas proteínas tais como desdobramento da estrutura protéica (LI e KING, 1996). A oxidação não induziu a esperada maior interação protéica no sistema PM e CPSL, pois o valor da elasticidade foi 43% menor que a do mesmo sistema não oxidado. Com a oxidação das proteínas do sistema misto PM e IPS, foi verificado um aumento de 33% na elasticidade no fim do aquecimento.

Drake et al. (2000) avaliaram o efeito da fortificação de iogurtes com proteína de soja nas suas propriedades sensoriais, química e microbiológica. Através de medida instrumental de viscosidade e sensorial de consistência, aroma e sabor, verificaram aumento de todos os atributos testados ( $p \leq 0,05$ ) com a adição de soja. Iogurtes com 1 a 2,5% de proteína de soja foram similares ao iogurte controle. Diferença no sabor do iogurte foi percebida com a adição de 5% de soja.

Roesch et. al. (2004) verificaram que a microestrutura e as propriedades viscoelásticas de géis protéicos ácidos podem ser modificadas pela alteração da proporção de leite desnatado : concentrado protéico de soja. A presença da proteína de soja afetou a estrutura dos géis, formando uma estrutura mais grosseira. Maiores valores de elasticidade foram obtidos com adição de soja, comparando-se aos géis simples de proteínas do leite. Géis contendo grande quantidade de soja mostraram grandes poros.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

O isolado protéico de soja utilizado foi Samprosoy HI 90 (lote 174041) gentilmente fornecido pela BUNGE do Brasil S/A (Esteio, RS, Brasil), e o isolado protéico de soro de leite, foi BiPRO (lote JE 109-2-420), cedido pela Davisco Foods International, inc. (Le Sueur, MN, USA).

Os demais reagentes foram de grau analítico (p.a) de várias procedências.

Os equipamentos usados foram específicos para cada método.

### **3.2 Métodos**

#### **3.2.1 Caracterização dos Isolados Protéicos de Soja e de Soro de Leite**

##### **3.2.1.1 Determinação da composição centesimal**

A proteína nos isolados protéicos foi determinada pelo método semi-micro Kjeldahl (A.O.A.C, 1990). O teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25 e 6,38, para a conversão de nitrogênio em proteína de soja e proteína de soro de leite, respectivamente.

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico em estufa a 105°C e cinzas por incineração em mufla, a 550°C, ambas até peso constante (A.O.A.C, 1990).

A análise de lipídios para o IPSL foi realizada segundo o método de MOJONNIER (A.O.A.C., 1990) e para o IPS, segundo o método de BLIGH e DYER (1959). As determinações foram realizadas em triplicata.

### **3.2.1.2 Determinação de cálcio e sódio**

A concentração de cálcio e sódio nos isolados protéicos foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica. As amostras foram calcinadas a 550°C / 5h e digeridas com HCl, 1:1. Após a diluição das amostras em solução 5% (p/v) de lantâneo, efetuou-se a leitura no espectrofotômetro Varian - AA1475 (Mulgrave, Australia), utilizando curva padrão dos metais requeridos (A.O.A.C.,1990).

### **3.2.1.3 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Os isolados protéicos (IPS e IPSL) foram dispersos em água destilada (20% p/v) e alíquotas de 10-15mL foram colocadas em cápsulas de alumínio e hermeticamente seladas. Uma cápsula vazia foi usada como referência. As amostras foram aquecidas de 25 a 100°C na velocidade de 10°C / minuto. A entalpia ( $\Delta H$ ) e a temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) foram determinadas através do programa computacional do differential scanning calorimeter DSC 2920 Modulated DSC (TA Instruments, New Castle, USA). Após a corrida, as cápsulas foram perfuradas e colocadas em estufa a 105°C para secagem e determinação da massa de proteína em base seca.

### **3.2.1.4 Determinação de grupos sulfidrila livres (SHF)**

Grupos sulfidril (SH) foram determinados usando reagente de Ellman (5,5'-ditiobis – ácido 2-nitrobenzóico), de acordo com Beveridge; Toma e Nakai (1974), com modificações propostas por Hardham (1981). Aproximadamente 10mg de amostra, IPS ou IPSL, foram solubilizadas em 5mL de tampão 0,086M Tris – 0,09M glicina-0,004 M EDTA (pH 8) contendo 8M de uréia. Para uma alíquota de 3mL de amostra, foi adicionado 0,03 mL do reagente de Ellman (4mg/mL). A absorbância foi lida em 412nm, 10min após a adição e mistura do reagente à amostra. As determinações foram feitas em triplicata.

### **3.2.1.5 Solubilidade Protéica dos IPS e IPSL**

A solubilidade protéica foi analisada em água e em solução 0,1 M de NaCl, em pH 3,5; 4,5; 6 e 7, de acordo com o método descrito por Morr et al. (1985). O conteúdo de proteína solúvel foi determinado pelo método semi-micro-Kjeldhal (A. O. A. C., 1990).

### **3.2.2 Efeito do pH, temperatura, concentração de proteína e proporção entre os isolados protéicos na obtenção de géis simples e mistos de IPS e de IPSL**

Foram estudadas as características de geleificação do IPS e do IPSL, em sistemas simples e mistos, testando-se inicialmente concentrações entre 8 e 14% (p/p) de proteína em pH 3,5 e 7. Dispersões, de cada um dos isolados, foram preparadas e misturadas nas proporções: 100:0; 80:20; 60:40; 40:60; 80:20 e 0:100, mantendo-se a concentração de proteína igual a da dispersão simples. O pH foi ajustado com HCl ou NaOH 1N e alíquotas de 10g das dispersões foram transferidas para tubos de vidro de formato cilíndrico, de 20mm de diâmetro e 60mm de altura que foram aquecidos em banho Maria a 80°C/30min ou 95°C/30 min. A seguir, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 min. As dispersões protéicas foram mantidas a 9°C/20h e então removidas dos tubos e analisadas visualmente quanto à formação ou não de gel e quanto à firmeza e sinerese do gel formado.

### 3.2.3 Análise dos géis

Os géis simples e mistos obtidos com 14% (p/p) de proteína, 95°C/30min. e pHs 3,5 e 7, foram analisados quanto a capacidade de retenção de água, microestrutura, perfil de textura, solubilidade em diferentes tampões e perfil eletroforético das diferentes frações solúveis obtidas.

#### 3.2.3.1 Microestrutura

Para observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), os géis de IPS:IPSL foram preparados como descrito em 3.2.2. As amostras foram cortadas (1 x 2 x 5.0mm) e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M com ácido tânico 1%, pH 7,2. Após 90 minutos, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio (0.1M pH 7.2) por 2 vezes, 15 minutos cada. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, à 4°C (geladeira)/120min., seguida por duas lavagens em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, 15min. cada lavagem. O processo de desidratação das amostras foi iniciado por lavagem em serie etanólica (30, 50, 70, 95%, 20 minutos cada e 100% por 3 vezes de 10 minutos) e finalizado em *Critical Point Dehydration* (CPD) 030 marca Balzers. As amostras secas foram fraturadas e os fragmentos foram fixados nos stubs com carbono e esmalte sob o calor de a uma placa de aquecimento por 10 min. A metalização das amostras foi realizada com ouro (200seg/40mA) no aparelho SCD 050 marca Balzers e realizou-se a observação ao MEV (JEOL JSM – 5880LV - Japan).

### 3.2.3.2 Capacidade de retenção de água

Foi determinada segundo método proposto por Jauregui; Regenstein e Barker (1981), com as modificações descritas por Beuschel *et al.* (1992). Amostras dos géis (~1g) foram pesadas em papel de filtro Whatman nº2 e centrifugadas a 746g/10min. a 6°C em centrífuga SORVAL (Wilmington, Delaware, USA). A umidade retirada do gel foi calculada pela diferença de peso entre o papel de filtro seco e úmido. A porcentagem de capacidade de retenção de água dos géis foi calculada pela relação:

% capacidade de retenção de água = 100 – (% de umidade retirada por centrifugação)

As análises foram feitas em triplicata e 3 géis de cada experimento foram avaliados.

### 3.2.3.3 Perfil de Textura

A análise do perfil de textura dos géis foi realizada segundo método descrito por Ju e Kilara (1998), em texturômetro modelo TA XT-2 (Stable Microsystems SMS, Surrey, UK). Os parâmetros avaliados foram: dureza, elasticidade e coesividade. Amostras à temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ), com 2,0cm de diâmetro e 1,0cm de altura foram comprimidos por um probe cilíndrico acrílico com 5cm de diâmetro, lubrificado com silicone. Utilizou-se força de compressão de 5g e 50% de compressão, velocidade pré-teste de 3 mm/s, velocidade no teste e pós-teste de 1mm/s. Foram analisados cinco géis de cada condição estudada e a análise de cada um desses cinco géis foi feita em duplicata.

### 3.2.3.4 Solubilidade do gel

Amostras dos géis (1g) com 14% de proteína (p/p), foram dispersas em 10 mL de: (A) tampão 0,086 M Tris/0,09 M glicina/4 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0), (B): solvente (A) contendo também 6 M de uréia e 0,5% de dodecil sulfato de sódio e (C): solvente (B) contendo 10mM de ditioeritritol (SHIMADA e CHEFTEL, 1988).

As amostras foram homogeneizadas com um homogeneizador (Ultra Turrax 250), 10.000 rpm e temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) por 2 minutos e centrifugadas a 35700g por 15 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$  em centrífuga Sorval. Os sobrenadantes foram filtrados em papel de filtro comum e deles foram retiradas alíquotas de 1mL, às quais acrescentou-se 9 mL de cada um dos tampões A, B, e C. Para determinação da concentração protéica nas dispersões obtidas, utilizou-se o método de Bradford (Bradford, 1976). Para construção da curva padrão foram lidas as absorbâncias a 595 nm das dispersões proteínas de IPS, IPSL, com valores de teor protéico obtidos pelo método semi-micro Kjeldhal (A.O.A.C 1990) e da BSA (A-4503, Sigma, USA). Como a curva de solubilidade da BSA apresentou inclinação diferente das obtidas para o IPS e o IPSL, optou-se por utilizar o IPS como proteína padrão (Figura 2). As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro UV / VI, modelo BECKMAN DU – 70 (Fullerton, USA). As análises foram feitas em triplicata.

Dos sobrenadantes (14mg/mL) obtidos da solubilização dos géis em A e em B também foram retiradas alíquotas de 0,5mL para posterior determinação do perfil eletroforético das proteínas solúveis.

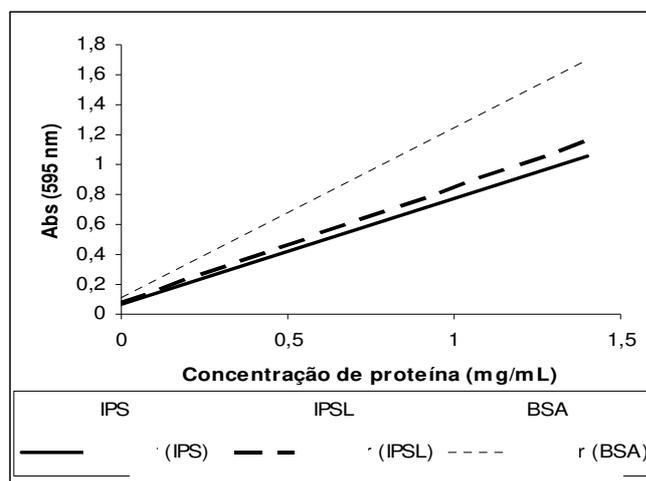


Figura 2 – Curvas de calibração dos isolados protéicos de soja e de soro de leite e da BSA – determinação pelo método de Bradford

### **3.2.3.5 Perfil eletroforético das proteínas solúveis**

Às alíquotas de 0,5mL dos sobrenadantes (14mg de proteína/mL) obtidos para a análise de solubilidade do gel nos tampões A e B, foram acrescentados igual volume de tampão D: 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol. Para comparação do perfil eletroforético das proteínas presentes nessas dispersões com o perfil das proteínas totais, dispersões aquosas com 0,5% de proteínas totais de IPS, IPSL ou das misturas de IPS:IPSL nas diferentes proporções estudadas, foram preparadas no mesmo tampão D e aquecidas a 90°C por 5min. e depois resfriadas.

Alíquotas de 6 $\mu$ L foram aplicados ao gel. A eletroforese foi realizada em sistema tampão de SDS-Tris-Glicina. A concentração do gel de empilhamento foi de 4% de acrilamida e do gel de separação de 12% de acrilamida. Os pesos moleculares das proteínas foram determinados utilizando-se o padrão da Pharmacia Biotech Inc (USA) de baixo peso molecular: fosforilase b (94 KDa); albumina bovina (67 KDa); ovalbumina (43 KDa); anidrase carbônica (30 KDa); inibidor de tripsina (20 KDa); e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 KDa). Os géis foram mantidos por 12h em solução aquosa de Coomassie Blue R 250 0,1%, em 40% de metanol e 10% de ácido acético; descorados em solução aquosa 40% de metanol e 10% de ácido acético. A densitometria dos géis foi realizada em densitômetro Sharp JX 330, com o uso do software Image Master (Pharmacia - Sweden). A análise do perfil eletroforético das proteínas solúveis foi realizada de acordo com o procedimento descrito por LAEMMLI (1970).

### **3.2.4.6 Análise estatística**

As médias foram comparadas por análise de variância e quando diferentes, pelo teste de Tukey (COCKRAN e COX, 1957). Utilizou-se o programa STATISTICA para Windows, versão 5.0 (StaSoft, Inc.).

## **4 RESULTADOS e DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização dos isolados protéicos de soja (IPS) e de soro de leite (IPSL)**

#### **4.1.1 Composição centesimal dos isolados protéicos de soja e de soro de leite**

A composição centesimal de isolados protéicos de soja depende, entre outros fatores, da variedade da soja, condições do meio em que é cultivada e desenvolvida e do processo de obtenção do isolado (PETRUCCELLI e AÑÓN, 1994 a). Os valores obtidos para o IPS comercial Samprosoy HI 90 (Tabela 1) são semelhantes aos encontrados na literatura (HENN e NETTO, 1998; SMITH e CIRCLE, 1972; WOLF e COWAN, 1975).

Diversos métodos de separação física utilizados na obtenção dos IPSL resultam em produtos com diferentes composições. A composição aproximada obtida para o IPSL comercial BiPRO (Tabela 1), é semelhante a encontrada por FOEGEDING et al. (2001), com 91,6% de proteína; 1,5% de cinzas; 0,75% de lipídios e também por MORR e FOEGEDING (1990): 88,6 a 92,7% para proteína; 1,37 a 2,15% de cinzas; 0,64 a 0,67% de lipídios; 2,4 a 5,57% de umidade.

A concentração de sais influencia a estrutura das proteínas, a natureza das interações proteína-água e a velocidade de desnaturação térmica (HERMANSSON 1975). O IPS e o IPSL utilizados neste trabalho apresentam baixa concentração de cálcio, 0,13 e 0,06% respectivamente, quando comparada às concentrações de cálcio de dois IPSLs analisados por MORR (1992), 0,203 e 0,242% e do IPSL avaliado por KUHN e FOEGEDING (1991 a), 0,20%.

Tabela 1- Composição centesimal aproximada dos isolados protéicos de soja (IPS) e de soro de leite (IPSL)

Componentes (%)	IPS <sup>1;4</sup>	IPSL <sup>1;4</sup>
Proteína	90,7 <sup>2</sup> ± 0,22	97,4 <sup>3</sup> ± 0,25
Umidade	3,14 ± 0,00	5,1 ± 0,00
Cinzas	3,21 ± 0,00	1,9 ± 0,00
Cálcio	0,13	0,06
Sódio	1,02	0,67
Lipídios	3,43 ± 0,05	0,6 ± 0,06

<sup>1</sup> Valores médios de 3 determinações ± desvio padrão

<sup>2</sup> N x 6,25

<sup>3</sup> N x 6,38

<sup>4</sup> Valores expressos em base seca

#### 4.1.2 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O termograma da dispersão do IPS em água destilada (Figura 3a) não apresentou nenhum pico, evidenciando que houve completa desnaturação das frações protéicas 7S e 11S durante o processo de obtenção do isolado protéico de soja.

O termograma da dispersão do IPSL em água destilada (Figura 3b) apresentou dois picos, correspondentes a  $\alpha$ -lactalbumina à  $\beta$ -lactoglobulina e o valor de entalpia de transição foi 9,98 J/g de proteína. Os valores de entalpia para o IPSL comercial obtidos por Yamul e Lupano (2003) foram ~10,5 J/g de proteína (dispersão em pH 7,0) e ~7,0 J/g de proteína (dispersões nos pHs 3,75 e 4,2).

Os valores obtidos neste trabalho podem indicar que a proteína está parcialmente desnaturada. Porém, é difícil estabelecer uma comparação direta entre os resultados obtidos com os encontrados na literatura, pela influência de outros fatores, como:

- pH: a medida que o pH aumenta a estabilidade térmica das proteínas tende a reduzir, sendo o pH em torno de 6,0 o ponto de estabilidade máxima para a  $\beta$ -Lg (PARK e LUND, 1983);
- Presença de íons: em geral a presença de íons confere um efeito protetor, aumentando a estabilidade térmica, principalmente para a  $\alpha$ -La (RELKIN; LAUNAY e EYNARD, 1993);
- Aumento da concentração protéica: que diminui a estabilidade térmica, provavelmente devido ao maior número de interações entre as moléculas durante o aquecimento (RELKIN e LAUNAY, 1990).

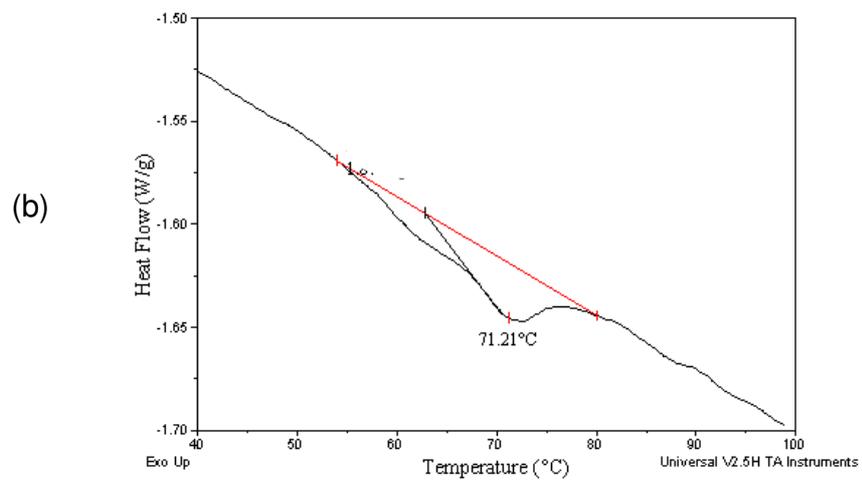
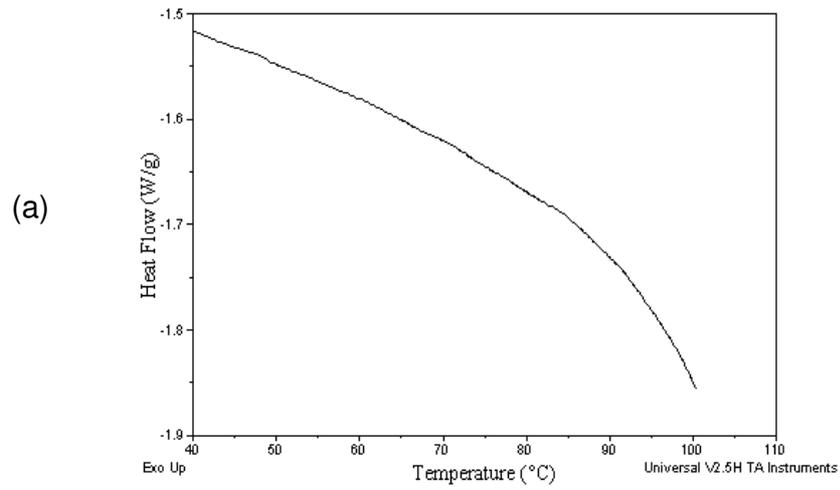


Figura 3 - Termogramas de dispersões de 20% em água destilada dos isolados protéicos de soja (a) e de soro de leite (b).

### 4.1.3 Sulfidrilas livres

Grupos sulfidrilas (SH) e pontes dissulfeto (S-S) influenciam significativamente as propriedades funcionais dos alimentos protéicos e têm um importante envolvimento na formação de estruturas relativamente rígidas tais como géis protéicos (SHIMADA e CHEFTEL, 1988). Segundo os mesmos pesquisadores, a alta elasticidade dos géis em valores de pH alcalinos e neutros pode resultar de ligações S-S intermoleculares. Já a baixa reatividade de grupos SH em pH ácido não favorece reações sulfidrilas / dissulfídicas resultando em géis de baixa elasticidade e alta solubilidade protéica.

O conteúdo de sulfidrilas livres encontrado para o IPS foi  $3,37 \pm 0,05 \mu\text{M/g}$  de proteína e para o IPSL foi  $5,51 \pm 0,04 \mu\text{M/g}$  de proteína. Estes valores foram inferiores aos relatados por LIU; XIONG e BUTTERFIELD (2000):  $10 \mu\text{M/g}$  de proteína para o IPS (nativo) e  $30 \mu\text{M/g}$  de proteína para um IPSL comercial. Possivelmente o menor conteúdo de sulfidrilas livres encontrado nesse trabalho deva-se às condições de processamento na obtenção desses isolados comerciais. Petrucelli e Añón (1994 a) verificaram que tratamentos térmicos levaram à uma diminuição do conteúdo de sulfidrilas livres dos IPSs para valores menores que  $0,8 \mu\text{mol}$  de SH/g de proteína, que antes do tratamento térmico estiveram entre 1,5 e  $1,8 \mu\text{mol}$  de SH/g de proteína.

### 4.1.4 Solubilidade Protéica

Dentre todas as propriedades funcionais, a solubilidade reveste-se de particular importância na medida em que todas as outras propriedades estão diretamente relacionadas ao desempenho desta característica (FOX, 1989). Varias propriedades físico-químicas tais como massa molecular, estrutura secundária e terciária, hidrofobicidade e distribuição de cargas, além de condições da solução como pH, temperatura, composição iônica e concentração protéica, exercem influência sobre a solubilidade da proteína (KINSELLA, 1984; MORR e HA, 1993).

Neste trabalho o perfil de solubilidade do IPS (Figura 4a), tanto em água como em solução 0,1M de NaCl, apresentou comportamento típico, com baixa

solubilidade no pH 4,5 (pI), aumentando nos pHs acima e abaixo deste valor (KINSELLA, 1979). A baixa solubilidade na região do pI ocorre devido a neutralização da carga líquida e conseqüente precipitação das proteínas (DAMODARAN,1989). O aumento da densidade de cargas da proteína em pHs afastados da região do ponto isoelétrico favorece as interações proteína-água, resultando num aumento das propriedades de hidratação (ELIZALDE; BARTHOLOMAI e PILOSOF, 1996). A solubilidade do IPS em água, nos pHs afastados da região do pI, foi três vezes maior que em solução 0,1M de NaCl, estando de acordo com o trabalho de HERMANSSON (1978); PUPPO; LUPANO e AÑÓN (1995) e SMITH e CIRCLE (1972), que relataram um efeito de *salting-out* em solução 0,1M de NaCl. Hermansson (1973) encontrou solubilidade de 5% em pH 4,5, 88% em pH 3,5 e 90% em pH 7,0, para IPS obtido em laboratório, os dois últimos valores são superiores aos encontrados nesse trabalho.

No perfil de solubilidade do IPSL (Figura 4b) observa-se solubilidade superior a 90%, exceto nos pHs próximos ao ponto isoelétrico. Alguns autores utilizam a solubilidade em pH 4,6 como um indicador da desnaturação protéica, sendo > 90% de solubilidade o padrão para isolados com altos teores de proteína nativa (LAW e LEAVER, 1999; LI-CHAN, 1983). De acordo com este conceito, os resultados de solubilidade obtidos para o IPSL indicam que o IPSL utilizado nesse trabalho está parcialmente desnaturado, corroborando os resultados obtidos para sulfidrila livre e colorimetria diferencial de varredura.

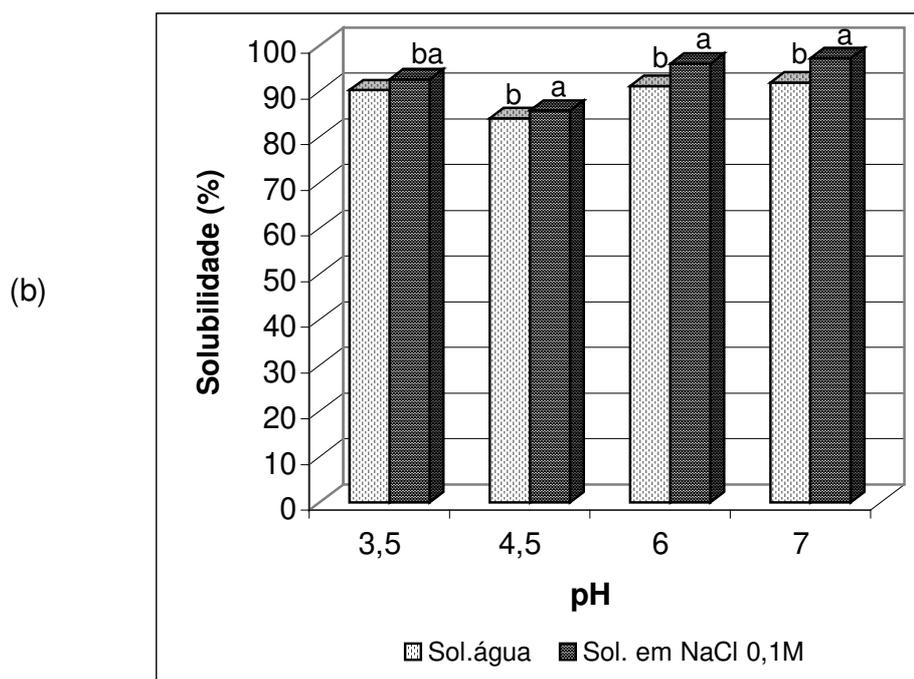
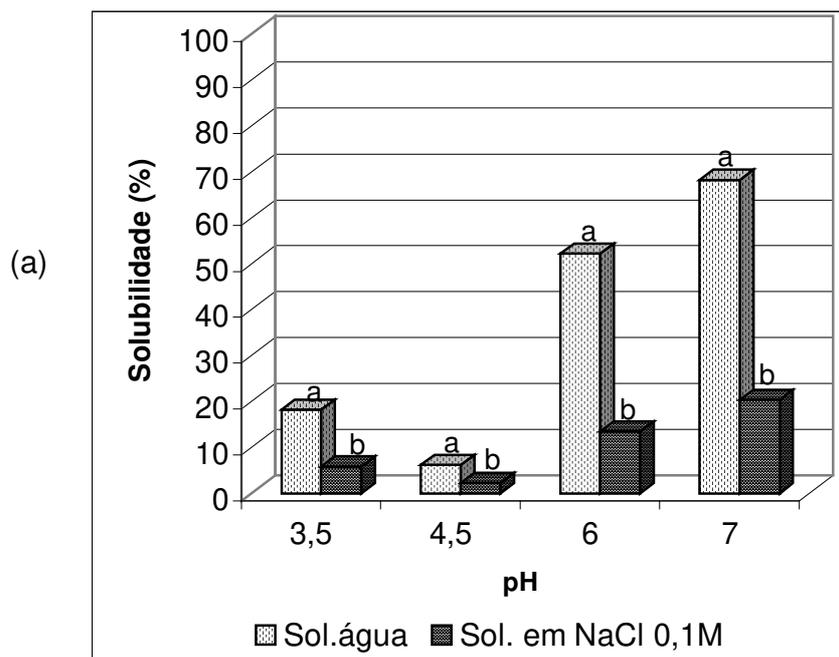


Figura 4 – Perfil de solubilidade (a) isolado protéico de soja em água e em solução de NaCl 0,1M. (b) isolados protéicos de soro de leite em água e em solução de NaCl 0,1M  
 No mesmo pH, letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os valores pelo teste de Tukey.

#### **4.1.5 Efeito do pH, temperatura, concentração de proteína e proporção entre os isolados protéicos na obtenção de géis simples e mistos de IPS e de IPSL**

A características da formação de géis de sistemas simples e mistos de IPS e IPSL, são mostradas na Figura 5.

As dispersões com 8 e 10% de proteína e pH 3,5, aquecidas a 80°C/30min. (Figura 5 a), não formaram gel em todas as proporções testadas, apenas uma dispersão viscosa. Provavelmente as interações protéicas intramoleculares, em baixas concentrações, foram insuficientes para a formação da estrutura protéica do gel (MORR e FOEGEDING 1990). A concentração de proteína é um fator importante na determinação das características finais do gel, principalmente em relação à textura, sendo que a dureza do gel aumenta com o aumento da concentração protéica devido à formação de um número maior de ligações cruzadas.

O aumento da temperatura de aquecimento das dispersões protéicas com pH 3,5 para 95°C (Figura 5c) ou o aumento da concentração de proteína para 12 e 14% mantendo a temperatura de aquecimento 80°C (Figura 5 a), proporcionou a formação de um coágulo pastoso e esbranquiçado. Quando a concentração de proteína e a temperatura foram elevadas simultaneamente para 12 e 14% e 95°C, respectivamente, os géis formados foram firmes (duros), quebradiços, esbranquiçados e com sinerese (Figura 5 C). Puppo e Añón (1998) também verificaram que para géis ácidos, o aumento da concentração protéica de géis de IPS de 10 para 14%, mudou o comportamento das dispersões aquecidas a 90°C/30min de dispersões semidiluídas para materiais que se comportavam como géis. Quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico, a carga da proteína é progressivamente neutralizada, a interação proteína-água diminui e géis de estrutura frágil são formados (LUPANO; DUMAY e CHEFTEL, 1992; LUPANO; RENZI e ROMERA, 1996; PUPPO e AÑÓN, 1998).

O tipo de gel formado em pH 3,5 não variou com a proporção de IPS e IPSL, exceto nas proporções 40:60 e 20:80 (IPS:IPSL), onde foi observada separação de fases com formação de três camadas de gel, com um topo e base

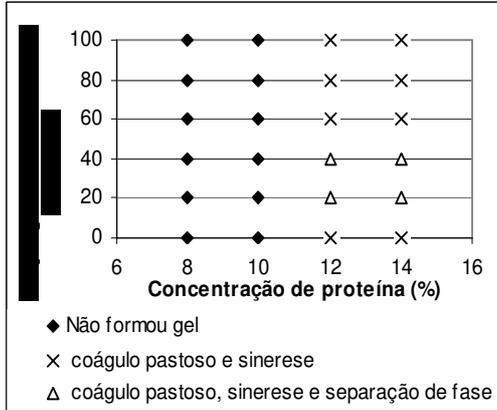
de IPS e uma camada média predominantemente de IPSL. A grande diferença na solubilidade protéica em água do IPS (18%) e do IPSL (90%), em pH 3,5, pode ter favorecido esta separação de fase. Howell (1995) também verificou que quando quantidades superiores a 20% de IPSL eram misturadas ao IPS, havia separação de fase. O autor sugeriu que os grandes agregados de IPS estavam envolvidos na separação de fases, pois géis de fase única eram formados, ao misturar as frações do IPS solúveis em água com IPSL, nas proporções de 8:2; 6:4 e 2:8. Segundo Howell (1995), a separação de fase em misturas de proteínas globulares com proteínas de alto peso molecular é devido à incompatibilidade do tamanho molecular e à configuração das proteínas e movimento físico do material denso para a base e do material leve para o topo.

O aquecimento de dispersões protéicas com 8 e 10%, pH 7,0, tanto a 80°C quanto a 95°C resultaram em soluções altamente viscosas (Figura 5 b e d). O aumento da concentração de proteína para 12 e 14% com aquecimento a 80°C proporcionou a formação de géis extremamente moles (Figura 5b), sendo que o aumento na concentração protéica para 12%, acompanhado por um aumento da temperatura para 95°C, resultou em géis que não mantiveram a forma ao serem retirados dos tubos onde foram formados (Figura 5d). A elevação da concentração de proteína para 14% com aquecimento a 95°C (Figura 5d) possibilitou a formação de géis firmes e elásticos. Interações protéicas intermoleculares ocorrem mais rapidamente em concentrações protéicas elevadas, dada a maior probabilidade de contatos intermoleculares (PHILLIPS; WHITEHEAD e KINSELLA, 1994). Além disso a temperatura tem influência marcante no processo de geleificação e nas características do gel.

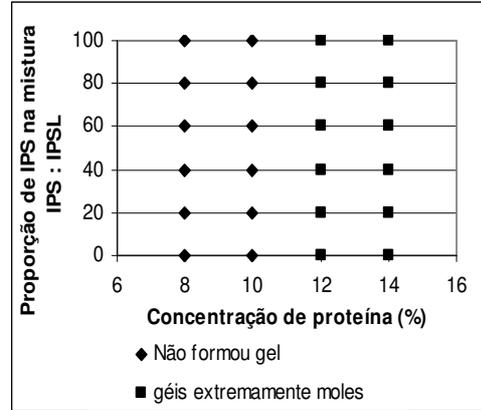
Nas condições de concentração de proteína testadas, o aquecimento a 80°C foi insuficiente para formar géis firmes, sendo verificada a 95°C, isto deve-se ao fato de que, para proteínas globulares, a faixa de temperatura ótima para geleificação é definida pela sua temperatura de desnaturação ( DAMODARAN, 1994). A temperatura de desnaturação da glicinina quando a glicinina está misturada às demais proteínas da soja no IPS é 92°C (RENKEMA et. al., 2000) e a temperatura de desnaturação da  $\beta$ -Lg é o principal determinante da temperatura de geleificação do sistema misto IPS:IPSL no pH 7,0, com rápida formação de gel

a 90°C Howell (2002). Resultados semelhantes foram observados por Schmidt; Illingwerth e Ahmed (1978 a) ao aquecer soluções de proteínas do soro de leite de 90 a 100 °C, que resultaram na formação de géis fortes, enquanto que soluções aquecidas a 80 °C resultaram na formação de géis de força média. Comfort e Howell (2002), obtiveram uma concentração mínima de geleificação de 14 a 15% para o IPS comercial e de 13% para o IPSL comercial BiPRO, a 90 °C e pH 7. As características dos géis no pH 7,0 nas mesmas condições de temperatura e concentração de proteína, não variaram com a proporção de IPS e IPSL.

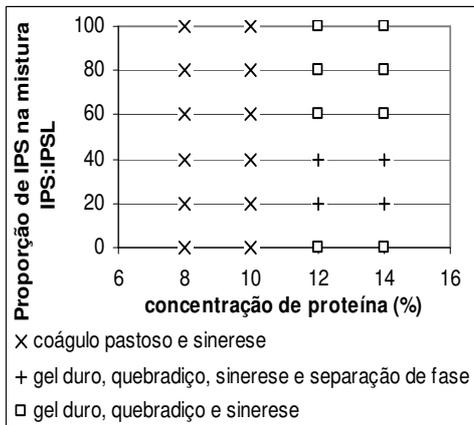
a) T 80 °C; pH 3,5



b) T 80 °C; pH 7,0



c) T 95 °C; pH 3,5



d) T 95 °C; pH 7,0

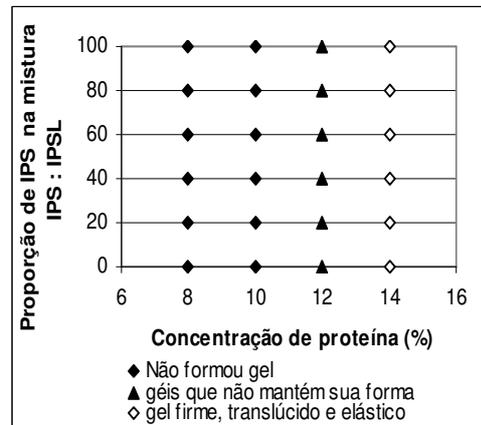


Figura 5 – Avaliação da formação de gel em diferentes condições de pH, temperatura, concentração protéica e proporção entre IPS : IPSL.

## **4.2 Análise dos géis**

Para estudo das características físico-químicas, estruturais e funcionais dos géis de IPS:IPSL foram utilizados géis com 14% de proteína, pH 3,5 e 7,0 e temperatura de aquecimento de 95°C, condições em que os géis foram firmes e capazes de auto sustentar-se.

### **4.2.1 Microestrutura, CRA e perfil de textura dos géis**

As Figuras 6 e 7 mostram, respectivamente, as microscopias eletrônicas de varredura dos géis obtidos em pH 3,5 e 7,0 e a Figura 8 mostra as propriedades de textura (dureza, elasticidade e coesividade) e a CRA dos géis.

Os géis obtidos em pH 3,5, próximo do *pI* tanto do IPS quanto do IPSL (DOI, 1993), apresentaram estrutura heterogênea e formação de aglomerados protéicos (Figura 6), semelhantes a dos géis de IPS, pH 3,8, observados por Renkema (2004) e a dos géis de concentrado protéico de soro de leite (CPS), pH 3,75, obtidos por Yamul e Lupano (2003). As estruturas variaram de altamente porosas, para géis simples de IPS (Figura 6 a, b), passando por estruturas onde se verificou redução do tamanho dos poros, com a substituição parcial de IPS por IPSL (Figura 6 c,d,e,f), à estrutura dos géis simples de IPSL, mais ordenada, mais compacta, sem os grandes poros (Figura 6 g, h).

O tipo de estrutura de rede formada é fortemente influenciado pela carga da rede protéica. Quando as forças repulsivas entre moléculas aumentam, a agregação ao acaso é suprimida e a estrutura é modificada de agregada para uma estrutura de fios finos (DOI, 1993). Tal fato foi verificado ao avaliar a microestrutura dos géis simples e mistos de IPS e IPSL obtidos em pH 7,0, que foi fina e homogênea (Figura 7) própria de géis com alta capacidade de retenção de água, dureza e elasticidade e formados em pH longe do *pI* onde as interações proteína-proteína diminuem e a repulsão eletrostática aumenta (COMFORT e HOWELL, 2002; STADING e HERMANSSON, 1991; van KLEEF, 1986; YAMUL e LUPANO, 2003).

A estrutura mais compacta dos géis mistos com pH 3,5, obtida por substituição parcial de IPS por IPSL, resultou em aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da CRA desses géis, comparada à CRA do gel simples de IPS de estrutura altamente porosa, sendo, portanto, intermediária à CRA dos géis simples de IPS e IPSL que variaram de 50% a 73% (Figura 8d). Nos géis ácidos, além da água liberada na centrifugação, houve liberação de água durante a formação da rede do gel (etapa de resfriamento), portanto, a capacidade de retenção de água desses géis é, de fato, menor que a calculada. Possivelmente a forte agregação proteína-proteína, que ocorre em pH 3,5, promoveu a contração da rede protéica fazendo com que a água fosse expelida para fora da estrutura devido à diminuição do volume. Grandes poros inibem a capacidade de imobilizar o solvente via forças capilares (ZIEGLER e FOEGEDING, 1990, apud VARDHANABHUTI, et al. 2001) e por isto os grandes poros capacitam a liberação de água. Lupano (2000) e Yamul e Lupano (2003) também verificaram que os géis de IPSL obtidos em pH próximo ao ponto isoelétrico das proteínas e de estrutura particulada têm baixa CRA.

Os géis de pH 7,0 apresentaram alta CRA, que variou de 85% para o gel de IPS a 93% para o gel de IPSL, superior à dos géis ácidos de estrutura porosa e heterogênea. Foi verificado um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na CRA do gel pH 7, com a substituição de IPS por IPSL, em relação ao gel simples de IPS, quando a proporção de IPS:IPSL foi de 20:80, sendo, no entanto, inferior a do gel simples de IPSL (Figura 8d).

Os géis mistos de pH 7,0 apresentaram valores de dureza intermediários aos dos géis simples de IPS e IPSL. Observou-se aumento da dureza com aumento da proporção de IPSL na mistura. O aumento da dureza dos géis com a adição de IPSL pode indicar a importância das ligações dissulfídicas na manutenção da rede do gel (ALTING et al., 2003; SHIMADA e CHEFTEL, 1989). A substituição de 80% do IPS por IPSL resultou em uma dureza para o sistema misto igual ( $p \leq 0,05$ ) à do gel simples de IPSL (Figura 8 a) indicando a possibilidade de ocorrer interação sinérgica entre o IPS e o IPSL quando a substituição de IPS por IPSL for maior que 80%. Comfort e Howell (2002) observaram interação sinérgica ao substituir de 1 a 2% (p/p) de IPSL por IPS, o que resultou em um aumento no módulo elástico do sistema misto, quando comparado com os géis simples de IPS e de IPSL, indicando que nessa

proporção a estrutura protéica foi mais fortemente ligada que a rede formada apenas pelo IPSL. Ao avaliar a dureza de géis mistos com 13% de proteína, Matsudomi et al. (2003) verificaram efeito sinérgico quando a clara de ovo foi substituída por 0,5 a 3% de  $\alpha$ -caseína. Porém, quando a substituição foi de 5%, houve diminuição na dureza do gel comparado ao gel simples de clara de ovo. Os géis com pH 3,5 tiveram aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na dureza (força necessária para produzir uma dada deformação) para valores intermediários aos verificados para os géis de IPS e IPSL. A mais forte interação proteína-proteína nos géis de pH 3,5 pode ter favorecido a formação de géis mais duros e com baixa CRA (MOLINA e LEDWARD, 2003).

Os géis de filamentos finos, obtidos em pH 7,0, foram altamente elásticos e não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) na elasticidade dos géis em todas as proporções testadas. A elasticidade dos géis mistos obtidos em pH 3,5, foi intermediária à do gel de IPS e de IPSL (Figura 8 b). A alta elasticidade dos géis em valores de pH alcalinos e neutros pode resultar de ligações S-S intermoleculares. Já a baixa reatividade de grupos SH em pH ácido não favorece reações sulfidrílica / dissulfídica resultando em géis de baixa elasticidade e alta solubilidade protéica (SHIMADA e CHEFTEL, 1988).

Para os géis obtidos em pH 7,0, a coesividade, que reflete a força das ligações internas (SZCZESNIAK, 1991), foi significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mais alta quando a substituição de IPS por IPSL foi maior ou igual a 40%. A menor dureza e coesividade dos géis simples de IPS (Figura 8 a, c) indicam que esses géis possuem uma estrutura mais frágil que a dos géis mistos IPS:IPSL e simples de IPSL. A substituição parcial de IPS por IPSL, nos géis obtidos em pH 3,5, não contribuiu para o aumento da coesividade dos géis (Figura 8 c). A estrutura agregada e irregular dos géis pH 3,5, pode ter proporcionado a reduzida coesividade e elasticidade desses géis. Em todas as proporções estudadas, os géis de estrutura particulada, obtidos em pH 3,5, apresentaram-se frágeis e fraturaram-se totalmente ao serem comprimidos na análise do perfil de textura.

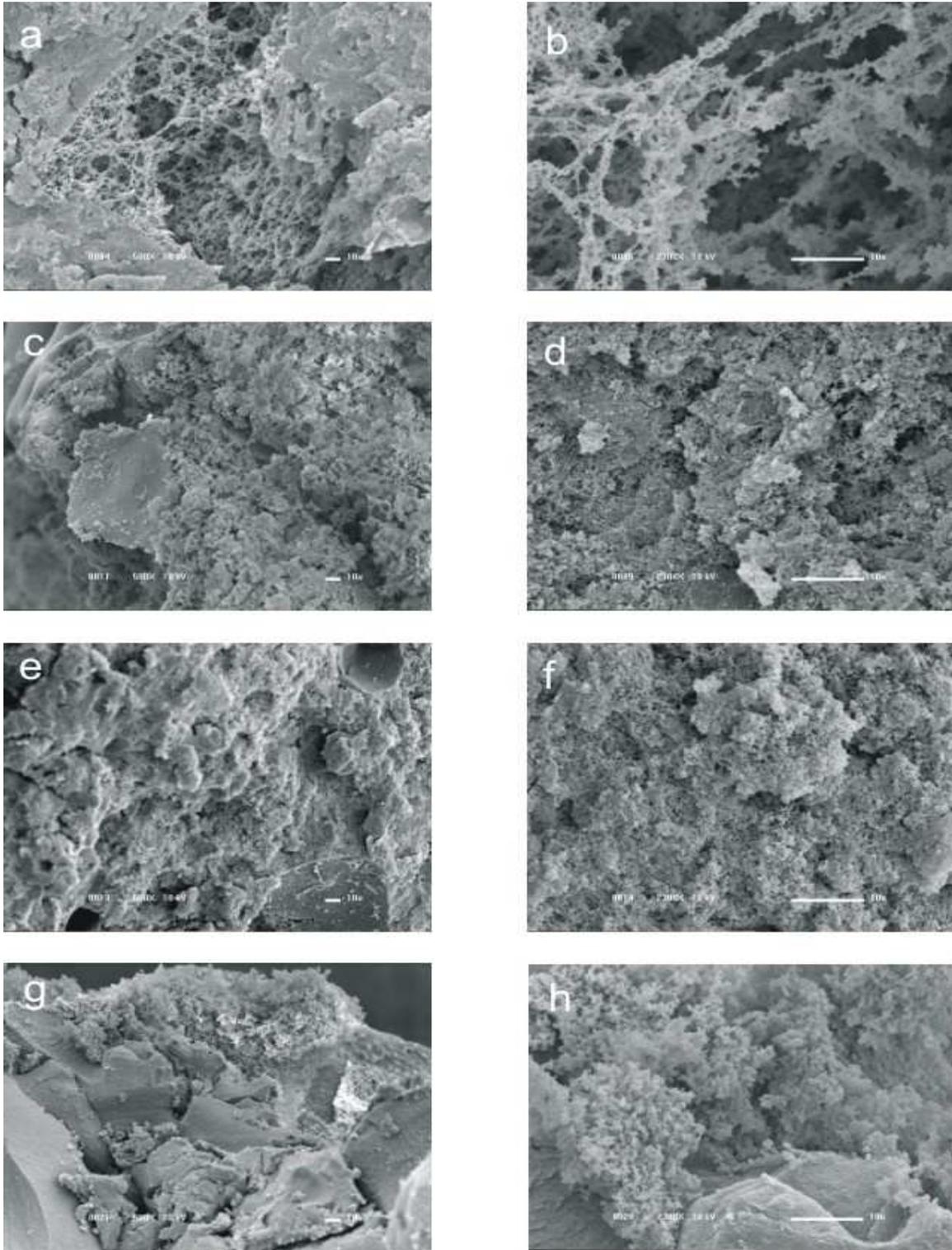


Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 2300x (a,c,e,g) e 500x (b,d,f,h), de géis simples e mistos de IPS:IPSL, pH 3,5. (a,b) 100:0; (c,d) 80:20; (e,f) 60:40; (g,h) 0:100.

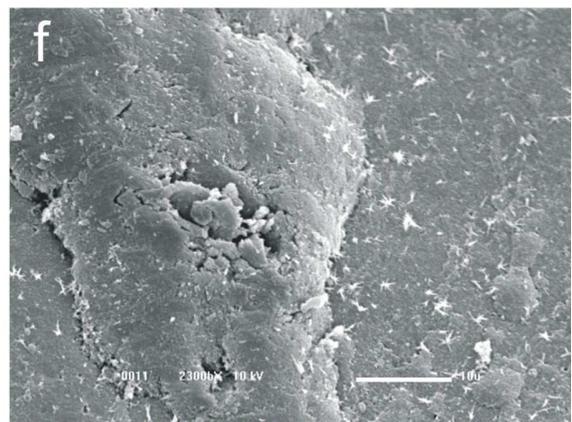
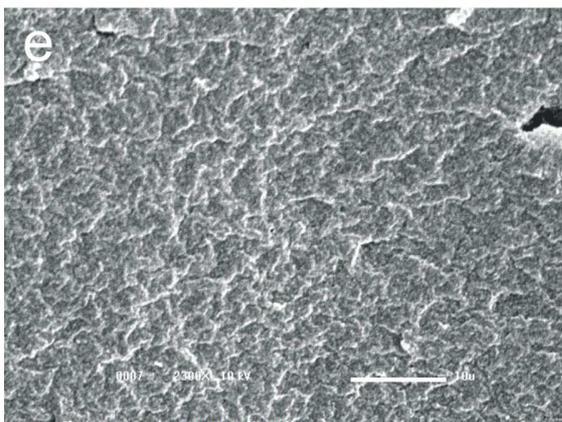
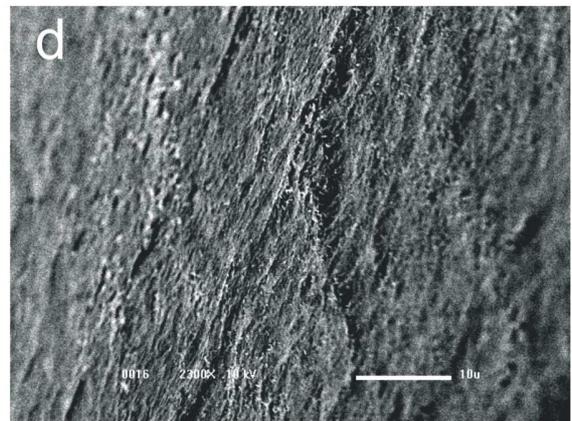
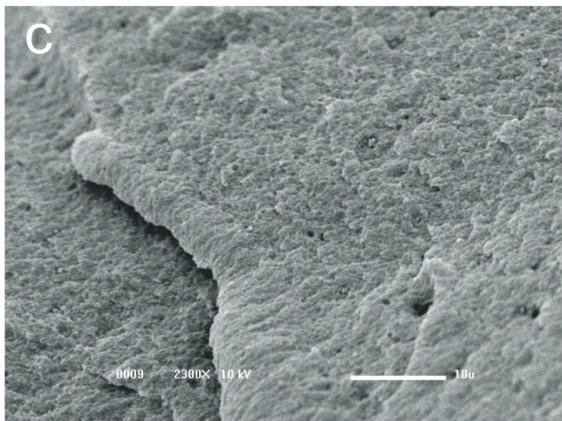
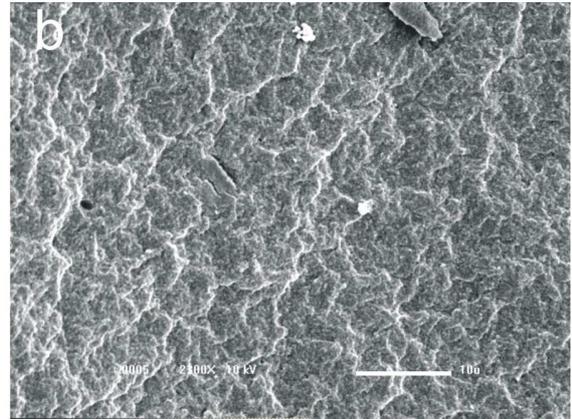
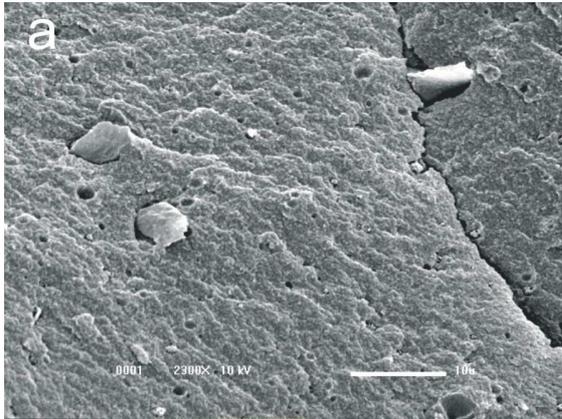


Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 2300x de géis simples e mistos de IPS:IPSL, pH 7,0. a) 100:0; b) 80:20; c) 60:40; d) 40:60; e) 20:80; f) 0:100.

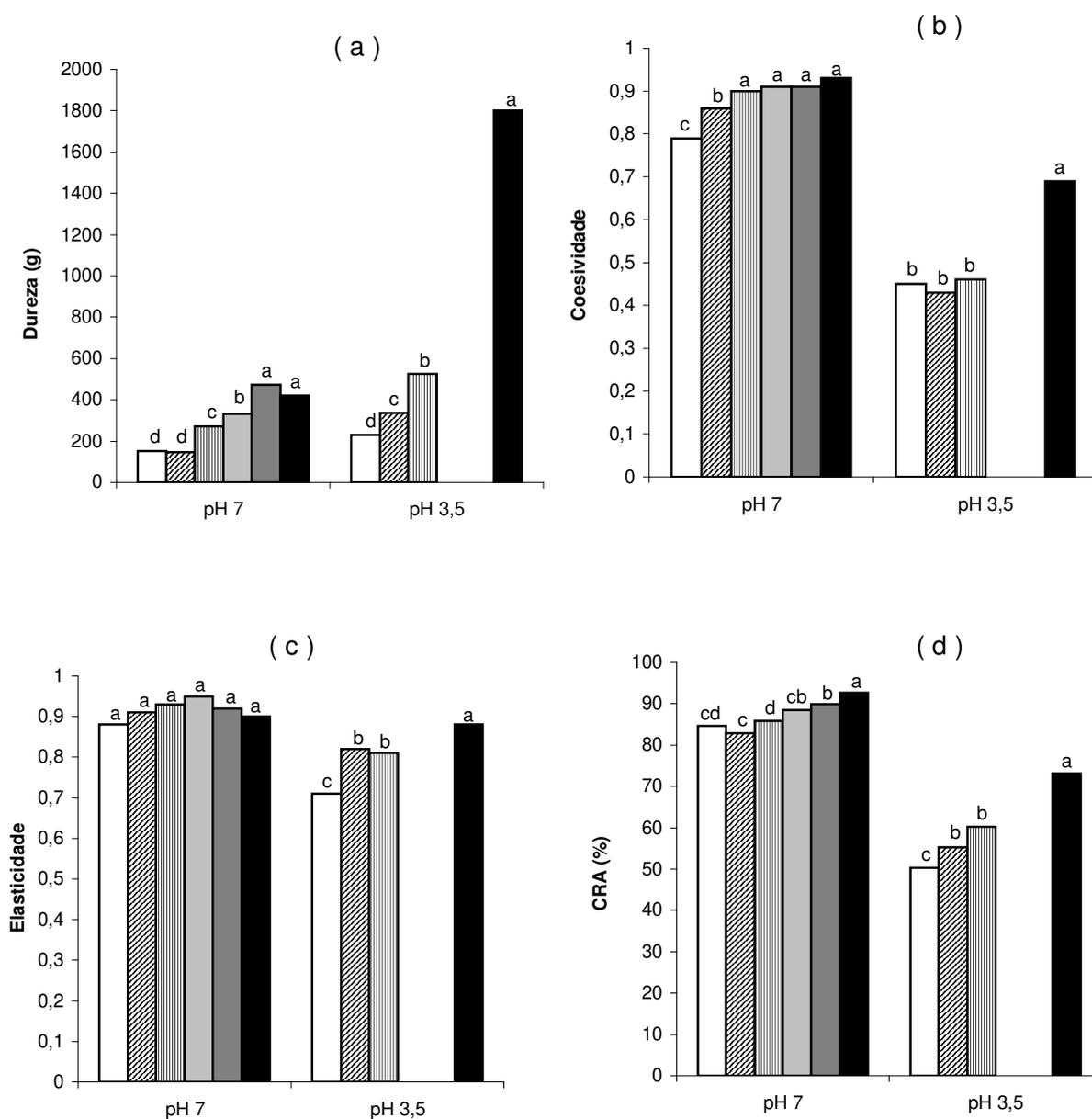


Figura 8 – Propriedades de textura e CRA de géis de IPS:IPSL, 14% de proteína, 95° C, nas proporções entre as frações protéicas IPS:IPSL – 100:0 □ ; 80:20 ▨ ; 60:40 ▤ ; 40:60 ▥ ; 20:80 ▦ ; 0:100 ▩. (a) Dureza; (b) Elasticidade; (c) Coesividade. Em todos os gráficos, valores com sobrescritos diferentes no mesmo pH, indicam diferença significativamente ( $P \leq 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

\* - IPS:IPSL – 40:60 e 20:80, pH 3,5 – Condições em que foram verificadas separação de fase.

Na Figura 9 estão exemplos de gráficos de perfil de textura, e as fraturas verificadas nos géis de pH 3,5, estão demonstradas por “quebras” no primeiro pico (indicadas por círculos) nas Figuras 9 (a) e (c), as quais não ocorreram nos géis com maior coesividade obtidos em pH 7,0, Figura 9 (b) e (d).

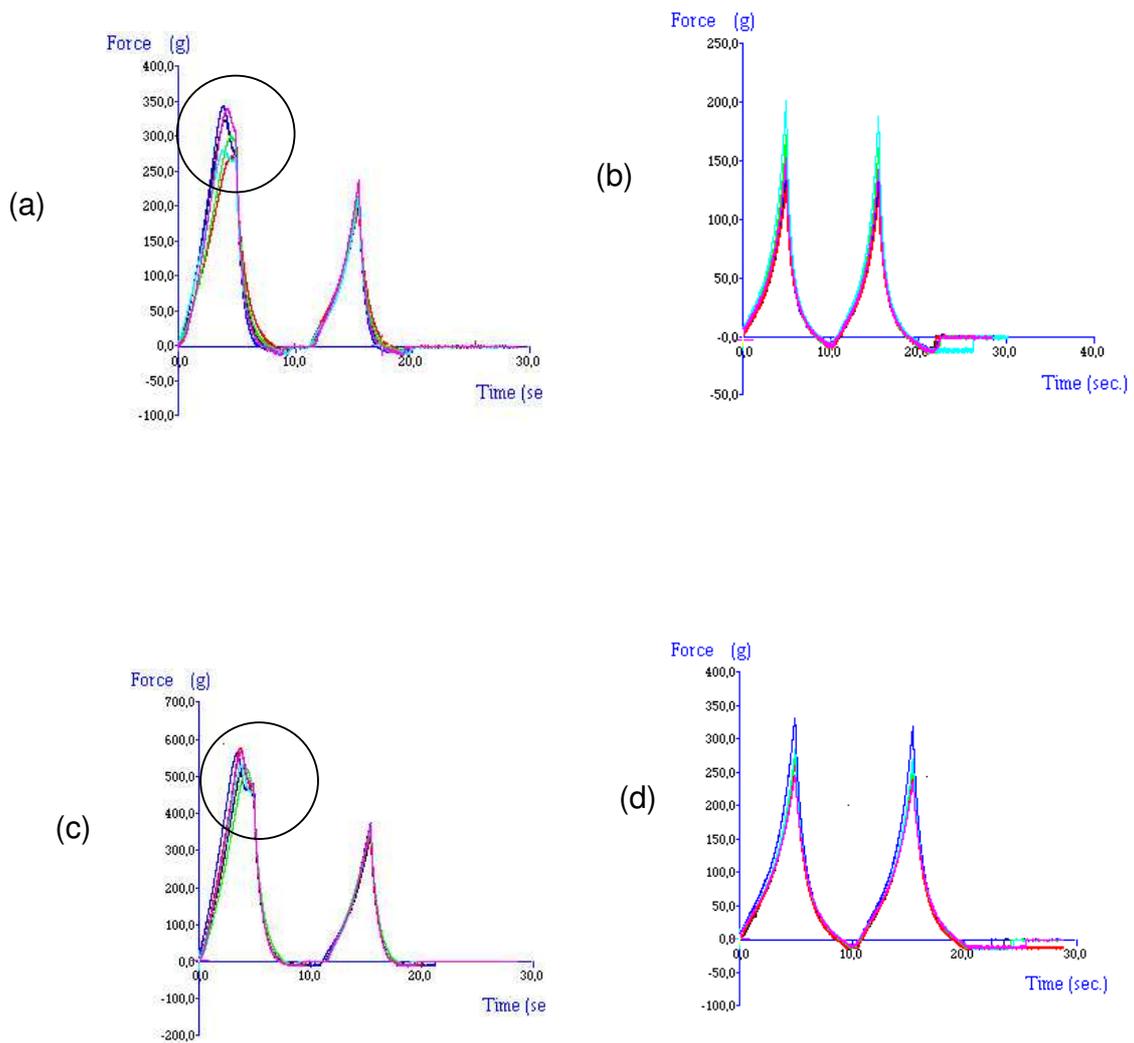


Figura 9 – Perfil de textura de géis mistos de IPS : IPSL a) 80 : 20 - pH 3,5; b) 80 : 20 – pH 7,0; c) 60 : 40 – pH 3,5; d) 60 : 40 – pH 7,0.

### 4.2.3 Solubilidade dos géis

A solubilidade dos géis em tampão A (tampão tris-glicina-EDTA, pH 8); B (A + Uréia 6M + 0,5% de SDS); C (B + 10 mM de DTT) está apresentada na Figura 10.

A solubilidade dos géis de pH 7 em tampão A diminuiu com o aumento da proporção de IPSL na mistura, passando de 40% para o gel de IPS para 10% para o gel de IPSL. A diminuição da solubilidade provavelmente indica que a participação das forças eletrostáticas na manutenção do gel diminui quando o IPSL é incorporado ao sistema. No tampão B, a solubilidade dos géis de pH 7,0 variou entre 90 e 73%, diminuindo com a adição de IPSL ao sistema. Alta solubilidade do gel de IPS (90%) no tampão B indica que as ligações não covalentes são mais importantes na manutenção da rede do gel que as ligações dissulfídicas. A solubilidade do gel de IPS, pH 7,0, no tampão C, que contém DTT foi 100%, indicando haver participação de ligação dissulfeto na estruturação do gel. Valores semelhantes de solubilidade foram obtidos por Shimada e Cheftel (1988) para os mesmos tipos de tampão. Nakamura, Utsumi e Mori. (1986) e Utsumi e Kinsella (1985 a,b) concluíram que géis de IPS com pH 7,6 a 8,0 têm as ligações de hidrogênio e dissulfeto envolvidas na manutenção do gel. Resultados semelhantes foram obtidos por Puppo et al. (1995), para géis de IPS obtidos em condições semelhantes. Com a adição de IPSL, a solubilidade no tampão B diminuiu, indicando um possível aumento da importância das ligações covalentes na manutenção da rede do gel. Este fato, entretanto, não foi comprovado, pois a solubilidade géis com IPSL, assim como dos géis mistos, não aumentou em tampão contendo DTT (tampão C). Isto pode ter ocorrido devido à incompleta dispersão desses géis na solução. Shimada e Cheftel (1988) observaram que a solubilidade de géis de IPSL com pH 7 em tampão C diminuiu com o aumento da concentração de proteína de aproximadamente 99% para 94%, quando a concentração protéica do gel foi aumentada de 8 para 10%.

Os géis preparados em pH 3,5 apresentaram baixa solubilidade (5,6 a 17,2%) no tampão A indicando a diminuição das forças eletrostáticas na proximidade do pI (Figura 10 b). A alta solubilidade em B (99 a 86%) sem aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) com a adição de DTT, indica que esses géis são

estabilizados essencialmente por interações hidrofóbicas (Figura 10 b). Esse fato era esperado, pois ligações dissulfeto são inibidas em pH ácido. Resultados semelhantes foram observados em géis de proteínas do soro de leite (LUPANO; DUMAY e CHEFTEL,1992).

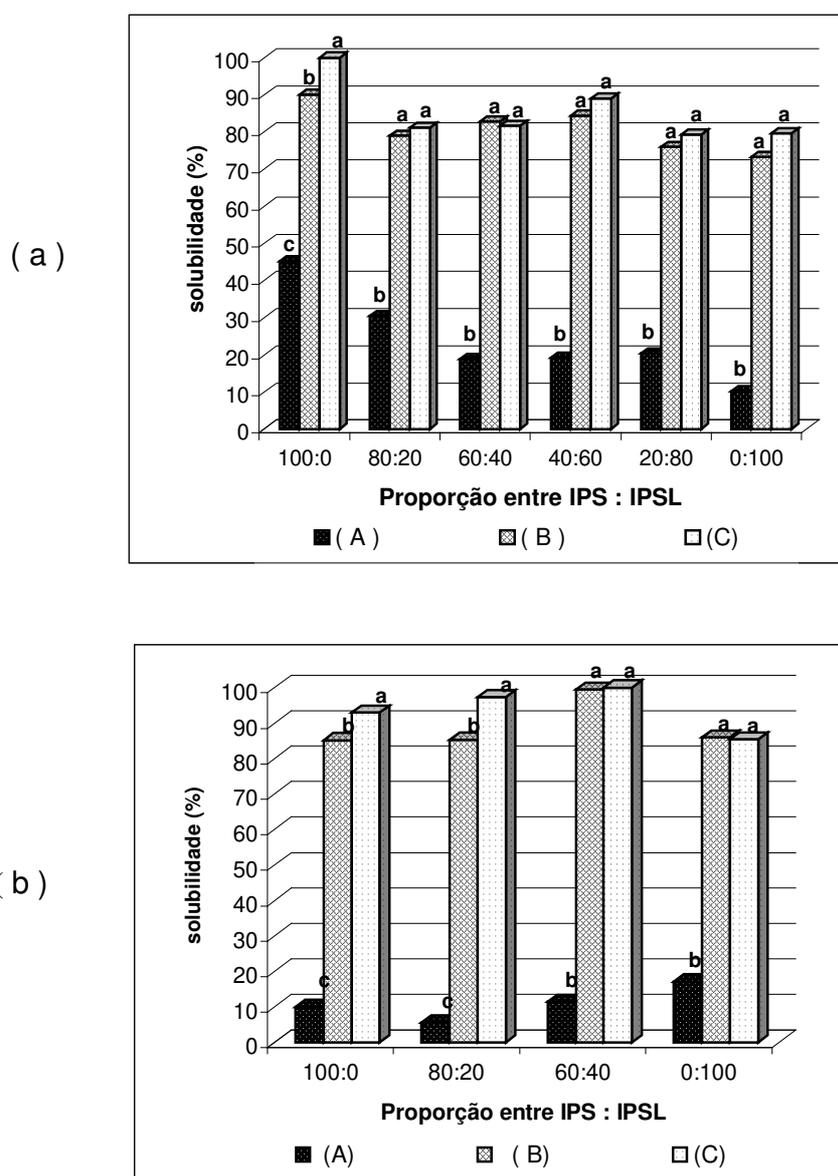
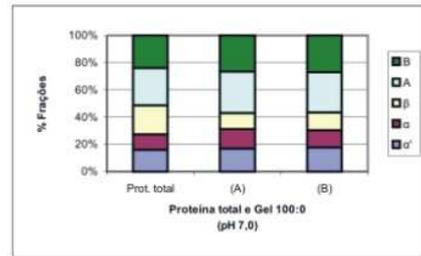
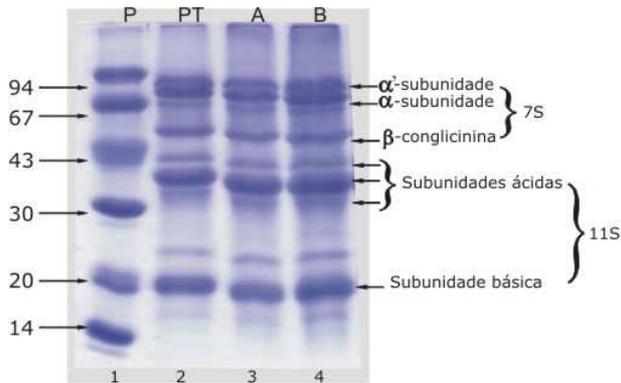


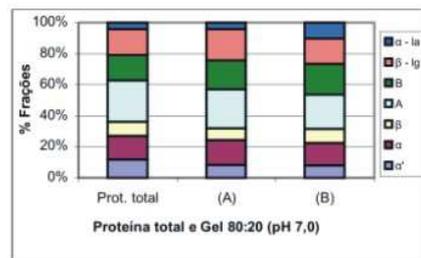
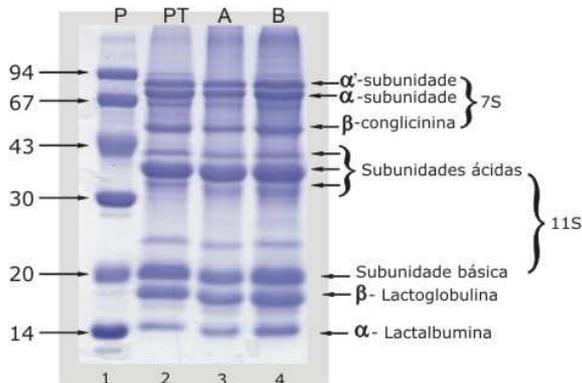
Figura 10 – Solubilidade de géis simples e mistos de IPS : IPSL com 14% de proteína, nos tampões A: tampão tris-glicina-EDTA, pH 8; B: A + Uréia 6M + 0,5% de SDS; C: B + 10 mM de DTT. (a) pH 7; (b) pH 3,5. Sobrescritos diferentes em cada condição de proporcionalidade IPS:IPSL, indicam que os valores diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Para identificar a composição das frações solubilizadas nos tampões A e B, as proteínas solúveis foram analisadas por eletroforese em SDS – PAGE. O perfil eletroforético das frações solúveis dos géis de IPS:IPSL nos tampões A e B, estão representados na Figura 11. Com o aumento da proporção de IP SL na mistura, verificou-se entre as frações solúveis em tampão A, uma diminuição da intensidade relativa da banda na região da fração 7S (Figura 11d) ou ausência dessa banda (Figura 11e) e completa ausência do polipeptídeo básico da fração 11S (Figura 11d,e). Estas frações, no entanto, foram observadas entre as frações solúveis em B, o que indica que a fração 7S e o polipeptídeo básico da 11S foram mantidos na estrutura desses géis principalmente por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. No densitograma das frações solúveis do gel 20:80 em B, o polipeptídeo básico também não aparece, mas no perfil eletroforético (Figura 11e) esta fração está presente nesse extrato, porém a sua área foi somada à área da  $\beta$ -Lg. Podemos também observar que para os géis obtidos nos dois pHs, a  $\alpha$ -lactalbumina, a  $\beta$ -lactoglobulina e o polipeptídeo ácido da fração 11S, são solubilizados no tampão A indicando que estes podem estar ligadas à rede protéica principalmente por interações eletrostáticas.

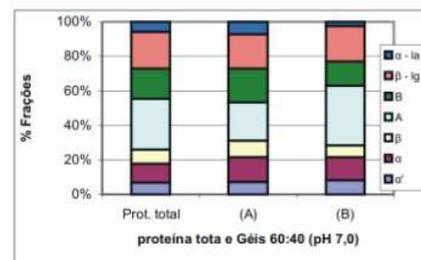
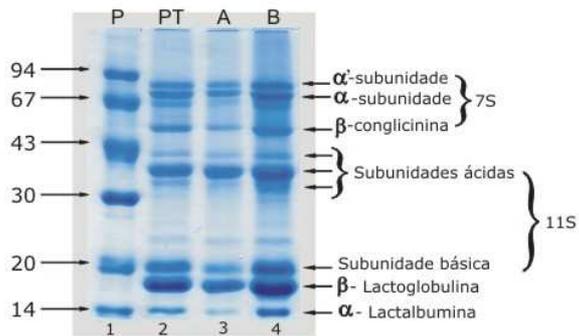
(a) IPS : IPSL – 100 : 0 (pH 7,0)



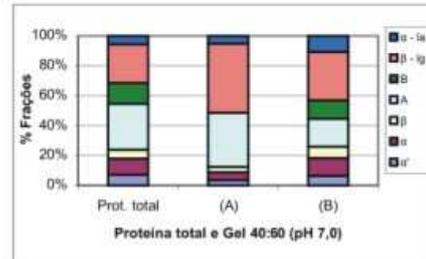
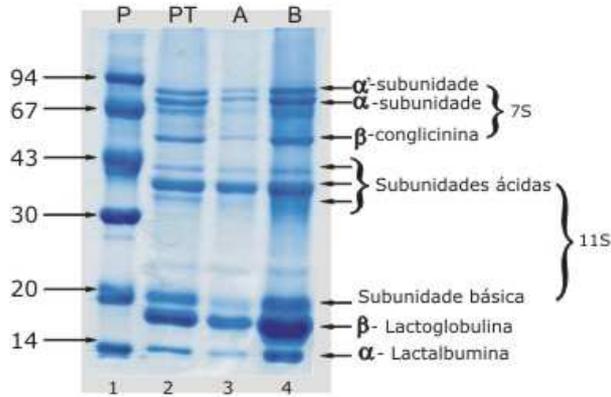
(b) IPS : IPSL – 80 : 20 (pH 7,0)



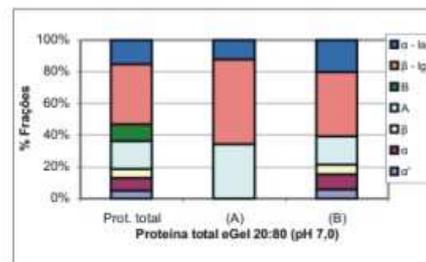
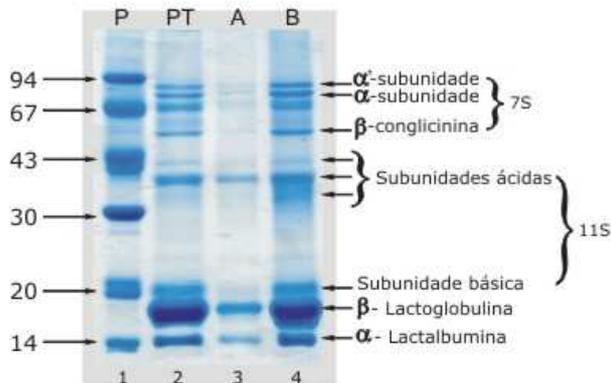
(c) IPS : IPSL – 60 : 40 (pH 7,0)



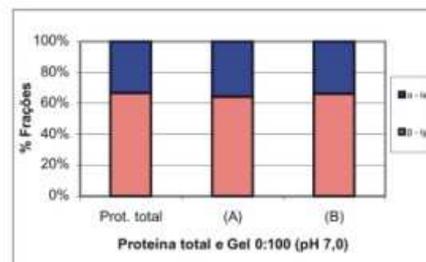
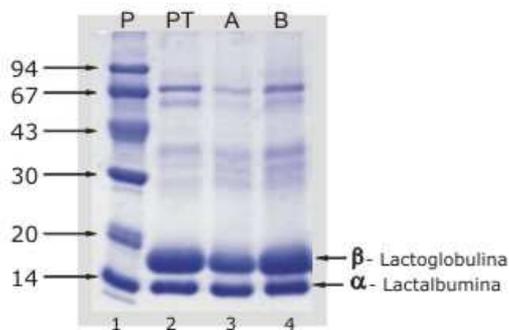
(d) IPS : IPSL – 40 : 60 (pH 7,0)



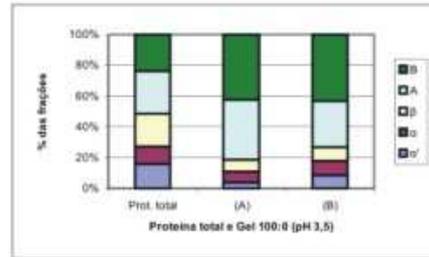
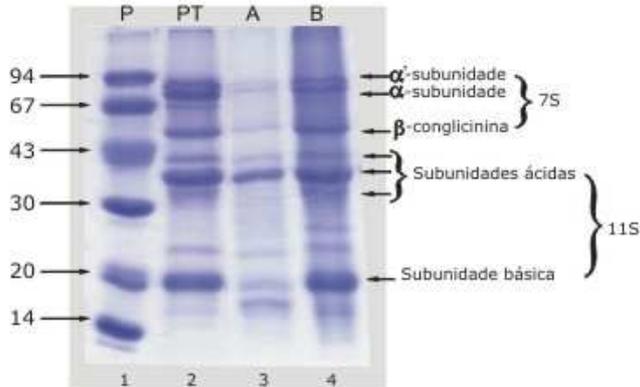
(e) IPS : IPSL – 20 : 80 (pH 7,0)



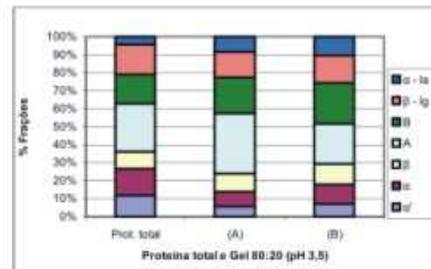
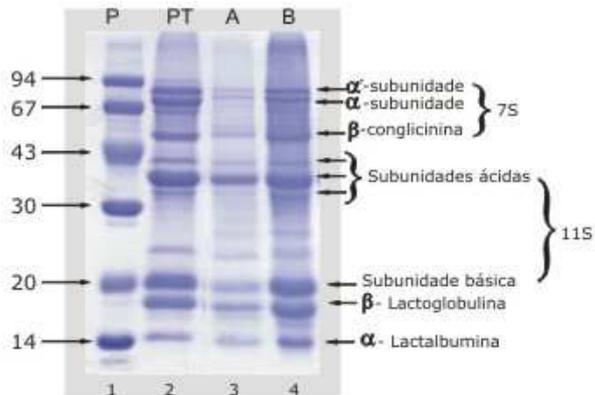
(f) IPS : IPSL – 0 : 100 (pH 7,0)



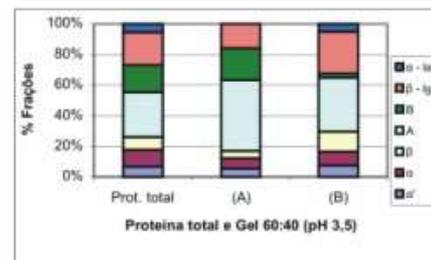
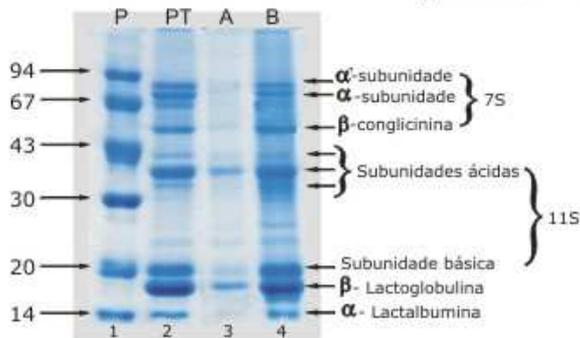
(g) IPS : IPSL – 100 : 0 (pH 3,5)



(h) IPS : IPSL – 80 : 20 (pH 3,5)



(i) IPS : IPSL – 60 : 40 (pH 3,5)



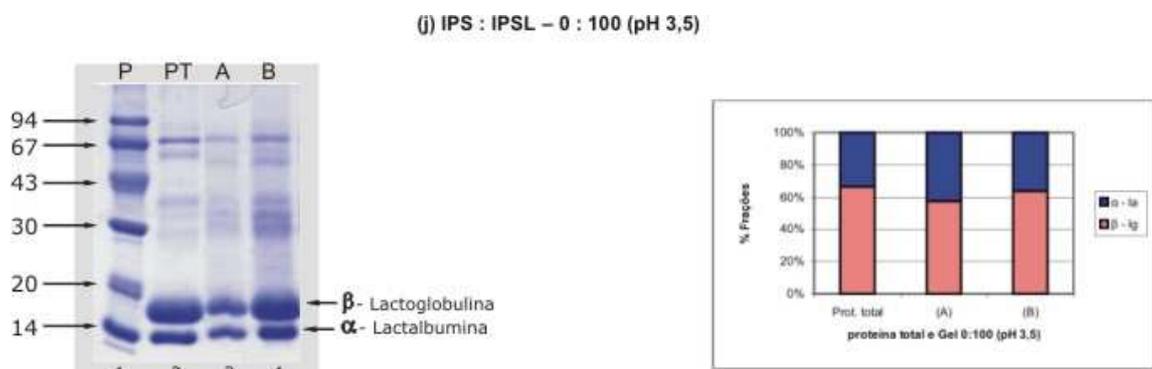


Figura 11 – Eletroforese dos extratos solúveis dos géis de IPS : IPSL, pH 7,0 (a,b,c,d,e,f) e pH 3,5 (g,h,i,j), nos tampões A (tampão tris-glicina-EDTA, pH 8) e B (A + Uréia 6M + 0,5% de SDS). Em todos os géis a linha 1 corresponde ao padrão (P); linha 2, frações protéicas relativas da proteína total, IPS ou IPSL ou misturas, dispersa em água destilada (PT); linha 3, frações solúveis no solvente A e linha 4, frações solúveis no solvente B.

Os gráficos a direita mostram a percentagem da área das subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da fração 7S; dos polipeptídios ácido e básico da fração 11S e as frações  $\beta$  – Lg e  $\alpha$  – La do IPSL em relação a área total, calculadas a partir da densitometria dos géis de eletroforese.

## 5- CONCLUSÕES

A capacidade de formação de gel foi modificada com o aumento da concentração de proteína no intervalo de 8 a 14%. Não foram observadas alterações ao modificar a proporção entre os isolados protéicos de soja e de soro de leite, numa mesma concentração protéica final, exceto para géis com pH 3,5 e proporção de IPSL maior que a de IPS, onde houve separação de fase.

Para valor de pH 7,0 e temperatura de aquecimento 95°C/30min, 14% de proteína foi a concentração mínima para obtenção de géis simples de IPS e de IPSL capazes de auto sustentar-se. Esta concentração não foi modificada com a mistura dos isolados, em todas as proporções testadas. Quando o pH da dispersão foi reduzido para 3,5, foi possível obter géis capazes de auto sustentar-se com 12% de proteína nas mesmas condições de aquecimento.

A estrutura dos géis simples e mistos foi mantida principalmente por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio em ambos os pHs estudados. O perfil indica que a  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, proteínas do soro de leite, e o polipeptídeo ácido da fração 11S, foram estabilizados principalmente por interações eletrostáticas. A fração 7S e o polipeptídeo básico da fração 11S, foram mantidos principalmente por ponte de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Com a substituição parcial de IPS por IPSL, a microestrutura dos géis mistos, pH 3,5, foi mais compacta, com poros menores e conseqüente maior capacidade de retenção de água.

A substituição parcial de IPS por IPSL em dispersões com pH 3,5, favoreceu a formação de géis com maior dureza e elasticidade que o gel simples de IPS. Em pH 7,0, a substituição parcial de IPS por IPSL, levou à formação de géis mais duros e mais coesos que os géis de IPS obtidos nesse pH.

A mistura IPS:IPSL, nas condições estudadas, levou a formação de géis com melhores propriedades de textura e CRA comparados aos géis simples de IPS, porém o mesmo não foi verificado quando os géis mistos foram comparados com os géis simples de IPSL.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, J. M.; KINSELLA, J. E. Compression strength of dairy gels and microstructural interpretation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 5, p. 1224-1228, 1991.

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

ALTING, A. C.; De JONGH, H. J. J.; VISSCHERS, R. W.; SIMONS, J. F. A. Physical and chemical interactions in pH-induced aggregation and gelation of food proteins. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington,v.50, p.4674-4681, 2002.

ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; de KRUIF, D. G.; PAQUES, M.; VISSCHERS, R. W. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. **Food Hidrocolloids**, Chicago,v. 17, 469-479, 2003 a.

ALTING, A. C.;van der MEULENA, E.T.; HUGENHOLTZ, J.; VISSCHERS, R. W. Control of texture of cold-set gels through programmed bacterial acidification. **International Dairy Journal**, v.14 p. 3230329, 2004.

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

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL METHODS ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**. 15. ed., Washington, D. C., 1990. v.2, 1141 p.

BADLEY, R. A.; ATKISON, D.; HAUSER, H.; OLDANI, D.; GREEN, J. P.; STUBBS, J. M. The Structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochemistry Biophysical Acta**, "S.I", v. 412, n. 1, p. 214-228, 1975.

BARBUT, S. Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. **Food Research International**, Great Britain, v. 28, n. 5, p. 437-443, 1995.

BELFORD, D.A.; RAYNOR, T.E.; COWIN, A.J.; COOTER, R.D.; HARRIES, R.C.H. Milk growth factors: towards a biologically active wound dressing. **Australasian Biotechnology**, v. 7, p. 223-228, 1997.

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

BEZAULT, J.; BHIMANI, R.; WIPROVNICK, J.; FURMANSKI, P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. **Cancer Research**, v. 54, p. 2310-2312, 1994.

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

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

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

BOURNE, M. C. Texture measurements in vegetables. Theory, determination and control of physical properties of food materials. In: RHA, C. (Ed.). Reidel, Dordrecht, 1975, p. 131-162.

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity**: concept and measurement. New York : Academic Press, 1982, 325p.

BOYE, J. E.; ALLI, I. Thermal denaturation of mixtures of  $\alpha$  – lactalbumin and  $\beta$  – lactoglobulin: a differential scanning calorimetric study. **Food Research International**, Great Britain, v.33, p. 673-682, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BRENNAN, J. G. Food texture measurement. In: Developments in food analysis techniques – 2. KING, R. D. (Ed.). Applied Science, London, 1980. Chap. 1, p. 1-27.

CHANG, S.K.C.; LIU, Z.-S.; HOU, H.-J.; WILSON, L. A. Influence of storage on the characteristics of soybean, soymilk and tofu. In. VII WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE; IV INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE; III CONGRESSO MUNDIAL DE SOJA (BRAZILIAN SOYBEAN CONGRESS), 2004. Foz do Iguassu, Proceedings, Londrina, 2004, p. 977-983.

CHEFTEL, J. C.; LORIENT, D.; CUQ, J. L. **Proteínas Alimentárias – bioquímica, propiedades funcionales , valor nutritivo, modificaciones químicas**. Editora Acribia, S/A., 1989, cap. 4,p. 196-198.

CHRONAKIS, I.S.; KASAPIS, S. Structural properties of single and mixed milk/soya protein systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.7, n.6, p. 459-478, 1993.

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

COMFORT, S.; HOWELL, N.K. Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures . **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.16, p.661-672, 2002.

DALGLEISH, D. G.; SENARATNE, V.; FRANCOIS, S. Interactions between  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. V. 45, p. 3459-3464, 1997.

DAMODARAN, S. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins . In: Kinsella, J. E. Soucie. W>G. (Eds.). **Food Proteins**. The American Oil Chemists society. 1989, p. 21-51.

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

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: Fennema, O. R. (Ed.), **Food Chemistry**, Marcel Dekker, New York, p. 321-430, 1996.

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

DRAKE, M. A.; CHEN, X. Q.; TAMARAPU, S.; LEENANON, B. Soy protein fortification affects sensory, chemical, and microbiological properties of dairy yogurts. **Journal Food Science**, Chicago, v.65, n. 7, p. 1244-1247, 2000.

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

ELIZALDE, B. E. ; BARTHOLOMAI, G. B. ; PILOSOF, A. M. R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **Lebensm. Wiss. Technol.** v.29, n.4, p.1996.

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

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

FRIEDMAN, H. H.; WHITNEY, J.E.; SZCZESNIAK, A. S. The texturometer – a new instrument for objective texture measurement. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 28, n.3, p. 390-396, 1963.

GUINARD, J.-X.; MAZZUCHELLI, The sensory perception of texture and mouthfeel – a review. **Trends in Food Science & Technology**. Davis, v.6, p. 213-218, 1995.

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

HENN, R.L.; NETTO, F.M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.8, p. 3009-3015, 1998.

HERMANSSON, A. –M. Functional properties of proteins from foods: solubility. Biluga Till Mafu, University of Lund, Sweedem, bulletin N° 2, 1973.

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

HERMANSSON, A. –M. Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. **Journal Texture Studies**, Connecticut, v.9, n.1/2, p.33-58, s.d., 1978.

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

HERMANSSON, A. –M. Soy protein gelation. **Jornal of the American Oil Chemists` Society**, Champaign, v.63, n.5, p. 658-666, 1986.

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

HERMANSSON, A. –M. Microestruture of protein struture gels related to functionality. In: YADA, R. Y.; JACMAN, R. L.; SMITH, J. L. (Ed.). *Protein Structure-Function Relationships in Foods*, Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1994, p. 22-42.

HOLT, C. Molecular bases of whey protein food funcionalities. **Australian Journal of Food Science and Technology**, v. 55 p. 53-55, 2000.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Effects of N-ethylmaleimide and CaCl<sub>2</sub> on cold gelation of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 30, n. 6, p. 451-455, 1997.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Protein and salt effects on Ca<sup>2+</sup> - induced cold gelation of whey protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 74-77, 1998.

HOWELL, N.K. Synergism and interactions in mixed protein systems. In : Harding, S. E. ; Hill, S. E. and Mitchell, J.R. **Biopolymer Mixtures**. Nottingham : N. V. Press. 1995. Cap 16, p 335 – 336.

HOWELL, N.K; LAWRIE, R. A. Funcional aspects of blood plasma proteins: Separation and characterisation. **Journal of Food Technology**, v.18, 747-762, 1983.

HOWELL, N.K; LAWRIE, R. A. Funcional aspects of blood plasma proteins. 2. Gelling properties. **Journal of Food Tecnology**, v. 19, p. 289-295, 1984.

HOWELL, N.K; LAWRIE, R. A. Funcional aspects of blood plasma proteins: Viscosity. **Journal of Food Technology**, v.22, 145-151, 1987.

HOWELL, N.K; YEBOAH, N.; LEWIS, D. Studies on the eletrostatic interactions of lysozyme with α-lactalbumin and β-lactoglobulin. **International Journal of Food Science and Tecnology**, v.30, p. 321-334, 1995.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. Sensory analysis: Vocabulary (ISI 5492). Available from the ISO Central Secretariat, Case postale 56, 1211, Geneva, 1992.

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

JOHNSON, D. W.; KIKUCHI, S. Processing for producing soy protein isolate. In Proceedings of the world Congress on Vegetable Protein Utilization in: Human Foods and Animal Feedstuffs, T. H. Applewhite (Ed.). **American Oil Chemists Society, Champaign, IL**. P. 66-77,1988.

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

KARLESKIND, D.;LAYE, I.; MORR, C.V.; SCHENZ, T.W. Emulsifying properties lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. **Journal Food Science**, 61(1): 54-58, 1996.

KINSELLA, J. E. Funcional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 56, n.3, p. 242-258, Mar., 1979.

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

KINSELLA, J. E. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v.34, p. 261-264, 1990.`

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

van KLEEF, F. S. M. Thermally induced protein gelation : gelation and rheological characterization of highly concentrated ovalbumin and soybean protein gels. **Biopolymers**, v. 25, p. 31-59, 1986.

KOSHIYAMA, I. Some aspectsm of subunit structure of a 7S protein in soybean globulins. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.35, n.3, p.385-395, 1971.

KUHN, P.R.; FOEGEDING, E. A. **Journal Food Science**, Chicago, v. 56, p.789-796.

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

LAW, A. J. R.; LEAVER, J. Factors affecting the heat denaturation of whey proteins in cows' milk. **International Dairy journal**, Melbourne, v.9, n.3-6, p. 407-408, 1999.

LI-CHAN, E. Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p.47-56, 1983.

LI, S. J.; KING, A.J. Lipid oxidation and myosin denaturation in dark chicken meat. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 3080-3084, 1996.

LIU, K. **Soybeans**: Chemistry, Tecnology, and Utilization. New York : C&H, 1997

LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, phisical, and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates. **Food Chemistry and Toxicology**, v.65, n. 5,p.811-818, 2000.

LÓPEZ de OGARA, M. C. L.; LAYÑO, M.D.; PILOSO, A. M.; MACCHI, R.A. Functional properties of soy isolates as affected by heat treatment during isoelectric precipitation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 184-187, 1992.

LUPANO, C. E. Effect of heat treatments in very acidic conditions on whey protein isolate properties. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 77, p. 2191-2198, 1994.

LUPANO, C. E. Gelation of mixed systems whey protein concentrate-gluten in acidic conditions. **Food Research International**, Great Britain, v. 33, p. 691-696, 2000.

LUPANO, C. E.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 27, p. 615-628, 1992.

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

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

MATSUDOMI, N.; KANDA, Y.; MORIWAKI, H.  $\alpha$ -Casein improves the gel properties of dried egg White. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 7140-7145, 2003.

MAZUR, W.; ADLERCREUTZ, H. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. **Pure and Applied Chemistry**, Helsinki, v. 70, n. 9, p. 1759-1776, 1998.

MEISEL, H.; SCHLIMME, E. Bioactive peptides derived from milk proteins: Ingredients for functional foodes? **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 48, p. 343-357, 1996.

MODLER, H.W. Funcional properties of nonfat dairy ingredients – a review. modification of lactose and products containing whey proteins . **Journal Dairy Science**, Chicago, v.68, p. 2206-2214, 1985.

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

MORI, T.; NAKAMURA, T.; UTSUMI, S. Behavior of intermolecular bond formation in the stage of heat induced gelation of glycinin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.34, n.1, p. 33-36, 1986.

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

MORR, C. V. Current status of soy protein functionality in food systems. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 67, p.265-271, 1990.

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

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

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. P.; van BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 1715, 1985.

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

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

NAKAMURA, T.; UTSUMI, S.; MORI, T. Interactions during heat-induced gelation in a mixed system of soybean 7S and 11S globulins. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2429-2435, 1986.

NGARIZE, S.; ADAMS, A.; HOWELL, N. K., Studies on egg albumin and whey protein interactions by FT-Raman spectroscopy and rheology. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.1, p. 49-59, 2004.

PARASKEVOPOULOU, A.; KIOSSEOGLU, V. Texture profile analyses of heat-formed gels and cakes prepared with low cholesterol egg yolk concentrates. **Journal Food Science**, Chicago, v. 62, p.208- 214, 1997.

PARK, K. H.; LUND, D. B. Calorimetric study of thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, Chicago, v. 67, p. 1699-1706, 1983.

PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M. C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy isolates. 1. Structural and hydration properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42,n. 10, p. 2161-2169, 1994 a.

PHILLIPS, L. G., WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. E. Structure-function properties of food proteins. **Food Science and Technology**, Chicago, Connecticut, p. 179-204, 1994.

PUPPO, M. C.; LUPANO, C. E.; AÑÓN, M. C. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, v. 43, p. 2356-2361, 1995.

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

RELKIN, P.; LAUNAY, B.; EYNARD, L. Effect of sodium addition on thermal denaturation of apo- $\alpha$ -lactalbumin: a differential scanning calorimetric study. **Journal of Dairy Science**, Chicago, v. 76, p. 36-47, 1993.

RELKIN, P.; LAUNAY, B. Concentration effect on the Kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.4, n.1 p. 19-32, 1990.

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

RENKEMA, J.M.S. Relations between rheological properties and network structure os soy protein gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, p. 39-47, 2004.

RHEE, K. C. Functionality in Food Systems. Hettiarach chy, n. S. and Ziegler, G. R. p. 311-324, 1994.

ROESCH, R.; JUNEJA, M.; MONAGLE, C.; CORREDIG, M. Aggregation of soy/milk mixes during acidification. **Food Research International**, Great Britain, Ont., v. 37, p. 209-215, 2004.

ROSENTHAL, A. J. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. In: \_\_\_\_\_. Food texture: measurement and perception, Gaithersburg: Aspen , 1999. Cap. 1, p. 1-17.

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

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

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

SCOTT-BLAIR, G. Rheology in food research. **Advances in Food Research**, v.8, p.1-56, 1958.

SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Bol. SBCTA**, 32 (1): 105-126, 1998.

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

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans: Chemistry and Tecnology**. Connecticut : The Avi Publishing Company, INC, 1972. 470p.

SMITHERS, G. W.; McINTOSH, G. H.; ROYLE, P.J.; LEU, R.K.L.; REGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. L.; KENWARD, R. S.

Whey proteins as functional food ingredients. **International Dairy Journal**, Melbourne, v.8, p. 425-434, 1998.

STADING, M.; HERMANSSON, A. –M. Viscoelastic behavior of  $\beta$ -Lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 4, p. 121-135,1990.

STADING, M.; HERMANSSON, A. –M. Large deformation properties of  $\beta$ -Lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 5, p. 339-352,1991.

STASWICK, P.E.; HERMODSON, M.A.; NIELSEN, N.C. Identification of the cystine which links the acidic and basic components of the glycinin subunits. **Journal Biological Chemistry**, v. 259, p. 13431-13435, 1984.

SZCZESNIAK, A. Classification of textural characteristics. **Journal Food Science**, v. 28, p. 385, 1963.

SZCZESNIAK, A. Psychorheology and texture as factors controlling the consumer acceptance of food. **Cereal Foods World**, v.35, p.1201-1204, 1990.

SZCZESNIAK, A. Texture perceptions and food quality. **Journal of Food Quality**, v. 14, p. 75-78, 1991.

THAN, V.H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds straightforward fractionation and their characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.24, n. 6, p. 1117-1121, 1976.

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

TURGEON, S. L.; OULD ELEYA, M. M. The effects of pH on the rheology of  $\beta$ -lactoglobulin/ $\kappa$ -carrageenan mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, p. 245-251, 2000.

USDEC **Whey proteins**. Disponível em:<[www.uesdec.org](http://www.uesdec.org)>. Acesso em: 15 jan. 2002.

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

UTSUMI, S.; KINSELLA, J. E. Structure-function relationship in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, p. 297-303, 1985b.

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

VOISEY, P.W. Instrumental measurement of food testure. In: deMAN, J.M.; VOISEY, P.W.; RASPER, V.F.; STANLEY, D. W. (Ed.). *Rheology and texture in food quality*, Westport-Connecticut: AVI, 1976, cap. 4, p. 79-141.

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

WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Influence of denaturation hydrofobicity and sulphhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 3, p. 765-770, 1990.

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

YAMUL, D. K.; LUPANO, C. E. Propertieix of gels from whey protein concentrate and honey at different pHs. **Food Research International**, Great Britain, v. 36, p. 25-33, 2003.

ZHANG, X.; BEYNEN, A. C. Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *British Journal of Nutrition*, v, 70, p. 139-146, 1993.

ZIEGLER, G.R.; FOEGEDING, E.A. The gelation of proteins. **Adv. Food Nutrition Research**, v.34, p.203-298.